



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 307 594**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01911158 .2**

(96) Fecha de presentación : **23.02.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1257648**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.11.2002**

(54) Título: **Agentes de unión selectivos a antígenos de la proteína de unión a osteoprotegerina.**

(30) Prioridad: **23.02.2000 US 511139**
22.02.2001 US 791153

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(73) Titular/es: **AMGEN Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

(72) Inventor/es: **Deshpande, Rajendra, V.;**
Hitz, Anna;
Boyle, William, J. y
Sullivan, John, Kevin

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de unión selectivos a antígenos de la proteína de unión a osteoprotegerina.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos o a dominios de unión a antígeno que se unen a proteína de unión a osteoprotegerina (OPGbp). Más en particular, la invención se refiere a anticuerpos dominios de unión a antígeno que se unen selectivamente a OPGbp y que se pueden utilizar para prevenir o tratar estados patológicos relacionados con la pérdida de masa ósea. Asimismo, se proporcionan moléculas de ácido nucleico, vectores y células huésped para la producción de anticuerpos y dominios de unión a antígeno según la invención.

Antecedentes de la invención

El tejido óseo vivo presenta un equilibrio dinámico entre el depósito y la resorción del hueso. Dichos procesos están mediados principalmente por dos tipos de células: osteoblastos, que segregan moléculas que comprenden la matriz orgánica del hueso; y osteoclastos que promueven la disolución de la matriz ósea y la solubilización de las sales del hueso. En los individuos jóvenes con los huesos en crecimiento, la velocidad de depósito óseo excede a la velocidad de resorción ósea, en cambio, en los individuos maduros la velocidad de resorción puede exceder a la de depósito. En esta última situación, la mayor descomposición del hueso lleva a una reducción de la masa y la resistencia del hueso, a un mayor riesgo de fracturas y a una recuperación lenta o incompleta de los huesos rotos.

Los osteoclastos son unas células multinucleadas fagocíticas grandes que se forman a partir de células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea. Si bien el crecimiento y la formación de osteoclastos funcionales maduros no se comprende completamente, se cree que los osteoclastos maduran junto con el linaje celular monocito/macrófago como respuesta a la exposición a varios factores que favorecen el crecimiento. Se cree que el primer desarrollo de células precursoras de médula ósea en preosteoclastos está mediado por factores solubles como factor- α de necrosis de tumor (TNF- α), factor- β de necrosis de tumor (TNF- β), interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6) y factor inhibidor de leucemia (LIF). En cultivo, los preosteoclastos se forman en presencia de factor de estimulación de colonia de macrófagos añadido (M-CSF). Estos factores actúan principalmente en las primeras etapas del desarrollo del osteoclasto.

Se ha descrito un factor de polipéptido, proteína de unión a osteoprotegerina (OPGbp), que estimula la formación de osteoclasto y la resorción ósea que, según parece, actúa en un último estadio del desarrollo. Ver PCT WO 98/46751. OPGbp estimula la formación de osteoclasto desde las células precursoras de la médula ósea sin que sea necesario un co-cultivo en presencia de una línea celular de estromas. La estimulación de la resorción ósea a través de OPGbp requiere la interacción con su receptor cognado, receptor de diferenciación y activación de osteoprotegerina (ODAR), y la inhibición de la interacción ODAR/OPGbp a través de osteoprotegerina (OPG) también inhibe la resorción ósea. En consecuencia, la regulación de la unión de OPGbp a ODAR afecta a la formación de osteoclasto y la pérdida de hueso.

K. Tsukii y cols.: BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 246, N° 2, 19 de mayo 1998 describe un anticuerpo policlonal contra OPGbp murina que inhibe la resorción ósea en ratones.

Uno de los objetos de la presente invención consiste en identificar agentes de unión selectivos que regulan la interacción de OPGbp y ODAR, especialmente los agentes que bloquean la interacción de OPGbp y ODAR y/o inhiben al menos una actividad de OPGbp, como la resorción ósea. Otro objeto más de la presente invención consiste en la identificación de agentes de unión selectivos que pueden utilizarse para prevenir y tratar la pérdida de masa ósea. Otro objeto más de la presente invención consiste en la identificación de un anticuerpo, o un dominio de unión a antígeno, o un fragmento o variante del mismo, que regula la interacción de OPGbp y ODAR y neutraliza al menos una actividad de OPGbp. Los anticuerpos pueden utilizarse para prevenir y tratar la pérdida de masa ósea.

Compendio de la invención

La invención proporciona un anticuerpo o un dominio de unión a anticuerpo de proteína de unión a osteoprotegerina (OPGbp) que reconoce el epítipo DE en la proteína de unión a osteoprotegerina humana (OPGbp),

a) siendo el epítipo DE un epítipo que comprende una porción de la secuencia de aminoácido de la región DE de OPGbp humana desde el radical de aminoácido 212 hasta el radical de aminoácido 250 de la secuencia.

GFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIP, y

b) comprendiendo el epítipo DE la secuencia DLATE.

En uno de los modos de realización, el anticuerpo o dominio de unión a anticuerpo de la invención inhibe parcial o completamente al menos una actividad de OPGbp; es decir, el anticuerpo o dominio de unión a anticuerpo es un antagonista de OPGbp. En otro modo de realización, el anticuerpo o dominio de unión a anticuerpo se une a

OPGbp de manera que inhibe parcial o completamente la interacción de OPGbp con su receptor cognado, receptor de diferenciación y activación de osteoclasto, u ODAR, y de esta forma inhibe parcial o completamente la actividad de OPGbp. Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno de la invención pueden consistir en una proteína natural y reciben el nombre en el presente documento de agentes de unión selectivos proteináceos.

La invención proporciona asimismo un anticuerpo o dominio de unión a antígeno del mismo, o fragmento o variante o derivado del mismo, que se une a un epítipo en OPGbp y que inhibe parcial o completamente al menos una actividad de OPGbp, es decir, la formación o activación de osteoclasto o resorción ósea. En otras palabras, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista. Preferiblemente, OPGbp es OPGbp de mamífero. Más preferiblemente, OPGbp es una OPGbp humana que puede encontrarse en forma soluble asociada a la superficie celular, o fragmentos, derivados y variantes de los mismos.

Dicho anticuerpo se puede preparar por inmunización de un animal con OPGbp, por ejemplo OPGbp murina o humana, preferiblemente OPGbp humana, o con un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo. Por otra parte, se puede inmunizar a un animal con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica OPGbp, de manera que OPGbp es expresada y asociada con la superficie de las células transfectadas. Alternativamente, se pueden obtener agentes de unión selectivos que son anticuerpos por detección selectiva de una biblioteca que comprende secuencias de anticuerpo o dominio de unión a antígeno para la unión con OPGbp. Dicha biblioteca se prepara convenientemente en bacteriofago como fusiones de proteína o péptido con una proteína de recubrimiento de bacteriofago que se expresan en la superficie de las partículas en fagos ensambladas y las secuencias de ADN de codificación contenidas dentro de las partículas en fagos (denominada "biblioteca de despliegue en fagos"). En uno de los ejemplos, una biblioteca de fago desplegado contiene secuencias de ADN que codifican anticuerpos humanos, como cadenas pesadas y ligeras variables.

Los anticuerpos y los dominios de unión a antígeno pueden ser glucoproteínas tetraméricas similares a los anticuerpos nativos o pueden ser anticuerpos de cadena simple; fragmentos Fv, Fab, Fab' o F(ab)', anticuerpos biespecíficos, heteroanticuerpos u otros fragmentos, variantes o derivados de los mismos, que se pueden unir a OPGbp y neutralizar parcial o completamente la actividad de OPGbp. Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno se pueden producir en líneas celulares de hibridoma (células de producción de anticuerpos como células de bazo fusionadas con células de mieloma de ratón, por ejemplo) o se pueden producir en líneas celulares heterólogas transfectadas con moléculas de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o dominio de unión a antígeno.

Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno según la invención se define según la reivindicación 1 y puede comprender:

(a) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada Fab tal como se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 51) o figura 10 (SEQ ID NO: 53);

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia del punto (a);

(c) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es idéntica en al menos aproximadamente un 80% a la secuencia del punto (a); o

(d) un fragmento o derivado de (a), (b) o (c);

uniéndose selectivamente el anticuerpo o dominio de unión a antígeno a OPGbp.

En otro modo de realización, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la invención, tal como se define en la reivindicación 1, puede reconocer un epítipo en OPGbp humana reconocido por un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada Fab tal como se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 51) o la figura 10 (SEQ ID NO: 53) y una secuencia de aminoácidos ligera Fab, tal como se muestra en la figura 5 (SEQ ID NO: 43) o la figura 6 (SEQ ID NO: 45).

Se proporciona un anticuerpo o dominio de unión a anticuerpo anti-OPGbp que reconoce un epítipo DE en OPGbp, comprendiendo el epítipo DE la secuencia DLATE.

Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1 de la invención puede comprender una cadena V_L y V_H,

ES 2 307 594 T3

comprendiendo cada una de las cadenas V_l secuencias de aminoácido CDR designadas CDR1 (V_l), CDR2(V_l) y CDR3 (V_l), separadas por secuencias de aminoácido estructurales, seleccionándose CDR1 (V_l) del grupo que consiste en:

- 5 RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01);
- RASQSVGSYLA (SEQ ID NO: 02);
- 10 RASQSVSSSLA (SEQ ID NO: 03); y
- SGDALPKQY (SEQ ID NO: 04)

15 seleccionándose CDR2 (V_l) del grupo que consiste en:

- GASSLQS (SEQ ID NO: 05);
- 20 DATNRAT (SEQ ID NO: 06);
- GASSRAT (SEQ ID NO: 07); y
- 25 EDSERPS (SEQ ID NO: 08);

y seleccionándose CDR3 (V_l) del grupo que consiste en:

- 30 QHTRA (SEQ ID NO: 09);
- QHRRT (SEQ ID NO: 10);
- 35 QQYGA (SEQ ID NO: 11); y
- QSTDSSGTYVV (SEQ ID NO: 12);

40 seleccionándose CDR1 (V_l), CDR2 (V_l) y CDR3 (V_l) independientemente entre sí; y

comprendiendo cada cadena V_h secuencias de aminoácido CDR designadas CDR1 (V_h), CDR2 (V_h) y CDR3 (V_h), separadas por secuencias de aminoácido estructurales, seleccionándose CR1 (V_h) del grupo que consiste en:

- 45 NYAIH (SEQ ID NO: 13);
- NYPMH (SEQ ID NO: 14); y
- 50 DYAMH (SEQ ID NO: 15);

seleccionándose CDR2 (V_h) del grupo que consiste en:

- 55 WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16);
- VISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 17);
- 60 GISWNSGRIGYADSVKG (SEQ ID NO: 18);

65

seleccionándose CDR3 (V_h) del grupo que consiste en:

DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);

GGGGFDY (SEQ ID NO: 20); y

GGSTSARYSSGWYY (SEQ ID NO: 21);

seleccionándose CDR1 (V_h), CDR2 (V_h) y CDR3 (V_h) independientemente entre sí.

Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1 de la invención puede comprender una cadena V_l y V_h ,

comprendiendo la cadena V_l CDR1 que tiene la secuencia RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01), CDR2 que tiene la secuencia GASSLQS (SEQ ID NO: 05) y CDR3 que tienen la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09) y

comprendiendo la cadena V_h CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), CDR2 que tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y CDR3 que tiene la secuencia DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);

estando cada CDR1, CDR2 y CDR3 en cada cadena V_l y V_h separados por secuencias de aminoácido estructurales.

Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno de la invención se derivan de secuencias de ácido nucleico de línea germinal presentes en ADN genómico que codifica secuencias de aminoácido de cadena pesada y ligera. Los anticuerpos están codificados por secuencias de ácido nucleico que son los productos del reordenamiento de la secuencia de línea germinal y mutación somática.

Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1 de la invención puede comprender una cadena V_l y V_h

comprendiendo la cadena V_l una variante reordenada o somática de los genes de línea germinal V_{h1} , tal como se representa en la figura 19 (SEQ ID NO: 66); comprendiendo la cadena V_h comprende una variante reordenada o somática de genes de línea germinal V_{h1} , tal como se representa en la figura 16 (SEQ ID NO: 59); y uniéndose el anticuerpo selectivamente a un polipéptido OPGbp.

La cadena V_l puede comprender también una variante reordenada o somática de un gen de línea germinal V_{k3} tal como se representa en la figura 20 (SEQ ID NO: 68) y la cadena V_h puede comprender una variante reordenada o somática de genes de línea germinal V_{h1} tal como se representa en la figura 16 (SEQ ID NO: 59).

La cadena V_l puede comprender también una variante reordenada o somática de un gen de línea germinal V_{k3} tal como se representa en la figura 21 (SEQ ID NO: 70) y la cadena V_h puede comprender también una variante reordenada o somática de genes de línea germinal V_{h3} tal como se representa en la figura 17 (SEQ ID NO: 62).

La cadena V_l puede comprender también una variante reordenada o somática de un gen de línea germinal V_{13} tal como se representa en la figura 22 (SEQ ID NO: 72) y la cadena V_h puede comprender también una variante reordenada o somática de genes de línea germinal V_{h3} tal como se representa en la figura 18 (SEQ ID NO: 64).

Los agentes de unión selectivos de la invención (anticuerpo o dominio de unión a antígeno) inhiben parcial o completamente al menos una actividad de OPGbp, como por ejemplo la unión de OPGbp a ODAR, la formación o activación de osteoclastos, o la resorción ósea mediada por OPGbp, y se utilizan para prevenir y/o tratar estados patológicos de los huesos. En un modo de realización, se ha de administrar un antagonista de OPGbp, como por ejemplo un anticuerpo o dominios de unión a antígeno, a un animal que experimenta una pérdida de masa ósea, o que se encuentra en riesgo de pérdida de masa ósea con el fin de prevenir o tratar la pérdida de masa ósea. Se puede utilizar un antagonista de OPGbp para prevenir y/o tratar osteoporosis, pérdida de masa ósea como consecuencia de metástasis de cáncer al hueso; pérdida de masa ósea como consecuencia de artritis reumatoide, hipercalcemia de malignidad y osteoporosis inducida por esteroide.

Asimismo, se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos o dominios de unión a antígeno según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las figuras

La figura 1 presenta un ensayo ELISA de patrones Fab predominantes para reactividad con OPGbp (143-317) humana. Se llevaron a cabo valoraciones utilizando un máximo de 50 μ l de solución de fago por pocillo para dar un intervalo típico de 10^9 - 10^{11} fagos/pocillo en el ensayo ELISA. Se prepararon reservas de fagos para ELISA tal como

ES 2 307 594 T3

se describe en el ejemplo 1. Los valores fueron de determinaciones en un solo punto. Los patrones “AB” y “X” fueron superpuestos en la misma línea.

En la figura 2 se muestra la inhibición de la unión de OPGbp a ODAR mediante Fabs “AT” y “Y”. Se purificaron Fabs tal como se ha descrito en el ejemplo 4 y se añadieron a concentraciones de pocillo finales, que se muestran en la figura. Los detalles del ensayo de unión OPGbp/ODAR se exponen en el ejemplo 1. Los valores fueron las medias de determinaciones por duplicado.

La figura 3 muestra los ensayos de la médula ósea de Fabs “AT” “Y” y “P”. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada Fabs “AT”, “Y” y “P”. Se purificaron las Fabs tal como se describe en el ejemplo 4 y se añadieron a las diluciones de pocillo finales que se indican en la figura (las soluciones de reserva de Fab fueron de 750 µg/ml a 1 mg/ml). El formato de ensayo incluye una incubación previa de 1 hora del Fab anti-hu-OPGbp con 10 ng/ml de concentración final de células por pocillo de OPGbp [143-317] humana. Los valores fueron las medias de determinaciones por triplicado.

La figura 4 muestra los ensayos de célula RAW de Fabs “AT”, “Y” y “P”. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada Fabs “AT”, “Y” y “P”. Se purificaron los Fabs tal como se describe en el ejemplo 4. Se incubaron previamente las Fabs con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de una dilución 1/20 hasta la concentración final de células por pocillo que se muestra en el gráfico. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml. La concentración de células fue 1×10^5 /ml. Los valores fueron de determinaciones por triplicado con barras de error que designan 2 desviaciones típicas (2 STD).

La figura 5 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido de Fab “AT” de cadena ligera.

La figura 6 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab “Y” de cadena ligera.

La figura 7 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab “P” de cadena ligera.

La figura 8 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab “S” de cadena ligera.

La figura 9 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab “AT” de cadena pesada.

La figura 10 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab “Y” de cadena pesada.

La figura 11 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab “P” de cadena pesada.

La figura 12 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab “S” de cadena pesada.

La figura 13 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido Fab que se presentan en las figuras 5-12. Se compararon las secuencias de aminoácido previstas de Fabs de cadena ligera y pesada “AT”, “Y”, “P” y “S” en cuanto a la identidad y la similitud. Las cadenas pesadas “AT” y “Y” difieren solamente en una posición de aminoácido. Como biblioteca designada, las cuatro Fabs tienen regiones CH1 de cadena pesada idénticas que comprendían la mitad carboxi de la cadena pesada que se incluyen en los cálculos de identidad y similitud. Las cadenas ligeras “AT”, “Y” y “P” comparten las mismas familias V kappa, o similares, y por lo tanto difieren solamente en 1 a 2 aminoácidos en la mitad carboxilo de la cadena, que se incluye en los cálculos.

La figura 14 muestra una comparación de las regiones que determinan complementaridad (CDRs) de cadena pesada y ligera previstas de Fabs “AT”, “Y”, “P” y “S”. Para las comparaciones de cadena pesada, CDR1 incluye radicales de aminoácido 32-36 inclusive para todas las Fabs; CDR2 incluye radicales de aminoácido 51-67 inclusive para todas las Fabs; y CDR3 incluye radicales de aminoácido 100-116 inclusive para todas las Fabs “AT” y “Y”, 100-106 inclusive para Fab “P” y 100-113 inclusive para Fab “S”. Para las comparaciones de cadena ligera, CDR1 incluye radicales de aminoácido 29-39 inclusive para Fabs “AT” y “Y”, 28-39 inclusive para Fab “P” y 27-35 inclusive para Fab “S”; CDR2 incluye radicales de aminoácido 55-61 inclusive para Fabs “AT”, “Y” y “P” y 53-59 inclusive para Fab “S”; y CDR3 incluye radicales de aminoácido 94-98 inclusive para Fabs “AT”, “Y” y “P” y 92-102 inclusive para Fab “S”.

La figura 15 muestra una comparación de las clases de Fab. La comparación de clases de Fab se obtuvo a partir de un análisis PLOT ADN Base-V. El símbolo (*) indica que la región (D) de diversidad de emparejamiento más cercana, aunque relacionada con las secuencias de líneas germinales conocida no pudo determinarse. El símbolo (**) indica que la secuencia de la región (V) variable de línea germinal de la pareja más próxima ha sido identificada pero no denominada formalmente hasta la fecha, siendo de la familia lambda más rara.

La figura 16 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada Fab “AT” y “Y” previstas (radicales 2-127 inclusive en las figuras 9 y 10, respectivamente) con una secuencia de la línea germinal de la familia VH1. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 1-03, la secuencia de la región D 3-10 y la secuencia de la región J JH4 (SEQ ID NO: 44). FR1, FR2 y FR3 designan las tres regiones estructurales, CDR1, CDR2, y CDR3 designan las tres regiones de determinación de complementaridad, y H1, H2 y H3 designan las secuencias de unión correspondientes entre las regiones estructurales y CDRs. Las diferencias entre “AT”, “Y” y las

ES 2 307 594 T3

secuencias de línea germinal V, D o J están en negrita. El número de radicales de aminoácido de línea germinal en las figuras 16-22 es como se describe en Kabat y cols., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. U.S. Department of Health and Human Services, 4ª ed. (1991).

5 La figura 17 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada “P” previstas (radicales 2-117) inclusive en la figura 11) con una secuencia de línea germinal de la familia VH3. La secuencia comprende la secuencia de la región V 3-30 y La secuencia JH4 de la región J. La secuencia de la región D es desconocida.

10 En la figura 18 se muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada Fab “S” previstas (radicales 2-124 inclusive en la figura 12) con una secuencia de la línea germinal de la familia VH3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 3-09, la secuencia de la región D 6-19 y la secuencia de las regiones J JH4.

15 La figura 19 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab “AT” prevista (radicales 6-108 inclusive en la figura 5) con una secuencia de línea germinal de la familia Vkappa1. La secuencia de línea germinal comprende la secuencia de la región V 012 y la secuencia de la región J JK1.

20 La figura 20 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab “Y” prevista (radicales 6-108 inclusive en la figura 6) con una secuencia de la línea germinal de la familia Vkappa3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V L6 y la secuencia de la región J JK2.

25 La figura 21 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab “P” prevista (radicales 5-108 inclusive en la figura 7) con una secuencia de línea germinal de la familia Vkappa3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V A27 y la secuencia de la región J JK4.

La figura 22 muestra una comparación de una secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab “S” prevista (radicales 5-112 inclusive en la figura 8) con una secuencia de línea germinal de la familia VL3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 3m y la secuencia de la región J JL2.

30 La figura 23 muestra ensayos de células RAW de aislados “AT” 405, “AT” 406 y “AT” 407. Se fusionó ADNc que codificaba Fab “AT” con ADNc que codificaba las regiones CH1, CH2 y CH3 de IgG1 humano, tal como se describe en el ejemplo 7. Se utilizaron diferentes secuencias líder para producir los aislados resultantes designados “AT” 405, “AT” 406 y “AT” 407. Se incubaron previamente “AT” 405-407 con OPGbp durante 1 hora, a temperatura ambiente antes de la dilución hasta la concentración final de péculas por pocillo que se muestra en el gráfico. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 40 ng/ml. Los valores fueron de determinaciones por triplicado con barras de error que designaban desviaciones típicas 2 (2 STD).

40 La figura 24 muestra los ensayos de la médula ósea de “AT” 405 y “AT” 407. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de “AT” 405 y “AT” 407. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp humana [143-317] durante 1 hora a la temperatura ambiente antes de la adición a las células. La dilución de células final por pocillo para “AT” 405 y “AT” 407 desde la reserva de muestra se indica en el eje de las X. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml.

45 La figura 25 muestra un ensayo de médula ósea de “AT” 406. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de “AT” 406. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración final de células por pocillo de la muestra se indica en el eje de las x. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml.

50 La figura 26 muestra un ensayo de médula ósea de “S” 435 y “Y” 429. La construcción de “S” 435 e “Y” 429 se describen en el ejemplo 7. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada “S” 435 y “Y” 429. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición de las células. La concentración por pocillo de las células final de la muestra se indica en el eje de las x. La concentración de células por pocillo final de OPGbp fue 20 ng/ml.

55 La figura 27 presenta un ensayo de médula ósea de “Y” 442 y “P” 444. La construcción y expresión de “Y” 442 y “P” 444 se describe en el ejemplo 7. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada “Y” 442 y “P” 444. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración final de células por pocillo se muestra en el eje de las x. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml.

60 La figura 28 presenta el ácido nucleico y la secuencia de aminoácido de OPGbp/DE [153-136] FLAG-murínico.

La figura 29 es un alineamiento de secuencias de aminoácido OPGbp [143-317] humana, OPGbp murínico [158-316] y OPGbp FLAG-murínico [158-316]/DE en la región del bucle DE. Se subrayan los radicales de aminoácido de OPGbp humana introducidos en OPGbp de ratón para genera la molécula OPGbp/DE FLAG-ratón.

65 La figura 30 es un inmunoensayo de enzima en el que se examina la unión y reactividad del anticuerpo AT a placas recubiertas con OPGbp [143-317] humana, OPGbp [158-316] murínica o OPGbp [158-316]/DE FLAG- murínica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona agentes que se unen selectivamente a proteína de unión a OPG (OPGbp) que reconoce un epítipo DE en la proteína de unión a osteoprotegerina humana (OPGbp),

a) siendo el epítipo DE un epítipo que comprende una porción de la secuencia de aminoácido de una región DE de OPGbp humana desde el radical de aminoácido 212 hasta el radical de aminoácido 250 de la secuencia

GFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIP, y

b) comprendiendo el epítipo la secuencia DLATE.

Preferiblemente, los agentes son antagonistas o inhibidores de OPGbp que inhiben parcial o completamente al menos una actividad de OPGbp, como por ejemplo la unión de OPGbp a su receptor cognado, ODAR, formación y/o activación de osteoclasto o resorción ósea. En un modo de realización, el agente de unión selectivo es un anticuerpo que se une selectivamente a OPGbp, de manera que bloquea parcial o completamente la unión de OPGbp a su receptor cognado e inhibe parcial o completamente la formación de osteoclasto y/o la resorción ósea.

El término “agente de unión selectivo” se refiere a una molécula que se une preferentemente a OPGbp. Entre los agentes de unión selectivos se incluyen una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido o un compuesto de bajo peso molecular. Un agente de unión selectivo es un anticuerpo o dominio de unión a antígeno, como por ejemplo anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos CDR-injertados, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) para anticuerpos que se pueden etiquetar en forma soluble o ligada, así como fragmentos, regiones o derivados de los mismos, obtenidos a través de técnicas conocidas, entre las que se incluyen, sin limitarse sólo a ellas, segmentación enzimática, síntesis de péptido o técnicas recombinantes. Los agentes de unión selectivos anti-OPGbp de la presente invención pueden unir porciones de OPGbp que inhiben la unión de OPGbp a receptores ODAR.

Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno de la invención se unen selectivamente a OPGbp, es decir, se unen preferentemente a OPGbp con una mayor afinidad de unión con respecto a otros antígenos. Los anticuerpos se pueden unir selectivamente a OPGbp humana, pero también se unen de forma detectable a OPGbp no humana, como por ejemplo OPGbp murina. Alternativamente, los anticuerpos se pueden unir selectivamente a OPG no humana, pero también se unen detectablemente a OPG humana. Alternativamente, los anticuerpos se pueden unir de forma exclusiva a OPGbp humana, sin unión detectable a OPGbp no humana.

El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido desde una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, reconociendo el anticuerpo monoclonal típicamente un solo epítipo en el antígeno. El término “monoclonal” no está limitado a un método en particular para la obtención de un anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden obtener según el método de hibridoma descrito en Kohler y cols. Nature 256, 495 (1975) o se pueden aislar desde bibliotecas de fagos empleando las técnicas que se describen aquí, por ejemplo.

El término “dominio de unión a antígeno” o “región de unión a antígeno” se refiere a la porción de una molécula de anticuerpo que contiene los radicales de aminoácido que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad para el antígeno. Preferiblemente, la región de unión a antígeno será de origen humano. En otros modos de realización, la región de unión a antígeno puede derivarse de otras especies animales, en particular roedores como conejos, ratas o hámster.

El término “epítipo” se refiere a la porción de una molécula que puede ser reconocida y unirse al agente de unión selectivo (por ejemplo un anticuerpo) en una o más de las regiones de unión a antígeno del agente de unión. Los epítipos consisten normalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Se entiende por epítipo de “inhibición y/o neutralización” un epítipo que cuando se une mediante un agente de unión selectivo, tiene como resultado la pérdida de actividad biológica de la molécula o el organismo que contiene el epítipo, *in vivo*, *in vitro* o *in situ*, más preferiblemente *in vivo*, incluyendo la unión de OPGbp a su receptor.

El término “cadena ligera”, cuando se utiliza haciendo referencia a un anticuerpo, se refiere a dos tipos diferentes, denominados kappa (κ) o lambda (λ) en función de la secuencia de aminoácido de los dominios constantes.

El término “cadena pesada” cuando se utiliza haciendo referencia a un anticuerpo se refiere a cinco tipos distintos, denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, en función de la secuencia de aminoácido del dominio constante de cadena pesada. Estos tipos diferentes de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases diferentes de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases de IgG, en concreto IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere a una porción de las cadenas ligera y pesada, típicamente, de aproximadamente 120 a 130 aminoácidos amino-terminales en la cadena pesada y de aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, que difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en

la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en las regiones denominadas regiones de determinación de complementariedad (CDRs), mientras que las regiones muy conservadas en el dominio variable reciben el nombre de regiones estructurales (FR). Las CDR de las cadenas ligeras y pesadas son las responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno.

El término “región constante” o “dominio constante” se refiere a una porción carboxi terminal de la cadena ligera o pesada que no participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero que presenta varias funciones efectoras, como interacción con el receptor Fc.

El término “OPGbp” o “polipéptido de OPGbp” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido tal como se representa en la figura 4 de la publicación PCT WO/46757, y polipéptidos relacionados. Entre los polipéptidos relacionados se incluyen variantes alélicas; variantes de corte y empalme; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, supresión e inserción; polipéptidos de fusión y homólogos de interespecie. Asimismo, entran dentro de la definición formas solubles de OPGbp, como por ejemplo los radicales 69-317 inclusive de OPGbp humana (tal como se enumera en WO 98/46757), o un subgrupo de los mismos que es suficiente para generar una respuesta inmunológica. En un modo de realización, la OPGbp humana soluble incluye los radicales 140-317 inclusive, 143-317 inclusive, o los fragmentos inmunógenos de los mismos. OPGbp puede ser un polipéptido maduro, tal como se define aquí, y puede tener o no un radical metionina amino terminal, dependiendo del método a través del cual se prepara.

El término “fragmento”, cuando se utiliza en relación con OPGbp o un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Dicho fragmento puede producirse, por ejemplo, por truncado en el término amino, un truncado en el término carboxi, y/o una supresión interna de un radical(es) desde la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos pueden ser el resultado de corte y empalme de ARN alternativo y de la actividad *in vivo* de proteasa.

El término “variante” cuando se utiliza en relación con OPGbp o en relación con un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de secuencia de aminoácido en comparación con la secuencia nativa o sin modificar. Por ejemplo, una variante de OPGbp puede ser el resultado de uno o más cambios en la secuencia de aminoácido de la OPGbp nativa. También a modo de ejemplo, una variante de un agente de unión selectivo de OPGbp puede ser el resultado de uno o más cambios en la secuencia de aminoácido de un agente de unión selectivo nativo o sin modificar previamente. Las variantes pueden ser naturales, como por ejemplo, variantes alélicas o variantes de corte y empalme, o pueden construirse de forma artificial. Las variantes de polipéptido pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican dichas variantes.

El término “derivado” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un polipéptido o péptido, o a una variante, fragmento o derivado del mismo, que ha sido modificado químicamente. Entre los ejemplos se incluyen la unión covalente de uno o más polímeros, como por ejemplo, polímeros hidrosolubles, unidos a N, o carbohidratos unidos a O, azúcares, fosfatos, y/o otras moléculas similares. Los derivados se modifican de manera diferente a la del péptido o polipéptido natural o de partida, o bien en el tipo o bien en la localización de las moléculas unidas. Los derivados incluyen además la supresión de uno o más grupos químicos que están presentes de manera natural en el péptido o polipéptido.

El término “fusión” cuando se utiliza en relación con OPGbp o un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a la unión de un péptido o polipéptido, o fragmento, variante y/o derivado del mismo, con un péptido o polipéptido heterólogo.

El término “biológicamente activo” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteináceo se refiere a un péptido o a un polipéptido que tiene al menos una actividad característica de OPGbp o un agente de unión selectivo. El agente de unión selectivo de OPGbp puede tener una actividad agonista, antagonista, o neutralizante o de bloqueo en relación con al menos una actividad biológica de OPGbp.

El término “natural” cuando se utiliza en relación con materiales biológicos, como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped y similares, se refiere a las que se encuentran en la naturaleza y no han sido manipuladas por un ser humano.

El término “aislado” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que está libre de al menos un polipéptido contaminante que se encuentra en su entorno natural, preferiblemente sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido de mamífero contaminante que pueda interferir con su uso terapéutico o de diagnóstico.

El término “maduro” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que carece de una secuencia líder. El término puede incluir también otras modificaciones de un péptido o polipéptido como tratamiento proteolítico del término amino (con o sin una secuencia líder) y/o el término carboxi, segmentación de un polipéptido más pequeño desde un precursor mayor, glucosilación ligada a N y/o ligada a O, y similares.

Los términos “cantidad efectiva” y “cantidad terapéuticamente efectiva” cuando se utilizan en relación con un agente de unión selectivo de OPGbp se refiere a una cantidad de un agente de unión selectivo que es útil o necesaria para producir un cambio observable en el nivel de una o más de las actividades biológicas de Opgbp. Dicho cambio puede consistir o bien en un aumento o bien en una disminución del nivel de actividad de OPGbp.

El término “sustitución de aminoácido conservadora” se refiere a una sustitución de un radical de aminoácido nativo con un radical no nativo de manera que se produce un efecto pequeño o no se produce ningún efecto en la polaridad o la carga del radical aminoácido en esa posición. Por ejemplo, tiene lugar una sustitución conservadora a partir del reemplazamiento de un radical no polar en un polipéptido con cualquier otro radical no polar. Por otra parte, puede estar sustituido cualquier otro radical nativo en un polipéptido con una alanina, tal como se ha descrito anteriormente para mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham y cols. Science 244, 1081-1085 (1989). En la tabla I se exponen reglas ilustrativas de sustituciones de aminoácido conservadoras.

TABLA I

Sustituciones de aminoácido conservadoras

Radicales originales	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferibles
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Las sustituciones de aminoácido conservadoras también abarcan radicales de aminoácido naturales que se incorporan típicamente a través de síntesis de péptido química en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Incluyen péptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de fracciones de aminoácido.

Las modificaciones conservadoras de la secuencia de aminoácido (y las modificaciones correspondientes para los nucleótidos de codificación) pueden producir polipéptidos OPGbp (y agentes de unión selectivos proteínaceos de los mismos) que tienen características funcionales y químicas similares a las de las OPGbp o los agentes de unión selectivos naturales. En contraste, se pueden conseguir sustanciales modificaciones en las características funcionales y/o químicas de OPGbp (y agentes de unión selectivos proteínaceos de las mismas) seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal molecular en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los radicales naturales pueden dividirse en grupos dependiendo de las propiedades de la cadena lateral común:

1) *Hidrofóbicos*: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) *Hidrofílicos neutros*: Cys, Ser, Thr;

3) *Ácidos*: Asp, Glu;

4) *Básicos*: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

5) *Radicales que influyen en la orientación de cadena*: Gly, Pro, y

6) *Aromáticos*: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

La “identidad o similitud” de dos o más moléculas y/o polipéptidos de ácido nucleico proporciona una medida de parentesco de dos o más secuencias diferentes. El término “identidad” se refiere a aminoácidos que son idénticos en las posiciones correspondientes en dos secuencias de aminoácido diferentes. El término “similitud” se refiere a aminoácidos que o bien son idénticos o bien son sustituciones conservadoras, tal como se ha definido anteriormente, en las posiciones correspondientes en dos secuencias de aminoácido diferentes.

Este grado de identidad o similitud puede calcularse fácilmente a través de métodos conocidos, entre los que se incluyen sin limitarse sólo a los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G. eds. Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; and Carillo y cols., *SIAM J. Applied Math.*, 48, 1073 (1988).

Los métodos preferibles para determinar la identidad y/o similitud están diseñados para dar la pareja más grande entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en los programas informáticos disponibles públicamente. Entre los ejemplos de métodos de programación informáticos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias se incluyen, sin limitarse sólo a ellos, el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux y cols., *Nucleic Acids Research* 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y cols., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). El programa BLAST está públicamente disponible del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (*BLAST Manual*, Altschul y cols., NCB NLM Bethesda, MD). Se puede utilizar también el conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

Polipéptidos OPGbp

Los polipéptidos OPGbp, y fragmentos, variantes y derivados de los mismos, se utilizan como moléculas diana para la detección selectiva y la identificación de los agentes de unión selectivos de la invención. Cuando es deseable preparar anticuerpos como agentes de unión selectivos, preferiblemente, los polipéptidos de OPGbp son inmunogénicos, es decir, provocan una respuesta inmune cuando se administran a un animal. Alternativamente, cuando se preparan anticuerpos a través de técnicas *in vitro*, los polipéptidos OPGbp utilizados como moléculas diana son capaces unirse detectablemente a un anticuerpo o dominio de unión a antígeno.

Los polipéptidos OPG se preparan a través de métodos químicos y biológicos. Los métodos biológicos, como expresión de secuencias de ADN que codifican OPGbp recombinante son conocidas en la especialidad (ver por ejemplo Sambrook y cols., *supra*). Los métodos de síntesis químicos, como los que se exponen en Merrifield y cols., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 (1963), Houghten y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82:5132 (1985), y Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) pueden utilizarse también para preparar

los polipéptidos OPGbp de la invención. Dichos polipéptidos pueden sintetizarse con o sin metionina en el término amino. Los polipéptidos OPGbp sintetizados químicamente, o fragmentos o variantes de los mismos, pueden oxidarse aplicando los métodos expuestos en los documentos de referencia para formar puentes de disulfuro. Los polipéptidos OPGbp de la invención preparados a través de la síntesis química tendrán al menos una actividad biológica comparable con los polipéptidos OPGbp correspondientes producidos a través de métodos recombinantes o purificados desde fuentes naturales.

Los polipéptidos OPGbp pueden obtenerse por aislamiento desde muestras biológicas como por ejemplo tejidos y/o fluidos de origen en los que se encuentran los polipéptidos de OPGbp de forma natural. Las fuentes para los polipéptidos de OPGbp pueden ser de origen humano o no humano. El aislamiento de los polipéptidos de OPGbp naturales puede llevarse a cabo aplicando los métodos conocidos en la especialidad, como separación por electroforesis seguido de electroelución, diversos tipos de cromatografía (afinidad, inmutafinidad, tamices moleculares, y/o intercambio de iones), y/o cromatografía de líquidos a alta presión. La presencia del polipéptido de OPGbp durante la purificación puede vigilarse utilizando, por ejemplo, un anticuerpo preparado contra polipéptido de OPGbp producido por recombinación, o fragmentos de péptido del mismo. Entre los ejemplos de polipéptidos se incluyen polipéptidos de OPGbp aislados y polipéptidos relacionados con los mismos, incluyendo fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión y derivados, tal como se han definido antes. Los fragmentos de OPGbp de la invención pueden ser el resultado de truncados en el término amino (con o sin una secuencia líder), truncados en el término carboxi y/o supresiones internas en el polipéptido. Dichos fragmentos de polipéptido de OPGbp pueden comprender opcionalmente un radical metionina en el terminal amino. Los polipéptidos de la invención serán inmunogénicos en el sentido de que serán capaces de provocar una respuesta de anticuerpo. Entre los ejemplos de variantes de polipéptido de OPGbp de la invención se incluyen una o más sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácido, en comparación con la secuencia de aminoácido OPGbp nativa. Las sustituciones de aminoácido pueden ser conservadoras, tal como se ha definido antes, o no conservadoras o una combinación de las mismas. Las variantes pueden tener adiciones de radicales de aminoácido o bien en el término carboxi o bien en el término amino (pudiendo comprender o no el término amino una secuencia líder), incluyendo también variantes de glucosilación de OPGbp y variantes de cisteína. Entre las variantes de glucosilación de OPGbp se incluyen variantes en las que el número y/o tipo de sitios de glucosilación ha sido alterado en comparación con un polipéptido OPGbp. En un modo de realización, las variantes de glucosilación OPGbp comprenden un número mayor o menor de sitios de glucosilación unidos en N en comparación con OPGbp nativo. Se proporcionan también variantes de glucosilación de OPGbp que comprenden un reordenamiento de cadenas de carbohidrato unidas en N en las que se eliminan uno o más sitios del glucosilación ligados en N (típicamente los que se dan de forma natural) y se crea uno más nuevos sitios ligados en N. Las variantes de cisteína de OPGbp comprenden un mayor número o alternativamente un menor número de radicales de cisteína en comparación con OPGbp nativa. En un modo de realización, se suprimen o se sustituyen con otro aminoácido uno o más radicales de cisteína (v.g., serina). Las variantes de cisteína de OPGbp pueden mejorar la recuperación de la OPGbp biológicamente activa favoreciendo replegamiento de OPGbp en una conformación biológicamente activa tras el aislamiento desde un estado desnaturalizado.

La preparación de variantes de polipéptido de OPGbp se encuentra dentro del nivel de especialización en este campo. En uno de los métodos, se puede introducir una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácido en OPGbp nativo, reteniendo la variante OPGbp la estructura nativa de OPGbp y/o al menos una de las actividades biológicas. Uno de los métodos consiste en comparar secuencias de polipéptidos de OPG a partir de una variedad de diferentes especies con el fin de identificar regiones de identidad y/o similitud relativamente alta y baja. Puede apreciarse que las regiones de un polipéptido OPGbp que tienen una identidad y/o similitud relativamente baja tienen menor probabilidad de ser esenciales para la estructura y actividad y por tanto pueden ser más tolerantes para alteraciones de aminoácido, especialmente, las que no son conservadoras. Debe apreciarse asimismo que incluso en regiones relativamente conservadas, se pueden introducir sustituciones de aminoácido conservadoras al mismo tiempo que se retiene la actividad.

En otro modo de realización, se pueden utilizar las relaciones estructura-función para identificar radicales en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. Por ejemplo, se pueden comparar los radicales de aminoácido conservados entre OPGbp y otros miembros de la familia de factor de necrosis de tumor para los cuales están disponibles análisis de estructura-función y, en función de dicha comparación, predecir qué radicales de aminoácido en OPGbp son importantes para la actividad o la estructura. Las personas especializadas en la técnica podrán elegir sustituciones de aminoácido similares químicamente para dichos radicales de aminoácido importantes de OPGbp previstos.

En otro método más, se puede adoptar un análisis de una estructura secundaria o terciaria de OPGbp (ya se determine por difracción de rayos x de cristales de OPGbp o por métodos de predicción de estructura) para determinar la localización de radicales de aminoácido específicos en relación con estructuras reales o predichas dentro de un polipéptido OPGbp. Empleando esta información, se pueden introducir cambios de aminoácido de un modo que busque retener lo más posible la estructura secundaria y/o terciaria de un polipéptido de OPGbp.

En otro método más, se pueden analizar los efectos de la alteración de aminoácidos en posiciones específicas de forma experimental introduciendo sustituciones de aminoácido y analizando los polipéptidos de OPGbp alterados para determinar la actividad biológica utilizando los ensayos aquí descritos. Son particularmente adecuadas técnicas como la mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham y cols., *supra*) para este método. Se pueden analizar convenientemente muchas secuencias alteradas introduciendo muchas sustituciones en diversas posiciones de aminoácido en la OPGbp y realizando la detección selectiva de la población de polipéptidos alterados como parte de la biblioteca

de despliegue en fagos. Utilizando este método, se pueden determinar fácilmente las regiones de un polipéptido de OPGbp que son esenciales para la actividad.

Los métodos mencionados son útiles para generar variantes de OPGbp que retienen la estructura nativa. Por consiguiente, los anticuerpos producidos contra estas variantes tienen probabilidad de reconocer un determinante estructural nativo, o epítipo, de OPGbp y también tienen probabilidad de unirse a OPGbp nativa. No obstante, en algunos casos, puede ser deseable producir variantes de OPGbp que no retienen la estructura de OPGbp nativa o que quedan sin rellenar parcial o completamente. Los anticuerpos producidos contra dichas proteínas reconocerán epítopos enterrados en OPGbp.

La invención ilustra también polipéptidos de fusión de OPGbp que comprenden polipéptidos de OPGbp, y fragmentos, variantes y derivados de los mismos, fusionados con una proteína o péptido heterólogo. Las proteínas y péptidos heterólogos incluyen, sin limitarse sólo a ellos, un epítipo que permite la detección y/o aislamiento de un polipéptido de fusión de OPGbp; una proteína de receptor de membrana o una porción del mismo, como por ejemplo un dominio extracelular, o una membrana y un dominio intracelular; un ligando o una porción del mismo que se une a una proteína de receptor de membrana; una enzima o una porción de la misma que es catalíticamente activa; una proteína o péptido que promueve la oligomerización, como un dominio de cremallera de leucina; y una proteína o péptido que aumenta la estabilidad, como por ejemplo una región constante de inmunoglobulina. Se puede fusionar un polipéptido de OPGbp consigo mismo o con un fragmento, variante o derivado del mismo. Las fusiones pueden realizarse o bien en el término amino o bien en el término carboxi de un polipéptido de OPGbp, y pueden ser directas sin molécula ligadora o adaptadora. Puede designarse una molécula ligadora o adaptadora también con un sitio de segmentación para una endonucleasa de restricción de ADN o para una proteasa para permitir la separación de las fracciones fundidas.

Se puede fusionar un polipéptido de OPGbp, fragmento, variante y/o derivado del mismo con una región Fc de IgG humana. En un ejemplo, se puede fusionar una región CH2, CH3 y bisagra de IgG humana tanto en el término N como en el término C de los polipéptidos OPGbp aplicando los métodos conocidos entre las personas especializadas en la técnica. En otro ejemplo, se puede fusionar una porción de una región bisagra y regiones CH2 y CH3. El polipéptido de fusión Fc OPGbp así producido puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A. Por otra parte, se ha observado que los péptidos y proteínas fusionadas con una región Fc presentan una duración media sustancialmente mayor *in vivo* en relación con su contrapartida sin fusionar. Asimismo, una fusión con la región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc natural, o puede alterarse para mejorar determinadas calidades, como por ejemplo calidades terapéuticas, tiempo de circulación, reducir la agregación, etc.

Los polipéptidos de OPGbp quedan ilustrados en la presente invención. Dichos derivados son composiciones de polipéptido OPGbp modificados químicamente en los que el polipéptido OPGbp está unido a un polímero. El polímero seleccionado es típicamente hidrosoluble, de manera que la proteína a la que se une no precipita en un entorno acuoso, como es el entorno fisiológico. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o sin ramificar. Se incluyen dentro del alcance de los polímeros de polipéptido de OPGbp una mezcla de polímeros. Preferiblemente, para el uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

El polímero hidrosoluble o mezcla de ellos puede consistir por ejemplo en polietilén glicol (PEG), monometoxipolietilén glicol, dextrano (como por ejemplo dextrano de bajo peso molecular, por ejemplo de aproximadamente 6 kD), celulosa, y otros polímeros a base de carbohidratos, poli(N-vinil pirrolidona), polietilén glicol, homopolímeros de propilén glicol, un co-polímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polialcoholes etilados (v.g., glicerol) y un polialcohol vinílico.

Un polímero hidrosoluble preferible es polietilén glicol. Tal como se utiliza aquí, se pretende que polietilén glicol abarque cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para formar derivados de otras proteínas, como por ejemplo mono- (C₁-C₁₀) alcoxi, o ariloxi-polietilén glicol. La presente invención abarca asimismo moléculas de reticulación de PEG bifuncionales que se pueden utilizar para preparar multímeros de OPGbp unidos covalentemente.

Los métodos para preparar polipéptidos de OPGbp formados por derivación química son conocidos dentro de la especialidad. A modo de ejemplo, la formación de derivados de polipéptidos de OPGbp con PEG puede llevarse a cabo utilizando los procedimientos descritos en Francis y cols., *Focus on Growth Factors*, 3, 4-10 (1992); EP 0.154.316; EP 0.401.384; y patente EE.UU. N° 4.179.337. En un modo de realización preferible, un derivado de polipéptido de OPGbp tendrá una sola fracción PEG en el término amino. Ver la patente EE.UU. N° 5.234.784.

Los derivados de polipéptido de OPGbp descritos en el presente documento pueden presentar una potenciación o reducción de al menos una actividad biológica de OPGbp en comparación con un polipéptido sin modificar, o pueden presentar una mayor o menor duración media o estabilidad.

65 Agentes de unión selectivos de OPGbp

Los polipéptidos de OPGbp, y los fragmentos, variantes y derivados de los mismos, se pueden utilizar para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp. Tal como se ha definido antes, un agente de unión selectivo de OPGbp

abarca agentes de unión tanto proteináceos como no-proteináceos, y en un modo de realización preferible de la presente invención, el agente de unión selectivo es proteináceo. En otro modo de realización preferible, el agente de unión selectivo es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OPGbp, preferiblemente OPGbp humana. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos agonistas, que potencian el nivel de al menos una actividad biológica de OPGbp; o anticuerpos antagonistas, que disminuyen el nivel de al menos una actividad biológica de OPGbp. Los anticuerpos antagonistas de OPGbp pueden recibir el nombre también de anticuerpos de inhibición o neutralizantes de OPGbp. Si bien dichos anticuerpos son modos de realización preferibles de la presente invención, se entiende que quedan abarcados otros agentes de unión selectivos proteináceos que son agonistas o antagonistas de la actividad de OPGbp según la invención.

Tal como se describe en los ejemplos a continuación, se han identificado anticuerpos y los dominios de unión a antígeno de OPGbp, que inhiben al menos una actividad de OPGbp según se expone en la reivindicación 1. Los modos de realización de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia Fab de cadena pesada, tal como se muestra en cualquiera de las figuras 9, 10, 11 o 12 y que comprenden además una secuencia de cadena ligera kappa o lambda. Las secuencias Fab de cadena ligera pueden ser tal como se representa en las figuras 5, 6, 7, u 8. Por ejemplo, el anticuerpo "AT" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 5 y 9, respectivamente; el anticuerpo "Y" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 6 y 10, respectivamente; el anticuerpo "S" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 7 y 11, respectivamente; y el anticuerpo "P" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 8 y 12, respectivamente. Los anticuerpos de la invención comprenden además una región Fc humana a partir de un cualquier isotipo, ya sea IgG, IgM, IgA, IgE o IgD. Preferiblemente, la región Fc es de IgG humano, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

La invención proporciona asimismo anticuerpos y dominios de unión a antígeno, tal como se define en la reivindicación 1, que comprenden fragmentos, variantes, o derivados de la secuencia Fab aquí descrita. Los fragmentos incluyen dominios variables de secuencias Fab de cadena tanto ligera como pesada que se unen típicamente con dominios constantes ligero y pesado. Las variantes incluyen anticuerpos que comprenden secuencias Fab de cadena ligera que son idénticos o similares en al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, a las secuencias Fab o los dominios variables correspondientes, en cualquiera de las figuras 5-8, o anticuerpos que comprenden secuencias Fab de cadena pesada, o los dominios variables correspondientes que son idénticos o similares en al menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a las secuencias Fab en cualquiera de las figuras 9 a 12. Los anticuerpos pueden asociarse típicamente con regiones constantes de las cadenas pesada y ligera para formar anticuerpos de longitud completa.

Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno, y los fragmentos, variantes y derivados de los mismos, según la invención, tal como se definen en la reivindicación 1, retendrán la capacidad para unirse selectivamente a un polipéptido de OPGbp, preferiblemente a un polipéptido de OPGbp humana. En un modo de realización, un anticuerpo se unirá a un polipéptido de OPGbp con una constante de disociación (KD) de aproximadamente 1 nM o menos, o alternativamente 0,1 nM o menos, o alternativamente 10 pM o menos o alternativamente menos de 10 pM. En el ejemplo 8, se observó que el anticuerpo "AT" se une a OPGbp con un KD de aproximadamente 0,33 a 0,43 nM.

Entre los anticuerpos de la invención se incluyen anticuerpos biespecíficos y/o de cadena única, humanos completamente, humanizados, quiméricos, recombinantes, monoclonales, policlonales monoespecíficos policlonales. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen las porciones de un anticuerpo anti-OPGbp que se unen a un epítipo en un polipéptido OPGbp. Entre los ejemplos de dichos fragmentos se incluyen fragmentos Fab F(ab'), F(ab)'', Fv, sFv. Los anticuerpos pueden generarse por segmentación enzimática de anticuerpos de longitud completa o a través de técnicas de ADN recombinante, como expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de anticuerpo.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados con un antígeno. Un antígeno es una molécula o una porción de una molécula que es capaz de unirse mediante un anticuerpo que es capaz adicionalmente de inducir a un animal a producir anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos. Se pretende que la reacción específica antes referida indique que el antígeno reacciona, de una manera altamente selectiva, con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos.

Los anticuerpos policlonales dirigidos hacia un polipéptido de OPGbp son producidos generalmente en animales (v.g., conejos o ratones) a través de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de OPGbp y un adyuvante. De acuerdo con la invención, puede ser útil conjugar un polipéptido de OPGbp, o una variante, fragmento de derivado del mismo con una proteína vehículo que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, como por ejemplo hemocianina de lapa californiana, suero, albúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja. Asimismo, se utilizan agentes de agregación como alum para mejorar la respuesta inmune. Tras la inmunización, se sangra a los animales y se realiza el ensayo del suero para determinar la valoración de anticuerpo anti-OPGbp.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) contienen una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, conteniendo dicha población sitios de unión a epítipo sustancialmente similares. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. Se puede cultivar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*. La producción de valoraciones más altas *in vivo* o *in situ* es un método de producción preferible.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia OPGbp se producen aplicando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas de células continuas en cultivo. Entre los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales se incluyen métodos de hibridoma de Kohler y cols., *Nature*, 256, 495-497 (1975), y el método de hibridoma de células B humanas, Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001 (1984); Brodeur y cols., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Entre los agentes de unión selectivos anti-OPGbp preferibles se incluyen anticuerpos monoclonales que inhiben parcial o completamente la unión de OPGbp humana con su receptor cognado, ODAR, o un anticuerpo que tiene sustancialmente las mismas características de unión específicas, así como fragmentos y regiones de los mismos. Los métodos preferibles para determinar especificidad y afinidad de anticuerpo monoclonal a través de inhibición competitiva pueden encontrarse en Harlow y cols. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Colligan y cols., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.*, 92: 589-601 (1983).

La presente invención proporciona también líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales que son reactivos con polipéptidos de OPGbp.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas en las que varias porciones diferentes se derivan de diferentes especies animales, como por ejemplo las que tienen una región variable derivada de anticuerpo monoclonal murínico y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos se utilizan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos de producción, por ejemplo, cuando los anticuerpos monoclonales murínicos tienen unos rendimientos más altos desde hibridomas pero una mayor inmunogenicidad en seres humanos, como por ejemplo humana/murínica, se utilizan anticuerpos monoclonales quiméricos.

Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos dentro de la especialidad. Cabilly y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81: 3273-3277 (1984); Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6855 (1984); Boulianne y cols., *Nature*, 312: 643-646 (1984); Neuberger y cols., *Nature*, 314: 268-270 (1985); Liu y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84: 3439-3443 (1987); y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Por ejemplo, se pueden utilizar los anticuerpos monoclonales quiméricos de la invención como agente terapéutico. En dicho anticuerpo quimérico, una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a la secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpos en particular, al mismo tiempo que el resto de la cadena(s) es idéntico u homólogo a la secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (ver la patente EE.UU. N° 4.816.567; Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 6851-6855 (1985).

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada a través de puentes de disulfuro con una cadena L quimérica. El anticuerpo quimérico divalente es tetrámero (H₂L₂) formado por dos dímeros HL asociados a través de al menos un puente de disulfuro. Puede producirse también un anticuerpo quimérico polivalente, por ejemplo, empleando una región C_H que se agrega (v.g., desde una cadena H de IgM o una cadena μ).

Los anticuerpos murínicos y quiméricos, fragmentos y regiones de la presente invención pueden comprender cadenas de inmunoglobulina Ligeras (L) y/o pesadas (H) individuales. Una cadena H quimérica comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena H de un anticuerpo no humano específico para OPGbp, que está unido a al menos una porción de una región C de cadena H humana (C_H), como por ejemplo CH₁ o CH₂.

Una cadena L quimérica según la presente invención comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico para OPGbp, unido a al menos una porción de una región C de cadena L humana (C_L).

Los agentes de unión selectivos, como por ejemplo anticuerpos, fragmentos, o derivados, que tienen cadenas H y cadenas L quiméricas de la misma o diferentes especificidad de unión a región variable, pueden prepararse también a través de la asociación apropiada de cadenas de polipéptido individuales, con arreglo a etapas de método conocidas, v.g., con arreglo a Ausubel, y cols., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, N.Y. (1993), y Harlow y cols., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

Con este método, se cultivan por separado huéspedes que expresan cadenas H quiméricas (o sus derivados) de huéspedes que expresan cadenas L quiméricas (o sus derivados), y se recuperan por separado las cadenas de inmunoglobulina y después se asocian. Alternativamente, se pueden co-cultivar los huéspedes y dejar asociar las cadenas espontáneamente en el medio de cultivo, seguido de la recuperación de la inmunoglobulina ensamblada, fragmento o derivado.

A modo de ejemplo, es preferible que la región de unión a antígeno del agente de unión selectivo (por ejemplo un anticuerpo quimérico) de la presente invención se derive de un anticuerpo no humano específico para OPGbp humana. Las fuentes preferibles para ADN que codifica dicho anticuerpo no humano incluyen líneas celulares que producen anticuerpos, como por ejemplo líneas celulares de híbrido conocidas comúnmente como hibridomas.

La invención proporciona también fragmentos, variantes y derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp, habiéndose definido en el presente documento los términos “fragmentos”, “variantes”, “derivados” y “fusiones”. La invención abarca fragmentos, variantes, derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp que son funcionalmente similares a los anticuerpos anti-OPGbp sin modificar, es decir, que retienen al menos una de las actividades del anticuerpo sin modificar. Además de las modificaciones que se han indicado, también se incluye la adición de secuencias genéticas que codifican proteínas citotóxicas, como toxinas vegetales y bacterianas. Los fragmentos, variantes, derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp pueden producirse a través de cualquiera de los huéspedes de la presente invención.

Entre los fragmentos adecuados se incluye por ejemplo Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, desaparecen más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión de tejido no específico que un anticuerpo intacto. Ver Wahl y cols., *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983). Estos fragmentos se producen desde anticuerpos intactos empleando métodos conocidos en la especialidad, como por ejemplo segmentación proteolítica con enzimas como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). La identificación de estas regiones y/o epítomos de unión a antígeno reconocidas por anticuerpos monoclonales de la presente invención proporciona la información necesaria para generar anticuerpos monoclonales adicionales con características de unión similares y utilidad de diagnóstico y terapéutica que tienen parangón con los modos de realización de esta solicitud.

La invención proporciona anticuerpos o dominios de unión a antígeno anti-OPGbp, que reconocen y se unen para inhibir y/o neutralizar epítomos en OpGbp (ver reivindicación 1). Como resultado de esta unión, un anticuerpo anti-OPGbp puede inhibir parcial o completamente la unión de OPGbp a su receptor o pueden inhibir parcial o completamente la formación de osteoclasto, la resorción ósea y/o la pérdida de hueso. Más en particular, la invención proporciona anticuerpos anti-OPGbp que reconocen y se unen a un epítomo que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos de la región DE de OPGbp (un “epítomo DE”) (ver reivindicación 1). Una región DE de OPGbp se extiende por aproximadamente las regiones de lámina D y E beta y la secuencia bucle que interviene (un “bucle DE”). La región DE en OPGbp humana comprende desde aproximadamente el radical de aminoácido 212 hasta aproximadamente el radical de aminoácido 250 inclusive (ver figura 29). No obstante, la secuencia de aminoácidos y los extremos de la región DE de OPGbp humana son meramente ilustrativos, entendiéndose que las regiones DE pueden tener secuencias y extremos que varían de los de OPGbp humana. La invención abarca anticuerpos que se unen a dichas regiones DE variables.

El anticuerpo anti-OpGbp o dominio de unión a antígeno, pueden unirse en cualquier localización dentro de la región DE. Un modo de realización preferible es un anticuerpo anti-OPGbp que se une a al menos una parte del bucle DE. El bucle DE en OPGbp humana se extiende aproximadamente cinco aminoácidos y está localizado aproximadamente en los radicales 230 a 234, inclusive. El bucle DE en OPGbp humana tiene la secuencia DLATE. No obstante, la secuencia de aminoácidos y los extremos del bucle DE de OPGbp humana son meramente ilustrativos entendiéndose que los bucles DE podrían tener secuencias y extremos que varían de los de OPGbp humana. La invención abarca anticuerpos que se unen a dichos bucles DE variables.

Tal como se muestra en la figura 10, la introducción de la secuencia DLATE en el bucle DE correspondiente de OPGbp murínica tuvo como resultado la unión de anticuerpo “AT”, mientras que el anticuerpo no tuvo afinidad detectable para OPGbp murínica con la secuencia de bucle DE nativa hasta una concentración de anticuerpo de aproximadamente 2 µg/ml. En otro modo de realización, el anticuerpo anti-OPGbp se une a la secuencia de aminoácidos DLATE en OPGbp humana, o a una porción de dicha secuencia. En otro modo de realización, un anticuerpo anti-OPGbp, o dominio de unión a antígeno, se une a OPGbp murínico que comprende las sustituciones de aminoácido S229D, V230L, P231A y D233E, pero no se une a OPGbp murínico que carece de dichas sustituciones en condiciones similares.

Si bien los anticuerpos de la invención se caracterizan en parte por las secuencias de aminoácido en OPGbp a las que se unen, las personas especializadas en la técnica entenderán y apreciarán que un epítomo DE en OPGbp reconocido por un anticuerpo comprende típicamente una estructura tridimensional que puede implicar aminoácidos fuera de la región DE. En una representación lineal de una secuencia OPGbp, los aminoácidos que comprenden el epítomo DE pueden estar distantes de la región DE; pero en una estructura tridimensional de OPGbp, los aminoácidos del epítomo DE estarán probablemente en proximidad con la región DE. Por lo tanto, debe entenderse que la unión de un anticuerpo anti-OPGbp con un epítomo DE puede implicar aminoácidos distintos a los de la región DE. No obstante, se ha demostrado que los radicales de aminoácido en el bucle DE, especialmente algunos o todos los radicales de la secuencia DLATE, participan en la unión de anticuerpos a OPGbp y la inhibición de la actividad de OPGbp.

Se proporcionan también las variantes de agentes de unión selectivos. En un modo de realización, las variantes de anticuerpos y dominios de unión a antígeno comprenden cambios en las secuencias de aminoácido de cadena ligera y/o pesada que son naturales o que se introducen por ingeniería *in vitro* de secuencias nativas utilizando técnicas de ADN recombinante. Las variantes naturales incluyen variantes “somáticas” que se generan *in vivo* en las secuencias

de nucleótido de línea germinal correspondiente durante la generación de una respuesta de anticuerpo a un antígeno extraño. Las variantes codificadas por mutaciones somáticas en secuencias de cadena ligera y pesada variables de línea germinal que generan los ejemplos de Fab de la presente invención en las secuencias se muestran en la figuras 16 y 19 para Fab "AT" Figuras 16 y 20 para Fab "Y", figuras 17 y 21 para Fab "P" y figuras 18 y 22 para Fab "S".

Las variantes para anticuerpos y dominios de unión a antígeno anti-OPGbp también se preparan por técnicas de mutagénesis conocidas en la especialidad. En un ejemplo, se puede introducir cambios de aminoácido aleatoriamente en toda la región de codificación de anticuerpo y se puede realizar la detección selectiva de las variantes resultantes para determinar la actividad deseada, como por ejemplo afinidad de unión para OPGbp. Alternativamente, se pueden introducir cambios de aminoácido en regiones seleccionadas de anticuerpo OPGbp, como por ejemplo CDRs de cadena ligera y/o pesada, y regiones estructurales, y se puede realizar la detección selectiva de los anticuerpos resultantes para determinar la unión a OPGbp o alguna otra actividad. Los cambios de aminoácido abarcan una o más sustituciones de aminoácido en una CDR, que abarcan desde una sola diferencia de aminoácido y la introducción de todas las permutaciones posibles de aminoácidos dentro de una CDR dada, como CDR3. En otro método, la contribución de cada uno de los radicales dentro de una CDR a la unión de OPGbp puede valorarse sustituyendo al menos un radical dentro de la CDR con alanina (Lewis y cols., Mol. Immunol. 32, 1065-1072 (1995)). Los radicales que no son óptimos para la unión con OPGbp pueden cambiarse después con el fin de determinar la secuencia más óptima. También quedan abarcadas las variantes generadas por inserción de aminoácidos para aumentar el tamaño de una CDR, como por ejemplo CDR3. Por ejemplo, la mayoría de las secuencias CDR3 de cadena ligera son de 9 aminoácidos de longitud. Las secuencias CDR3 de cadena ligera en un anticuerpo que tienen una longitud inferior a nueve radicales pueden optimizarse para la unión con OPGbp a través de la inserción de aminoácidos apropiados para aumentar la longitud de la CDR.

En un modo de realización, las variantes de anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprenden uno o más cambios de aminoácido en una o más de las CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada o ligera y, opcionalmente, una o más de las regiones estructurales FR1, FR2 o FR3 de cadena pesada o ligera.

Los cambios de aminoácido comprenden sustituciones, supresiones y/o inserciones de radicales de aminoácido. Entre los ejemplos de variantes se incluye una variante de la región variable de cadena pesada de "AT" con uno o más cambios de aminoácido en la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13); WINAGNGNTIKFSQKFQF (SEQ ID NO: 16); o DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19), o una variante de la región variable de cadena ligera de "AT" con uno o más cambios de aminoácido en las secuencias RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01); GASSLQS (SEQ ID NO: 05); o QHTRA (SEQ ID NO: 09). Las variantes de la región variable de cadena pesada y ligera de "AT" que se han mencionado comprenden además uno o más cambios de aminoácido en las regiones estructurales. En un ejemplo, se pueden introducir uno o más cambios de aminoácido para sustituir un radical estructural mutado somáticamente con el radical de línea germinal en esa posición. Cuando los cambios de aminoácido mencionados son sustituciones, los cambios pueden consistir en sustituciones conservadoras o no conservadoras.

Los ejemplos 11 y 12 proporcionan variantes de la región CDR3 de cadena ligera y pesada del anticuerpo AT. En un modo de realización, la invención proporciona variantes tanto en la SEQ ID NO: 19 (CDR3 de cadena pesada) como en la SEQ ID NO: 9 (CDR3 de cadena ligera), de manera que los anticuerpos o dominios de unión a antígeno resultantes se unen selectivamente a una proteína de unión OPG. En un modo de realización, la OPGbp es OPGbp humana.

La invención proporciona anticuerpos anti-OPGbp, tal como se definen en la reivindicación 1, que pueden comprender cadenas pesadas variables y ligeras variables y que pueden comprender además una región CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

XSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 80);

DXSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 81);

DSXNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 82);

DSSXMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 83);

DSSNXVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 84);

DSSNMXRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 85);

DSSNMVXGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 86);

DSSNMVRXIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 87);

ES 2 307 594 T3

DSSNMVRGXIIAYYFDY (SEQ ID NO: 88);

DSSNMVRGIXIAYYFDY (SEQ ID NO: 89);

5 DSSNMVRGIIIXAYYFDY (SEQ ID NO: 90);

DSSNMVRGIIIXYYFDY (SEQ ID NO: 91);

10 DSSNMVRGIIIAXYFDY (SEQ ID NO: 92);

DSSNMVRGIIIAYXFDY (SEQ ID NO: 93);

15 DSSNMVRGIIIAYYXDY (SEQ ID NO: 94);

DSSNXVRGIIIAYYFX Y (SEQ ID NO: 95); y

20 DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 96);

pudiendo ser X el radical aminoácido que es diferente del radical de aminoácido normalmente residente en esa posición, y uniéndose selectivamente el anticuerpo resultante a una OPGbp.

25 La invención proporciona también anticuerpos anti-OPGbp tal como se han definido en la reivindicación 1, que pueden comprender cadenas pesadas variables y ligeras variables y que pueden comprender además una secuencia CDR3 de cadena ligera que ha sido aumentada desde cinco aminoácidos hasta nueve aminoácidos. Más en particular, la secuencia CDR3 de cadena ligera puede seleccionarse del grupo que consiste en:

30 QHTXXXXRA (SEQ ID NO: 97)

representando la primera aparición de X desde la izquierda a la derecha cualquier radical aminoácido distinto a arginina, representando la segunda, tercera y cuarta aparición de X cualquier radical aminoácido, pero preferiblemente alanina, y uniéndose selectivamente el anticuerpo resultante a una OPGbp. En otro modo de realización de la invención, puede seleccionarse una secuencia CDR de cadena ligera del grupo que consiste en:

35 QHTXAAARA (SEQ ID NO: 98)

40 siendo X cualquier radical aminoácido distinto a arginina.

En otro modo de realización, las variantes de anticuerpo de la invención pueden comprender cadenas V_L que tienen una secuencia CDR1 como en SEQ ID NO: 1 y una secuencia CDR2 como en SEQ ID NO: 5, y pueden comprender cadenas V_H que tienen cadenas V_H que tienen una secuencia CDR1 como en SEQ ID NO: 13 y una secuencia CDR2 como en SEQ ID NO: 16. En otro modo de realización, las variantes de anticuerpo pueden comprender una cadena V_L desde el anticuerpo "AT" con las variantes CDR3 de cadena ligera antes mencionadas y una cadena V_H desde el anticuerpo "AT" con las variantes CDR3 de cadena pesada antes mencionadas. Pueden prepararse variantes también "revolviendo la cadena" tanto de cadenas ligeras como pesadas (Marks y cols., *Biotechnology* 10, 779-783 (1992)). Típicamente, se combina una sola cadena ligera (o pesada) con una biblioteca que tiene un repertorio de cadenas pesadas (o ligeras) y se realiza la detección selectiva de la población resultante para una actividad deseada, como por ejemplo la unión a OPGbp. Esta técnica permite la detección selectiva de una muestra más grande de diferentes cadenas pesadas (o ligeras) en combinación con una sola cadena ligera (o pesada) con respecto a lo que es posible con bibliotecas que comprenden repertorios tanto de cadenas pesadas como ligeras.

55 Los agentes de unión selectivos de la invención pueden ser biespecíficos. Los agentes de unión selectivos biespecíficos de la presente invención pueden tener varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se parecen a anticuerpos simples (o fragmentos de anticuerpo) pero tienen dos sitios de unión de antígeno diferentes (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir a través de técnicas químicas (ver v.g., Kranz y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:5807 (1981), a través de técnicas de "polidoma" (ver patente EE.UU. N° 4.474.893 para Reading) o a través de técnicas de ADN recombinante.

60 Los agentes de unión selectivos de la invención también pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos consisten en dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión a anticuerpo (Fab) unidos en combinación, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

65 La invención se refiere también a anticuerpos "humanizados". Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos dentro de la especialidad. Generalmente, un anticuerpo humanizado lleva uno o más radicales de aminoácido introducidos en un anticuerpo humano desde una fuente que es no humana. En general, los radicales

no humanos estarán presentes en CDRs. La humanización puede llevarse a cabo siguiendo métodos conocidos dentro de la especialidad (Jones y cols., *Nature*, 321, 522-525 (1986); Riechmann y cols., *Nature*, 332, 323-327 (1988); Verhoeven y cols., *Science* 239, 1534-1536 (1988)), por sustitución de regiones determinantes de complementariedad de roedores (CDRs) por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

Los agentes de unión selectivos de la invención, incluyendo anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados, se pueden producir a través de métodos recombinantes conocidos dentro de la especialidad. Se introducen los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos en células huésped y se expresan utilizando los materiales y procedimientos aquí descritos y que se conocen en la especialidad. En un modo de realización preferible, los anticuerpos se producen en células huésped de mamífero, como por ejemplo células CHO. Los anticuerpos totalmente humanos se pueden producir a través de la expresión de ADN recombinante transfectado en células huésped o a través de la expresión en células de hibridoma tal como se ha descrito anteriormente.

Las técnicas para crear versiones de ADN recombinante de las regiones de unión a antígeno de las moléculas de anticuerpo que bordean la generación de anticuerpos monoclonales entran dentro del alcance de la práctica de la presente invención. Para hacerlo así, se extraen las moléculas de ARN mensajeras específicas de anticuerpo desde células del sistema inmune tomadas de un animal inmunizado, y se transcriben en ADN complementario (ADNc). El ADNc se clona a continuación en un sistema de expresión bacteriana. Un ejemplo de esta técnica, adecuada para la práctica de la presente invención utiliza un sistema de vector lambda de bacteriophago que tiene una secuencia líder que hace que la proteína Fab expresada se desplace al espacio periplásmico (entre la membrana de célula bacteriana y la pared celular) o que sea secretada. Se puede generar rápidamente y detectar selectivamente un gran número de fragmentos Fab funcionales para los que se une el antígeno. Dichos agentes de unión selectivos de OPGbp (fragmentos Fab que se unen específicamente para un polipéptido OPGbp) entran específicamente dentro del alcance del término "anticuerpo" tal como se ha definido, explicado y reivindicado en el presente documento.

Entran también dentro del marco de la invención las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos por corte y empalme de genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad para antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada, como por ejemplo la capacidad de activar complemento humano y mediar ADCC. (Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851 (1984); Neuberger y cols. *Nature*, 312: 604 (1984)). Un ejemplo es el reemplazamiento de una región Fc con la de un isotipo diferente. Los agentes de unión selectivos, como son los anticuerpos producidos a través de esta técnica, entran dentro del marco de la presente invención.

En un modo de realización preferible de la invención, los anticuerpos anti-OPGbp son anticuerpos completamente humanos. Por consiguiente, entra dentro del alcance de la invención anticuerpos que se unen a polipéptidos de OPGbp y que están codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas naturales de la secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana, y fragmentos, variantes de síntesis, derivados y fusiones de los mismos. Dichos anticuerpos pueden producirse a través de cualquiera de los métodos conocidos en la especialidad. Entre los ejemplos de métodos se incluyen inmunización con un antígeno de OPGbp (cualquier polipéptido de OPGbp capaz de provocar una respuesta inmune y, opcionalmente, conjugado con un vehículo) de animales transgénicos (v.g., ratones) que sean capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Ver por ejemplo, Jakobovits y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 2551-255 (1993); Jakobovits y cols., *Nature*, 362, 255-258 (1993); Bruggermann y cols., *Year in Immunol.*, 7, 33 (1993).

Alternativamente, pueden generarse anticuerpos humanos a través de la detección selectiva *in vitro* de bibliotecas de anticuerpo de despliegue en fago. Ver Hoogenboom y cols., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991); Marks y cols. *J. Mol. Biol.*, 222, 581 (1991).

Se han descrito diversas bibliotecas de despliegue en fago que contienen anticuerpo, pudiéndolas preparar fácilmente la persona especializada en la técnica. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpos humanos, como por ejemplo fragmentos Fab, Fv y scFv humanos, cuya detección selectiva puede realizarse contra una diana apropiada. El ejemplo 1 describe la detección selectiva de una biblioteca en fago Fab contra OPGbp para identificar las moléculas que se unen selectivamente a OPGbp. Se podrá apreciar que las bibliotecas de despliegue en fagos pueden comprender péptidos o proteínas distintas a anticuerpos que se pueden detectar selectivamente para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp.

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo Id inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético, (v.g., cepa de ratón), como fuente de anticuerpo monoclonal con el anticuerpo monoclonal con el que se está preparando anti-Id. El animal inmunizado reconoce y responde a determinantes idiotípicos del anticuerpo de inmunización produciendo un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Ver por ejemplo, la patente EE.UU. N° 4.699.880.

El anticuerpo anti-Id puede utilizarse también como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo lo que se denomina un anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al anticuerpo monoclonal original que indujo el anti-Id. Por lo tanto, al utilizar anticuerpos para los determinantes idiotípicos de mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

Producción de agentes de unión selectivos de OPGbp

5 Cuando el agente de unión selectivo de OPGbp que se va a preparar es un agente de unión selectivo proteínico, como por ejemplo un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno, se dispone de varios métodos biológicos o químicos para producir dicho agente.

10 Son preferibles los métodos biológicos para producir cantidades suficientes de un agente de unión selectivo para uso terapéutico. Las técnicas de ADN recombinante normales son particularmente útiles para la producción de anticuerpos y dominios de unión a antígeno según la invención. A continuación se describen ejemplos de vectores de expresión, células huésped y métodos para la recuperación del producto expresado.

15 Se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de OPGbp en un vector de expresión apropiado aplicando técnicas de ligación normales. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula huésped empleada en particular (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de célula huésped, de manera que puede producirse la amplificación del gen y/o expresión del gen). Se puede amplifi-
 20 car/expresarse una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-OPGbp en células huésped procarióticas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucarióticas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si el anticuerpo anti-OPGbp se ha de modificar post-transicionalmente (v.g., glucosilar y/o fosforilar). Si es así, son preferibles células huésped de levadura, insecto o mamífero. Para una revisión de los vectores de expresión, ver Meth. Enz. v. 185, D.V. Goeddel, ed. Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

25 Típicamente, los vectores de expresión utilizados en las células huésped contendrán uno o más de los siguientes componentes: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia líder para la secreción, un sitio de unión de ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador seleccionable. A continuación, se explica en detalle cada una de estas secuencias.

30 Los componentes de vector pueden ser homólogos (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogos (es decir, de especies distintas a la especie o cepa de la célula huésped), híbridos (es decir, una combinación de diferentes secuencias de más de una fuente), sintéticos, o secuencias nativas que funcionan normalmente para regular la expresión de inmunoglobulina. Como tales, una fuente de los componentes de vector puede ser cualquier organismo procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre y cuando los componentes sean funcionales en la maquinaria de la célula huésped y puedan ser activados por ella.

35 Se selecciona un origen de replicación en función del tipo de célula huésped que se esté utilizando para la expresión. Por ejemplo, el origen de la replicación desde el plasmidio pBR322 (Producto N° 303-3s, New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, mientras que diversos orígenes desde SV40, poliovirus, adenovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus (como HPV o BPV) son útiles para la clonación de vectores en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen SV40 se utiliza frecuentemente solamente porque contiene el primer promotor).

45 Típicamente existe una secuencia de terminación de transcripción localizada en 3' del extremo de un polipéptido que codifica regiones y sirve para terminar la transcripción. Normalmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procarióticas es un fragmento rico G-C seguido de una secuencia poli T. Si bien la secuencia se clona fácilmente desde una biblioteca, o incluso se puede adquirir en el comercio como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente empleando métodos para la síntesis de ácido nucleico como los que se han descrito anteriormente.

50 Un elemento de gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, v.g., ampicilina, tetraciclina o canamicina para células huésped procarióticas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles desde medios complejos. Los marcadores seleccionables preferibles son el gen de resistencia a canamicina, el gen de resistencia a ampicilina, y el gen de resistencia a tetraciclina. Se puede usar también un gen de resistencia a neomicina para la selección en células huésped procarióticas y eucarióticas.

60 Se pueden utilizar otros genes de selección para amplificar el gen que se exprese. La amplificación es el proceso en el que los genes que tienen una mayor demanda de producción de una proteína crítica para crecimiento se reiteran en tandem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Entre los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero se incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Los transformantes de célula de mamífero se sitúan bajo la presión de selección, a la que solamente los transformantes se adaptan de forma única para sobrevivir en virtud del marcador presente en el vector. Se impone la presión de selección cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, conduciendo así a la amplificación del gen de selección y el ADN que codifica un anticuerpo anti-OPGbp. Como resultado, se sintetizan mayores cantidades de un anticuerpo a partir del ADN amplificado.

Normalmente, es necesario un sitio de unión a ribosoma para la iniciación de la traducción de ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento está típicamente localizado en 3' para el promotor y en 5' para la secuencia de codificación del polipéptido que se va a expresar. La secuencia Shine-Dalgarno puede variar, aunque típicamente es una polipurina (es decir, tiene un alto contenido A-G).

5 Se han identificado muchas secuencias Shine-Dalgarno, pudiéndose sintetizar fácilmente cada una de ellas aplicando los métodos que se han indicado anteriormente y utilizarse en un vector procariótico.

Se utiliza una secuencia, o señal, líder para dirigir la secreción de un polipéptido. Se puede colocar una secuencia de señal dentro del extremo 5' de una región de codificación de polipéptido o directamente en el él. Se han identificado muchas secuencias de señal y se pueden seleccionar en función de la célula huésped utilizada para la expresión. En la presente invención, una secuencia de señal puede ser homóloga (natural) o heteróloga para una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp. Una secuencia de señal heteróloga seleccionada deberá ser aquella que es reconocida y procesada, es decir, segmentada, por una peptidasa de señal, a través de la célula huésped. Para las células huésped procarióticas que no reconocen y procesan una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa, la secuencia de señal es sustituida por una secuencia de señal procariótica seleccionada, como por ejemplo, del grupo de los líderes fosfatasa alcalina, penicilanas o enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura, se puede sustituir una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa por un líder de levadura invertasa, factor alfa o fosfatasa ácida. En la expresión de célula de mamífero, la secuencia de señal nativa es satisfactoria, si bien pueden ser adecuadas otras secuencias de señal de mamífero.

En la mayoría de los casos, la secreción de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp desde una célula huésped tendrá como resultado la eliminación del péptido de señal desde el anticuerpo. Por consiguiente, el anticuerpo maduro carecerá de secuencias de señal o líder.

En algunos casos, como por ejemplo cuando se desea la glucosilación en un sistema de expresión de célula huésped eucariótica, se pueden manipular las diversas pre-secuencias para mejorar la glucosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de segmentación de peptidasa de un péptido de señal en particular o añadir pro-secuencias, que también pueden afectar a la glucosilación. El producto de proteína final puede tener en la posición -1 (en relación con el primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes para la expresión, que pueden no haber sido eliminados totalmente. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos aminoácidos que se encuentran en el sitio de segmentación de peptidasa, unidos en el término N. Alternativamente, el uso de algunos sitios de segmentación de enzima puede tener como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido OPGbp deseado, si la enzima corta en ese área dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión de la presente invención contendrán típicamente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y que está unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp. Se puede utilizar tanto un promotor nativo como heterólogo dependiendo de la célula huésped utilizada para la expresión y el rendimiento de la proteína deseado.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procarióticos incluyen los sistemas de promotor de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptofano (trp); y promotores híbridos como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Se han publicado sus secuencias, permitiendo así que las personas especializadas en este campo puedan ligarlos a la(s) secuencia(s) de ADN deseadas, utilizando ligadores o adaptadores según sea necesario para suministrar los sitios de restricción necesarios.

Los promotores adecuados para su uso con los huéspedes de levadura también son conocidos dentro de la especialidad. Ventajosamente se utilizan potenciadores de levadura con promotores de levadura. Los promotores adecuados para su uso con células huésped de mamífero son muy conocidos y entre ellos se incluyen los que se obtienen de genomas de virus como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y de manera más preferible virus 40 de simio (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, v.g., promotores de choque de calor y promotor de actina.

Otros promotores que se pueden utilizar para expresar los agentes de unión selectivos de la invención incluyen, sin limitarse sólo a ellos: la región promotora temprana SV40 (Bernoist and Chambon, Nature, 290: 304-301, 1981); el promotor CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' de virus de sarcoma de Rous (Yamamoto, y cols., Cell, 22: 787-797, 1980); el promotor de timidina cinasa de herpes (Wagner y cols., Proc., Natl. Acad. Sci. EE.UU., 78: 144-1445, 1981); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster y cols. Nature, 296: 39-42, 1982); los vectores de expresión procarióticos como el promotor beta-lactamasa (Villa-Kamaroff, y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 75, 3727-3731, 1978); o el promotor tac (DeBoer, y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 80, 21-25, 1983). También son de interés las siguientes regiones de control transcripcional de animal, que presentan especificidad de tejido y que se han utilizado en animales transgénicos; la región de control de gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift y cols., Cell, 38, 639-646, 1984; Ornitz y cols., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 50: 399-409, 1986; MacDonald, Hepatology, 7, 425-515, 1987); la región de control de gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, Nature, 315, 115-122; 1985); la región de control de gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl y cols., Cell, 38, 647-658, 1984; Adames y cols., Nature, 318: 533-538, 1985; Alexander y cols., Mol. Cell. Biol., 7, 1436-1444, 1987); la región de control de virus de tumor de mama de ratón que es activo en células de testículo, de pecho, linfoides y mastocitos (Leder y cols., Cell, 45,

485-495, 1986), región de control de gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert y cols., Genes and Devel., 1, 268-276, 1987); la región de control de gen de alfafetoproteína que es activa en el hígado (Kurmlauf y cols., Mol. Cell. Biol., 5; 1639-1648, 1985; Hammer y cols., Science, 235; 53-58; 1987); la región de control de gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey y cols., Genes and Devel., 1, 161-171, 1987); la región de control de gen beta-globina que es activa en células mieloides (Mogran y cols. Nature, 315; 338-340, 1985; Kollias y cols., Cell, 46; 89-94, 1986); la región de control de gen de proteína básica de mielina que es activa en células de oligodendrocito en el cerebro (Readhead y cols., Cell, 48, 703-712; 1987); la región de control de gen de cadena-2 ligera de miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, Nature, 314, 283-286, 1985); y la región de control de gen de hormona de liberación glonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason y cols., Science, 234; 1372-1378, 1986).

Se puede insertar una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción en células huésped eucarióticas. Se conocen varias secuencias potenciadoras asequibles desde mamíferos (v.g., globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, típicamente, se utilizará un potenciador desde un virus. El potenciador SV40, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, y los potenciadores de adenovirus son ejemplos de elementos de potenciación para la activación de promotores eucarióticos. Si bien se puede cortar y empalmar un potenciador en el vector en la posición 5' y 3' de la región de codificación de polipéptido, típicamente queda localizado en el sitio 5' desde el promotor.

Los vectores preferibles para la puesta en práctica de la presente invención son los que son compatibles con células huésped de bacterias, de insectos y de mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3, y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, CA), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alfa (publicación PCT N° WP90(14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY).

Entre otros vectores posibles se incluyen, sin limitarse sólo a ellos, cosmidios, plasmidios o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. Entre dichos vectores se incluyen, sin limitarse sólo a ellos plasmidios como derivados de plasmidio Bluescript® (un fagémido a base de Cole1 de alto número de copias, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), plasmidios de clonación PCR designados para la clonación de productos PCR Taq-amplificados (v.g., TOPO™ TA Cloning® Kit, PCR2.1® plasmid derivatives, Invitrogen, Carlsbad, CA), y vectores de mamífero, levadura o virus como un sistema de expresión de baculovirus (derivados de plasmidio pBacPAK, Clontech, Palo Alto, CA). Se pueden introducir las moléculas recombinantes en células huésped a través de técnicas de transformación, transfección, infección, electroporación y otras técnicas conocidas.

Las células huésped de la invención pueden ser células huésped procarióticas (por ejemplo *E. coli*) o células huésped eucarióticas (como por ejemplo células de levadura, células de insecto o células de vertebrado). La célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, expresa un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno de la invención que puede recogerse después desde el medio de cultivo (si la célula huésped la secreta en el medio) o directamente desde la célula huésped que la produce (si no la secreta). La selección de la célula huésped apropiada dependerá de varios factores como los niveles de expresión deseados, las modificaciones de polipéptido que son deseables o necesarios para la actividad, como glucosilación o fosforilación, y la facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa.

Se conoce una serie de células huésped adecuadas en la especialidad y muchas de ellas están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Entre los ejemplos se incluyen células de mamífero, como células de ovario de hámster chino (CHO) (ATCC N° CCL61) células CHO DHFR (Urlaub y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97, 4216-4220 (1980), células de riñón embrionario humano (HEK) 293 o 293T (ATCC N° CRL1573) o células 3T3 (ATCC N° CCL92). La selección de células huésped de mamífero adecuadas y los métodos para la transformación, cultivo, amplificación, detección selectiva y producción y purificación de producto son conocidas en la especialidad. Otras células de mamífero adecuadas, son líneas celulares COS-1 (ATCC N°, CRL1650) y COS-7 (ATCC N° CCL651) de mono, y la línea celular CV-1 (ATCC N° CCL70). Otros ejemplos de células huésped de mamífero incluyen líneas de células de primate y líneas de células de roedores, incluyendo líneas de células transformadas. También son adecuadas las células diploides normales, cepas de células derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, así como explantes primarios. Las células candidato pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección o pueden contener un gen de selección que actúe predominantemente. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, sin limitarse sólo a ellas, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratón Suizo, BALB-c o NIH, líneas de células de hámster BHK o HaK, que están disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA). Cada una de estas líneas celulares se conoce y está disponible para las personas especializadas en el campo de la expresión de proteína.

De manera similar, entre las células huéspedes útiles adecuadas para la presente invención se encuentran las células bacterianas. Por ejemplo, se conocen las diversas cepas de *E. coli* (v.g. HB101, (ATCC N° 33694) DH5α, DH10 y MC1061 (ATCC N° 53338)) como células huésped en el campo de la biotecnología. Se pueden emplear también en este método varias cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otras *Bacillus spp.* *Streptomyces spp.* y similares.

También se dispone de muchas cepas de células de levadura conocidas entre las personas especializadas en este campo como células huésped para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Entre las células de levadura preferibles se incluyen por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

Adicionalmente, cuando se desee, se pueden utilizar sistemas de células de insecto en los métodos de la presente invención. Dichos sistemas se describen por ejemplo en Kitts y cols. (Biotechniques, 14, 810-817 (1993)), Lucklow (Curr. Opin. Biotechnol., 4, 564-572 (1993)), Lucklow y cols. (J. Virol, 67, 4566-4579 (1993)). Las células de insecto preferibles son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La transformación o transfección de una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp en una célula huésped seleccionada puede llevarse a cabo a través de métodos muy conocidos, incluyendo métodos como método de cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o método DEAE-dextrano. El método seleccionado se determinará en parte en función del tipo de células huésped utilizada. Estos métodos y otros métodos adecuados son muy conocidos entre las personas especializadas en este campo y se exponen por ejemplo en Sambrook y cols., *supra*.

Se pueden utilizar también animales transgénicos para expresar agentes de unión selectivos glucosilados, como por ejemplo anticuerpos y dominio de unión de antígeno. Por ejemplo, se puede utilizar un animal de producción de leche transgénico (una vaca o una cabra, por ejemplo) y obtener agentes de unión glucosilados en la leche animal. Alternativamente, se pueden utilizar plantas para producir agentes de unión selectivos glucosilados.

Pueden cultivarse células huésped que comprenden (es decir transformadas o transfectadas) un vector de expresión que codifica un agente de unión selectivo de OPGbp utilizando medios patrón muy conocidos entre las personas especializadas en este campo. Los medios contendrán normalmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Entre los medios adecuados para el cultivo de células *E. coli* se incluyen por ejemplo caldo de cultivo de Luria (LB) y/o caldo de cultivo Terrific (TB). Entre los medios adecuados para el cultivo de células eucarióticas se incluyen RPMI 1640, MEM, DMEM, que pueden suplementarse todos ellos con suero y/o factores de crecimiento, según se requiera para la línea de células en particular que se cultive. Un medio adecuado para cultivos de insecto es medio de Grace suplementado con hidrolizado de levadura, hidrolizado de lactalbúmina y/o suero de becerro fetal, según sea necesario.

Típicamente, se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de células transformadas o transfectadas como suplemento al medio. El compuesto que se utilice vendrá dictado por el elemento marcador seleccionable presente en el plasmidio con el que se transformó la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionado es resistencia a canamicina, el compuesto que se añade al medio de cultivo será canamicina. Otros compuestos para crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina.

La cantidad de anticuerpo o dominio de unión de antígeno anti-OPGbp producida por una célula huésped puede evaluarse utilizando métodos normales conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitarse sólo a ellos, análisis de mancha de Western, electroforesis de gel SDS-poliacrilamida, electroforesis de gel no desnaturalizante, separación por HPLC, inmunoprecipitación, y/o ensayos de actividad.

La purificación de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPG que ha sido secretado hacia un medio de células puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas, entre las que se incluyen afinidad, immunoafinidad o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de tamiz molecular, electroforesis de gel preparativa o enfoque isoelectrico, cromatografía de líquidos a alta presión. Por ejemplo, se pueden purificar convenientemente los anticuerpos que comprenden una región Fc por cromatografía de afinidad con una proteína A, que se une selectivamente a la región Fc. Las formas modificadas de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno pueden prepararse con etiquetas de afinidad, como hexahistidina u otros péptidos pequeños como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o myc (Invitrogen) en su término carboxilo o su término amino y purificarse por columna de afinidad en una etapa. Por ejemplo, polihistidina se une con mayor afinidad y especificidad a níquel, de manera que se puede utilizar una cadena de afinidad de níquel (como columnas de níquel Qiagen®) para la purificación de agentes de unión selectivos etiquetados con polihistidina. (Ver por ejemplo, Ausubel, y cols., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)). En algunos casos, pueden ser necesarias más de una etapa de purificación.

Los agentes de unión selectivos de la invención que se expresan en células huésped procarióticas pueden estar presentes en forma soluble, ya sea en el espacio periplásmico o en el citoplasma, o en una forma soluble como parte de los cuerpos de inclusión intracelulares. Los agentes de unión selectivos pueden extraerse de la célula huésped utilizando cualquier técnica normal conocida entre las personas especializadas. Por ejemplo, se pueden lisar células huésped para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante prensa francesa, homogenización, y/o sonicación seguido de centrifugado.

Las formas solubles de anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp presentes tanto en el espacio de citoplasma como liberadas desde el espacio periplásmico pueden purificarse después aplicando métodos conocidos dentro de la especialidad, por ejemplo, se liberan fragmentos Fab desde el espacio periplásmico bacteriano a través de técnicas de choque osmótico.

Si un anticuerpo o dominio de unión a antígeno ha formado cuerpos de inclusión, se pueden unir frecuentemente a las membranas celulares interiores y/o exteriores y, por tanto, se encontrarán principalmente en el material aglomerado tras el centrifugado. El material aglomerado se tratará después a extremos de pH, o con un agente caotrópico como, por ejemplo, un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea, o derivados de urea, en presencia de un

agente de reducción como ditioneitol a un pH alcalino o tris carboxietil fosfina a un pH ácido para liberar, descomponer y solubilizar los cuerpos de inclusión. El agente de unión selectivo soluble puede analizarse después utilizando electroforesis de gel, inmunoprecipitado o similares. Cuando es deseable aislar un anticuerpo o dominio de unión a antígeno solubilizado, se puede llevar a cabo el aislamiento utilizando métodos normales, como los que se exponen más adelante y en Marston y cols., (*Meth Enz.*, 182: 264-275 (1990)).

En algunos casos, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno puede no estar biológicamente activo tras el aislamiento. Se pueden utilizar varios métodos para el "replegamiento" o conversión del polipéptido en su estructura terciaria y la generación de uniones disulfuro, para restaurar la actividad biológica. Dichos métodos incluyen la exposición del polipéptido solubilizado a un pH normalmente por encima de 7 y en presencia de una concentración concreta de un caotropo. La selección del caotropo es muy similar a las opciones utilizadas para la inclusión de solubilización de anticuerpo, pero normalmente el caotropo se utiliza a una concentración inferior y no coincide necesariamente con los mismos caotropos que los utilizados para la solubilización. En la mayoría de los casos la solución de replegamiento/oxidación contendrá también un agente de reducción o el agente de reducción más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox concreto que permita que se produzca el desordenamiento de disulfuro en la formación del puente(s) de cisteína de proteína. Algunas de las parejas redox comúnmente utilizadas incluyen cisteína/cistamina, glutatona (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditioneitol (DTT)/ditiolano DTT, y 2-mercaptoetanol (bME)/ditiol-b (ME). En muchos casos, se puede utilizar o puede ser necesario un co-disolvente para aumentar la eficacia del replegamiento, incluyéndose entre los reactivos comunes utilizados para este propósito glicerol, polietilén glicol de diversos pesos moleculares, arginina y similares.

Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno de la invención se pueden preparar a través de métodos de síntesis química (como por ejemplo síntesis de péptido en fase sólida) utilizando técnicas conocidas en la especialidad como las que se exponen en Merrifield y cols., (*J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963)] Houghten y cols. (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 5132 [1985]), y Stewart and Young (Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL [1984]). Dichos polipéptidos se pueden sintetizar con o sin metionina en el término amino. Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno químicamente sintetizados pueden oxidarse aplicando los métodos que se exponen en estos documentos de referencia para formar puentes de disulfuro. Los anticuerpos así preparados retendrán al menos una actividad biológica asociada con un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp producido por recombinación o nativo.

Ensayos para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp

La invención proporciona métodos de detección selectiva para identificar agentes de unión selectivos que inhiben parcial o completamente al menos una actividad biológica de OPGbp. La inhibición de la actividad biológica de OPGbp incluye, sin limitarse sólo a ellas, la inhibición de la unión de OPGbp a su receptor cognado, ODAR, la inhibición de la estimulación de la formación de osteoclasto *in vitro* o *in vivo* mediante OPGbp, y/o la inhibición de recambio óseo o resorción ósea mediada por OPGbp. Los agentes de unión selectivos de la invención incluyen anticuerpos anti-OPGbp, y fragmentos, variantes, derivados y fusiones de los mismos, péptidos, compuestos peptidomiméticos o compuestos organomiméticos.

Los métodos de detección selectiva para la identificación de agentes de unión que pueden inhibir parcial o completamente una actividad biológica de OPGbp pueden incluir ensayos *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos *in vitro* incluyen aquellos que detectan la unión de OPGbp a ODAR y se pueden utilizar para la detección selectiva de agentes de unión de OPGbp en cuanto a su capacidad para aumentar o disminuir la velocidad o grado de unión de OPGbp a ODAR. En un tipo de ensayo, se inmoviliza un polipéptido OPGbp, preferiblemente una forma soluble de OPGbp, como por ejemplo un dominio extracelular, en un soporte sólido (v.g., agarosa o perlas acrílicas) y se añade el polipéptido ODAR, ya sea en presencia o en ausencia de un agente de unión selectivo de OPGbp. Se mide el grado de unión de OPGbp y ODAR con presencia o sin ella de agente de unión selectivo. Se puede detectar la unión por ejemplo por etiquetado radioactivo, etiquetado fluorescente o reacción enzimática. Alternativamente, la reacción de unión puede llevarse a cabo utilizando un sistema detector de resonancia de plasmon superficial, como por ejemplo el sistema de ensayo BIAcore (Pharmacia, Piscataway, NJ). Las reacciones de unión pueden llevarse a cabo con arreglo al protocolo del fabricante.

Los ensayos *in vitro*, como los que se han descrito, pueden utilizarse ventajosamente para detectar selectivamente rápidamente un gran número de agentes de unión selectivos en cuanto a los efectos de unión de OPGbp con ODAR. Los ensayos pueden ser automáticos para detectar selectivamente compuestos generados en despliegue en fago, péptido sintético y bibliotecas de síntesis química.

Se pueden detectar selectivamente también el aumento o disminución de agentes de unión selectivos que se unen a OPGbp con ODAR en cultivos celulares utilizando células y líneas celulares que expresan cada polipéptido. Las células y líneas celulares pueden obtenerse de cualquier mamífero, si bien es preferible su obtención de seres humanos u otros primates, perros o roedores. A modo de ejemplo, la unión de OPGbp a células que expresan ODAR en la superficie se evalúa en presencia o ausencia de agentes de unión selectivos y el grado de unión puede determinarse por ejemplo por citometría de flujo utilizando un anticuerpo biotinilado para OPGbp.

Los ensayos de actividad *in vitro* pueden utilizarse también para identificar agentes de unión selectivos que inhiben la actividad de OPGbp. Entre los ejemplos de ensayos se incluyen la estimulación del crecimiento y proliferación de

células que dependen de OPGbp y la formación de osteoclasto mediada por OPGbp desde células de médula ósea, describiéndose ésta última en el ejemplo 1 de la presente invención.

Los ensayos *in vivo* también están disponibles para determinar si un agente de unión selectivo es capaz o no de disminuir o inhibir el recambio óseo y/o resorción ósea. Se puede aumentar la resorción ósea en animales a través de diversos métodos, entre los que se incluyen ovariectomía y administración de agentes pro-resortivos como OPGbp o IL-1. Ver WO 97/23614 y WO 98/46751. Los efectos de los inhibidores de OPG en la resorción ósea en pacientes humanos se puede medir a través de diversos métodos conocidos como absorptiometría de fotón único (SPA), absorptiometría de fotón dual (DPA), absorptiometría por rayos X de energía dual (DEXA), tomografía computada cuantitativa (QCT) y ultrasonografía (ver Johnston y cols., en *Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª ed. M.J. Favus, ed. Raven Press pp. 137-146). El recambio y resorción ósea pueden determinarse también midiendo los cambios en determinados marcadores bioquímicos, como osteocalcina de suero, fosfatasa alcalina de suero, péptidos de extensión de procolágeno I de suero, telopéptido de colágeno N-terminal o C-terminal de suero o urinario, calcio urinario, hidroxiprolina y piridinolina urinaria y desoxipiridinolina. Generalmente se reconoce que una disminución de los niveles de los marcadores bioquímicos mencionados indica que ha disminuido la resorción ósea y se está reduciendo la pérdida de masa ósea. Alternativamente, se pueden determinar los efectos de la resorción ósea midiendo un cambio en la resistencia mecánica del hueso, en particular un aumento en la resistencia de torsión del hueso (retorcimiento).

Para aplicaciones de diagnóstico, en determinados modos de realización, los agentes de unión selectivos de OPGbp, como por ejemplo anticuerpos y dominios de unión a antígeno de los mimos, se etiquetarán típicamente con una fracción detectable. La fracción detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, una fracción detectable puede ser un radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}P , ^{35}S o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o una enzima como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Bayer y cols., *Meth Enz.* 184: 138-163 (1990).

Los agentes de unión selectivos de la invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, como radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, ensayos sandwich directos e indirectos (ELISAs), y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, 1987)) para detección y cuantificación de polipéptidos de OPGbp. Los anticuerpos se unirán a polipéptidos de OPGbp con una afinidad que es apropiada para el método de ensayo que se emplee.

Los agentes de unión selectivos de la invención también son útiles para la obtención de imágenes *in vivo*, administrándose por ejemplo un agente de unión selectivo etiquetado con una fracción detectable a un animal, preferiblemente en la corriente sanguínea, y ensayándose la presencia y localización del anticuerpo etiquetado en el huésped. El agente puede etiquetarse con cualquier fracción que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología, u otros medios de detección conocidos en la especialidad.

La invención se refiere también a un equipo que comprende un agente de unión selectiva de OPGbp, como un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno, y otros reactivos útiles para detectar los niveles de OPGbp en muestras biológicas. Dichos reactivos pueden incluir una actividad secundaria, una etiqueta detectable, suero de bloqueo, muestras de control positivo y negativo y reactivos de detección.

Usos terapéuticos de agentes de unión selectivos de OPGbp

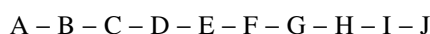
Los agentes de unión selectivos de la invención, tal como se definen en la reivindicación 1, pueden utilizarse como agentes terapéuticos. Los agentes de unión selectivos terapéuticos pueden ser agonistas o antagonistas de OPGbp y, en un modo de realización, son anticuerpo antagonistas anti-OPGbp que inhiben al menos una de las actividad biológicas de un polipéptido OPGbp *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, un antagonista de OPGbp inhibirá la unión de OPGbp con ODAR al menos aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces, más de aproximadamente 1000 veces. Alternativamente, un antagonista de OPGbp inhibirá la formación de osteoclasto *in vitro* tal como lo indica una IC_{50} mensurable (una concentración que da un 50% de inhibición) en un ensayo de médula ósea, como se describe en el ejemplo 1. Alternativamente, un antagonista de OPGbp disminuirá los marcadores de recambio óseo en al menos un 20%, o al menos un 50% en comparación con los niveles de la línea de referencia. Los agentes de unión selectivos de OPGbp antagonistas (como por ejemplo anticuerpos) se identifican a través de los ensayos de detección selectiva que se han descrito aquí.

Los antagonistas de OPGbp, como por ejemplo anticuerpos y dominios de unión a antígeno antagonistas anti-OPGbp, pueden utilizarse para prevenir o tratar enfermedades óseas caracterizadas por una pérdida de la masa ósea o por reemplazamiento del hueso estructuralmente normal con un hueso estructuralmente anormal. Los antagonistas de OPGbp pueden administrarse a un animal que padece pérdida de masa ósea o que es susceptible de padecer pérdida de masa ósea a causa de uno de los siguientes trastornos: osteoporosis, como por ejemplo osteoporosis primaria, osteoporosis endocrina (hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing y acromegalia, formas hereditarias y congénitas de osteoporosis (osteogenesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Menkes y síndrome de Riley-Day) y osteoporosis como consecuencia de la inmovilización de las extremidades; osteomielitis, o una lesión infecciosa del hueso, que lleva a la pérdida de la masa ósea; hipercalcemia como resultado de tumores sólidos (pecho, pulmón y riñón) y malignidades hematológicas (mieloma múltiple, linfoma y leucemia), hipercalcemia idiopática e hipercalcemia

asociada con hipertiroidismo y trastornos de la función renal; osteopenia después de cirugía, inducida por administración de esteroides y asociada con trastornos del intestino delgado y grueso y con enfermedades hepáticas y renales crónicas; osteonecrosis, o muerte celular ósea, asociada con lesión traumática o necrosis no traumática asociada con enfermedad de Gaucher, anemia de células falciformes, lupus eritematoso sistémico y otros estados patológicos; pérdida de la masa ósea debido a artritis reumatoide; pérdida periodontal de la masa ósea; osteoartritis; pérdida prostética; y metástasis osteolítica. Los antagonistas de OPGbp pueden utilizarse también para prevenir o tratar determinados trastornos óseos que se caracterizan por un reemplazamiento del hueso estructuralmente sólido con hueso incompetente estructuralmente desorganizado, como enfermedad de hueso de Paget (osteitis deformante) en adultos y edad juvenil; hiperparatiroidismo, en trastornos óseos congénitos, como displasia fibrosa y en metástasis ósea osteosclerótica.

En un modo de realización de la invención, los antagonistas de OPGbp se utilizan ventajosamente para tratar la pérdida de masa ósea como resultado de la destrucción osteolítica de hueso causada por tumores malignos o metastáticos. Los polipéptidos de OPG de la invención se pueden utilizar para tratar la pérdida de masa ósea asociada con cánceres de pecho, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esófago, rectal, de vejiga, de útero, de ovario y de hígado, así como cáncer del tracto gastrointestinal. También se incluye la pérdida de masa ósea asociadas con determinadas malignidades hematológicas como mieloma múltiple y linfomas como enfermedad de Hodgkin.

Los antagonistas de OPGbp de la invención, incluyendo los anticuerpos y dominios de unión a antígeno antagonistas, se administran en solitario o en combinación con otros agentes terapéuticos, en particular, en combinación con otros agentes de terapia contra el cáncer. Dichos agentes incluyen por lo general, terapia de radiación y quimioterapia. La quimioterapia puede implicar el tratamiento con uno o más de los siguientes: antraciclinas, taxol, tamoxifeno, doxorubicina, 5-fluorouracilo, y otros fármacos conocidos entre las personas especializadas. En un modo de realización, el agente de terapia contra el cáncer es un antagonista de hormona de liberación de hormona luteinizante (LHRH), preferiblemente un antagonista de péptido. Más preferiblemente, un antagonista de LHRH es un decapeptido que comprende la siguiente estructura:



en la que:

A es piro-glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar, o Ac-D-Pal;

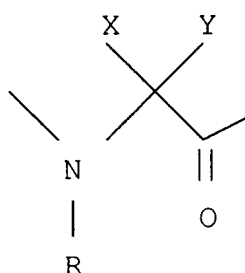
B es His o 4-Cl-D-Phe;

C es Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal-D-Pal(N-O) o D-Trp;

D es Ser;

E es N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys(iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg o Ile;

F es



en la que

R y X son independientemente H y alquilo;

e Y comprende una entidad polar pequeña.

G es Leu o Trp;

H es Lys (iPr), Gln, Met, o Arg;

I es Pro; y

J es Gly-NH₂ o D-Ala-NH₂;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otro modo de realización, un antagonista de LHRH comprende el péptido:

N-Ac-D-Nal-4-Cl-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys (iPr)-Pro-D-Ala-NH₂.

- 5 Se utilizan en el presente documento las abreviaturas y las convenciones estándar, abreviándose los radicales y fracciones no estándar del siguiente modo:

Nal 3-(2-naftil)alaninilo

10 4-Cl-Phe (4'-clorofenil)alaninilo

Pal 3-(3'-piridil)alanilino

15 Pal(N-O) 3-(3'-piridin-N-óxido)alaninilo

iPr-Lys N-épsilon-2-propil-lisinilo

Qal 3-(2'-quinolinil)alaninilo

- 20 Entran dentro del alcance de la presente invención las formas alternativas de los decapeptidos antagonistas de LHRH. Dichos decapeptidos se describen en la patente EE.UU. N° 5.843.901.

Se incluyen asimismo combinaciones de antagonistas de OPGbp con anticuerpos que se unen a células de tumor e inducen un efecto citotóxico y/o citostático en el crecimiento de tumor. Entre los ejemplos de dichos anticuerpos se incluyen los que se unen a proteínas de superficie de célula Her2, CDC20, CDC33, glucoproteína de tipo mucina y receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR) presente en células de tumor y que induce un efecto citostático y/o citotóxico en las células de tumor que despliegan estas proteínas. Entre los ejemplos de dichos anticuerpos se incluyen HERCEPTINA para el tratamiento de cáncer de pecho y RITUXAN para el tratamiento de linfoma no Hodgkin. Se incluyen también como agentes para terapia contra el cáncer polipéptidos que inducen selectivamente apoptosis en células de tumor como TRAIL de polipéptido relacionado con TNF. Los antagonistas de OPGbp se pueden administrar antes, de forma concurrente o posteriormente al tratamiento con un agente de terapia contra el cáncer. Los antagonistas de OPGbp pueden administrarse profilácticamente para prevenir o mitigar el inicio de la pérdida de la masa ósea por cáncer metastático o pueden administrarse para el tratamiento de un estado patológico existente de pérdida de masa ósea como consecuencia de metástasis.

35 Los antagonistas de OPGbp de la invención pueden utilizarse para prevenir y/o tratar el crecimiento de células de tumor en el hueso. El cáncer que tiene metástasis en el hueso puede extenderse rápidamente como células de tumor que estimulan a los osteoclastos para reabsorber la matriz del hueso interna. El tratamiento con un antagonista de OPGbp mantendrá la densidad ósea inhibiendo la resorción y disminuirá la probabilidad de que se extiendan las células de tumor por todo el esqueleto. Se puede prevenir y/o tratarse cualquier cáncer tenga metástasis al hueso con un antagonista de OPGbp.

En un modo de realización, se previene y/o se trata mieloma múltiple con un antagonista de OPGbp, como por ejemplo un anticuerpo. El mieloma múltiple está localizado en el hueso y los pacientes afectados presentan típicamente una pérdida de la masa ósea como consecuencia de una mayor activación de osteoclasto en regiones localizadas. Las células de mieloma producen directa o indirectamente OPGbp, que a su vez activa los osteoclastos con el resultado a lisis del hueso local que rodea a las células de mieloma embebidas en los espacios de la médula ósea. Los osteoclastos normales adyacentes a la célula de mieloma, a su vez, producen IL-6, que lleva a un crecimiento y proliferación de células de mieloma. Las células de mieloma se expanden en un modo clonal y ocupan espacios que están siendo creados por una resorción ósea inapropiada. El tratamiento de un animal con un antagonista de OPGbp bloquea la activación de osteoclastos, lo que a su vez lleva a una disminución de la producción de IL-6 por los osteoclastos, y a una supresión del crecimiento y/o proliferación de mieloma.

Los antagonistas de OPGbp pueden utilizarse en solitario para el tratamiento de los estados patológicos que se han mencionado que tienen como resultado una pérdida de la masa ósea o en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente (anabólico) promotor del crecimiento óseo o un agente anti-resortivo del hueso entre los que se incluyen factores morfogénicos óseos designados BMP-1 a BMP-12, factor- β de crecimiento de transformación y miembros de la familia TGF- β , factores de crecimiento de fibroblasto FGF-1 a FGF-10, inhibidores de interleucina-1, inhibidores de THF- α , hormona paratiroides, prostaglandinas serie E, bisfosfonatos y minerales potenciadores del hueso, como flúor y calcio. Los agentes antabólicos incluyen hormona paratiroides y factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), formando preferiblemente este último agente complejo con una proteína de unión IGF. Los modos de realización preferibles incluyen también la combinación de un antagonista OPGbp con un antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1) o un antagonista de OPGbp con un receptor TNF soluble, como por ejemplo receptor-1 de TNF soluble o receptor-2 de TNF soluble. Un ejemplo de antagonista de receptor de IL-1 es el que se describe en WO 89/11540 y un ejemplo receptor-1 de TNF soluble es el que se describe en WO 98/01555.

Una disminución en la velocidad de resorción ósea puede llevar a osteopetrosis, un estado patológico marcado por una densidad ósea excesiva. Los agonistas de OPGbp pueden aumentar la formación de osteoclasto y la resorción

ósea y se administran a un animal que padece o es susceptible de una disminución en la resorción ósea y un aumento anormal de la masa ósea.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de agentes de unión selectivos de OPGbp entran dentro del marco de la presente invención. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un agente de unión selectivo de OPGbp, como por ejemplo un anticuerpo, o un fragmento, variante, derivado o fusión del mismo, mezclado con un agente farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización preferible, las composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos antagonistas anti-OPGbp que inhiben parcial o completamente al menos una actividad biológica de OPGbp mezclados con un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los anticuerpos estarán suficientemente purificados para su administración a un animal.

Los agentes farmacéuticamente aceptables para su uso en las composiciones de la invención incluyen vehículos, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, aromatizantes y agentes de dilución, agentes emulsificantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de volumen, tampones, vehículos de suministro, agentes de tonicidad, co-disolventes, agentes de humectación, agentes de formación de complejo, agentes de tamponado, antimicrobianos y agentes tensioactivos, tal como se conoce dentro de la especialidad.

Una solución salina tamponada neutra o salina mezclada con albúmina de suero son ejemplos de vehículos apropiados. Asimismo se incluyen en las composiciones antioxidantes como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinil pirrolidona; amino ácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes, como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones de formación de sal como sodio; y/o agentes tensioactivos no iónicos como Tween, pluronics o polietilen glicol. Asimismo, a modo de ejemplo, entre los agentes de potenciación de la tonicidad adecuados se incluyen haluros de metal alcalino (preferiblemente cloruro de potasio o sodio), manitol, sorbitol y similares. Entre los conservantes adecuados se incluyen, sin limitarse sólo a ellos cloruro de benzalconio, trimerosal, alcohol fenético, metil parabeno, propil parabeno, clorohexidina, ácido sórbico y similares. También se pueden utilizar peróxido de hidrógeno como conservante. Entre los ejemplos de co-disolventes adecuados se incluyen glicerina, propilén glicol, y polietilen glicol. Entre los agentes de formación de complejo adecuados se incluyen por ejemplo cafeína, polivinil pirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Entre los agentes tensioactivos o agentes de humectación adecuados se incluyen ésteres de sorbitano, polisorbatos como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonatos, o Tris-HCl. Tampón acetato que puede tener un pH en torno a 4,0-5,5 y tampón Tris que puede tener un pH en torno a 7,0-8,5. En *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, A.R. Gennaro, ed. Mack Publishing Company, 1990 se exponen otros agentes farmacéuticos adicionales.

Las composiciones pueden presentarse en forma líquida o en una forma liofilizada o deshidratada por congelado. Las formas liofilizadas pueden incluir excipientes como sacarosa.

Las composiciones de la invención son adecuadas para administración parenteral. En los modos de realización preferibles, las composiciones son adecuadas para inyección o infusión en un animal a través de una ruta asequible para las personas que trabajan en este campo, como las rutas subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, o intralesionales. Una formulación parenteral será típicamente una solución acuosa isotónica sin pirógenos, esterilizada, opcionalmente con contenido en conservantes farmacéuticamente aceptables.

La formulación farmacéutica óptima puede ser determinada por las personas especializadas dependiendo de la ruta de administración pretendida, el formato de suministro y la dosis deseada.

La invención contempla también otras formulaciones. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también preparaciones en partículas de compuestos poliméricos como poliácido láctico, poliácido glicólico, etc. o la introducción de un agente de unión selectivo de OPGbp (como por ejemplo un anticuerpo) en liposomas. Se puede utilizar también un ácido hialurónico, que puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Las composiciones farmacéuticas incluyen también la formulación de agentes de unión selectivos de OPGbp (como por ejemplo anticuerpos) con un agente, como por ejemplo microesferas inyectables, partículas o perlas bio-erosionables, o liposomas, que proporcionan una liberación sostenida o controlada del agente de unión selectivo que se puede suministrar después como una inyección depot. Otros medios adecuados para el suministro incluyen dispositivos de suministro implantables.

Se puede formular una composición farmacéutica que comprende un agente de unión selectivo OPGbp (como por ejemplo un anticuerpo) como un polvo deshidratado para inhalación. Dichas soluciones para inhalación pueden formularse también en un propelente licuado para suministro por aerosol. En otra formulación más, se pueden nebulizar soluciones.

Se contempla asimismo, la posibilidad de administrar determinadas formulaciones que contienen agentes de unión selectivos de OPGbp por vía oral. Las formulaciones que se administran de este modo pueden formularse con o sin

los vehículos que se utilizan habitualmente en la formación de compuestos de formas de dosis sólidas, como por ejemplo tabletas y cápsulas. Por ejemplo, se pueden diseñar cápsulas para liberar la porción activa de la formulación en un punto del tracto gastrointestinal en el que se aumenta al máximo la biodisponibilidad y se reduce al mínimo la degradación pre-sistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión selectivo. Asimismo, se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de tabletas y aglutinantes.

Otras preparaciones pueden incluir una cantidad efectiva de un agente de unión selectivo de OPGbp en una mezcla de excipientes no tóxicos como los que son adecuados para la fabricación de tabletas. Al disolver las tabletas en agua esterilizada, u otro vehículo apropiado, se pueden preparar soluciones en formas de dosis unitarias. Entre los excipientes adecuados se incluyen, sin limitarse sólo a ellos, diluyentes inertes, como carbonato cálcico, carbonato o bicarbonato sódico, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes de unión, como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Otras formulaciones serán evidentes para las personas especializadas en este campo, incluyendo formulaciones que implican agentes de unión selectivos de OPGbp en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Las técnicas para la formulación de distintos medios de suministro controlado o sostenido, como vehículos de liposoma, micropartículas bio-erosionables, o perlas porosas e inyecciones depot, también son conocidas entre las personas especializadas en este campo. Ver por ejemplo, Supersaxo y cols., Description of controlled release porous polymeric microparticles for delivery of pharmaceutical compositions (Ver WO 93/15722 (PCT/US93/00829)).

Independientemente de la manera de administración, la dosis específica puede calcularse con arreglo al peso corporal, el área superficial del cuerpo o el tamaño del órgano. Asimismo, el refinamiento de los cálculos necesarios para determinar la dosis apropiada para el tratamiento en relación con las formulaciones antes mencionadas es el realizado de forma rutinaria por las personas especializadas en este campo y entra dentro del ámbito de las tareas que llevan a cabo rutinariamente. Las dosis apropiadas pueden determinarse a través del uso de los datos de respuesta a dosis apropiados.

Asimismo, se pueden administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención a través de la administración pulmonar, v.g., v.g. PCT WO 94/200069, en la que se describe el suministro pulmonar de proteínas químicamente modificadas. Para el suministro pulmonar el tamaño de partícula deberá ser el adecuado para el suministro en el pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula deberá estar comprendido entre 1 μm y 5 μm , si bien se pueden utilizar partículas más grandes, como por ejemplo, cuando la partícula es bastante porosa.

Alternativamente o adicionalmente, las composiciones se pueden administrar localmente por implante en el área afectada de una membrana, de una esponja u otro material apropiado en el que se ha absorbido o en el que está encapsulado el agente de unión selectivo de OPGbp. Cuando se utiliza un dispositivo de implante, dicho dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro del agente de unión selectivo de OPGbp puede ser directo a través del dispositivo a través de un bolo, o a través de administración continua, o a través de un catéter utilizando infusión continua.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar también en una formulación o preparación de liberación sostenida. Entre los ejemplos de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices de polímero semi-permeables en forma de artículos moldeados, v.g., películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, poliactidas (ver, v.g., patente EE.UU. N° 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y cols., *Biopolymers*, 22: 547-556 [1983]), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer y cols., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 y *Langer Chem. Thech.*; 12: 98-105 [1982]), acetato de etilen vilnilo, o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir también liposomas, y se pueden preparar a través de cualquiera de los diversos métodos conocidos en la especialidad. Ver v.g., Eppstein y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 3688-3692 (1985); EP 36.676; EP 88.046 y EP 143.949.

Los agentes de unión selectivos de OPGbp, como anticuerpos y fragmentos, variantes, derivados y fusiones de los mismos, pueden emplearse en solitario o combinados con otras composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, se pueden utilizar composiciones farmacéuticas que comprenden por separado o en combinación un antagonista de OPGbp y un antagonista de receptor de interleucina-1, un antagonista de OPGbp y un receptor-1 de TNF soluble, o un antagonista de OPGbp y un receptor-2 TNF soluble para el tratamiento de artritis reumatoide. Por otra parte, se pueden utilizar composiciones que comprenden por separado o en combinación un antagonista de OPGbp y un agente de terapia contra el cáncer para el tratamiento de cáncer y pérdida de masa ósea asociada. Son posibles otras combinaciones con un antagonista o agonista de OPGbp dependiendo del estado patológico que se esté tratando.

Puede ser deseable en algunos casos utilizar una composición farmacéutica que comprenda las composiciones de agente de unión selectivo de OPGbp de una manera *ex vivo*. En este caso, se exponen las células, tejidos u órganos que han sido extirpados del paciente a composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de unión selectivos de OPGbp, tras lo cual se vuelven a implantar en el paciente las células, tejidos y/o órganos posteriormente.

En otros casos, se puede suministrar una composición que comprende un agente de unión selectivo de OPGbp a través del implante en ciertas células del paciente que han sido obtenidas por ingeniería genética, utilizando métodos

como los que se describen aquí, para expresar y secretar los polipéptidos, agentes de unión selectivos, fragmentos, variantes o derivados. Dichas células pueden ser células animales o humanas, y pueden suministrarse desde el propio tejido del paciente o desde otra fuente, ya sea humana o no humana. Opcionalmente, se pueden inmortalizar las células. No obstante, para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, es preferible que las células estén encapsuladas para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulado consisten típicamente en cubiertas o membranas poliméricas semi-permeables biocompatibles que permiten la liberación del producto(s) de proteína para prevenir la destrucción de las células a través del sistema inmune del paciente o a través de otros factores negativos de los tejidos de alrededor.

Los métodos utilizados para el encapsulado de membrana de las células son conocidas para las personas especializadas en este campo y la preparación de las células encapsuladas y su implantación en pacientes pueden realizarse sin un experimentación indebida. Ver. v.g., patentes EE.UU. N° 4.892.538; 5.011.472; y 5.106.627. En PCT WO 91/10425 (Aebischer y cols.) se describe un sistema de encapsulado de células vivas. Las técnicas para formular otros medios de suministro sostenido o controlado diversos, como vehículos de liposoma, partículas o perlas bio-erosionables, también son conocidas entre las personas especializadas en este campo, y están descritas. Las células, con o sin encapsulado, pueden implantarse en tejidos u órganos del cuerpo del paciente adecuados.

Una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un agente de unión selectivo de OPGbp (como por ejemplo un anticuerpo anti-OPGbp, o fragmento, variante, derivado o fusión del mismo), dependerá por ejemplo de los objetivos terapéuticos, como la indicación para la que se está utilizando la composición, la ruta de administración y el estado del sujeto. Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno antagonistas de OPGbp de la invención se administran en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva para prevenir y/o tratar pérdida de hueso asociada a enfermedad ósea metastática. Una "cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva" de un anticuerpo antagonista de OPGbp es la cantidad que reduce la velocidad y/o extensión de la pérdida de masa ósea o que previene la pérdida de la masa ósea en un sujeto que tiene una masa ósea normal. Los cambios en la masa ósea se detectan a través de una serie de métodos conocidos como absorptiometría de fotón único (SPA), absorptiometría de fotón dual (DPA), absorptiometría de rayos X de energía dual (DEXA), tomografía computada cuantitativa (QCT) y ultrasonografía (ver Johnston y cols., en *Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism*, 2ª ed. M. J. Favus, ed. Raven Press pp. 137-146). Las personas especializadas en este campo pueden aplicar estos métodos para determinar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de fusión de OPG. Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede determinarse midiendo los cambios en los marcadores bioquímicos para el recambio óseo, como por ejemplo osteocalcina de suero, fosfatasa alcalina de suero, péptidos de extensión de procolágeno I de suero, telopéptido de colágeno C-terminal o N-terminal de suero o urinario, calcio urinario, hidroxiprolina, piridinolina urinaria y desoxipiridinolina. Generalmente, se reconoce que una disminución de los niveles de los marcadores bioquímicos que se han mencionado indica que se está reduciendo la resorción ósea y que se está disminuyendo la pérdida de masa ósea. Alternativamente, se puede determinar también una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de fusión de OPG midiendo un cambio en la resistencia mecánica del hueso, en particular un aumento de la resistencia de torsión (retorcimiento) del hueso.

Por consiguiente, puede ser necesario que la persona encargada valore la dosis y modifique la ruta de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/kg}$ y hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores que se han mencionado antes. En otros modos de realización, la dosis puede oscilar entre 1 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg ; o 5 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg ; o 0,1 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg ; o 1 $\mu\text{g/kg}$ y hasta aproximadamente 100 mg/kg . Típicamente, el especialista clínico administrará la composición hasta alcanzar la dosis con la que se consiga el efecto deseado. La composición puede administrarse por lo tanto como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de agente de unión selectivo de OPGbp) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o un catéter.

Los ejemplos que se exponen a continuación sirven para ilustrar mejor la invención, si bien no deben considerarse como limitativos del marco de la misma, que se define en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Reactivos y ensayos

La diana de detección selectiva utilizada en estos estudios fue preparada a partir de la expresión de ADNc que codifica OPGbp humana de 140 a 317 aminoácidos inclusive, tal como se muestra en la figura 4 de PCT WO 98/46751 en una célula huésped CHO y se purificó del siguiente modo. Se equilibró una columna de Sefarosa Q (Farmacia) con Tris 20 mM, pH 8,5. Se aplicó medio acondicionado que había sido valorado también a un pH 8,5, se lavó la columna con tampón Tris y se eluyeron las proteínas con un gradiente NaCl 100-600 mM sobre 20 volúmenes de columna. Se identificaron fracciones que contenían OPGGL a través de SDS-PAGE y análisis de mancha de Western. A continuación, se valoraron fracciones que contenían OPGbp a un pH 4,8 y se aplicaron a una columna Sp (Farmacia) que había sido equilibrada con acetato sódico 20 mM, pH 4,8. Después del lavado, se eluyeron las proteínas con gradiente de NaCl 0-0,3 M, seguido de etapas de NaCl 0,5 M y 1M. Se eluyó OPGbp con todos los tampones, aunque solamente se encontraron activas las fracciones de gradiente de NaCl 0-0,3 M en los bioensayos de estimulación de osteoclasto *in vitro*. El rendimiento fue 40 mg/l . El secuenciado amino-terminal reveló que aproximadamente un 80% de la proteína purificada empezaba con el aminoácido 143 de OPGbp humana, mientras que el 20% restante comenzaba con el

aminoácido 147. El producto final utilizado para la detección selectiva de bibliotecas de fagos recibe el nombre de OPGbp[143-317], la forma purificada predominante.

Se prepararon anticuerpos policlonales anti-OPGbp del siguiente modo. Se inyectaron inicialmente en tres conejos neozelandeses blancos (Western Oregon Rabbit co., Philomath, OR) cantidades iguales de Hunter Titer Max (CytRx Corp., Atlanta, GA) y OPGbp[143-317]. Se inyectaron 0,2 mg por conejo. Se repitió la misma operación cuatro y seis semanas después. Se realizó extracción de 50 ml de sangre a las siete semanas y una vez a la semana después con un total de seis sangrados. Se purificaron por afinidad los anticuerpos desde el suero de conejos inmunizados en una resina de OpGbp del siguiente modo. Se añadieron 3 ml de resina Actigel Ald (Sterogene) a una columna de 10 ml (Kontes Fex Colum) y se lavaron con 50 ml de PBS. Se añadieron 3 mg de OPGbp[143-317] diluidos en 3 ml de PBS a la columna de Actigel y se agitó suavemente para su mezclado. Se añadieron 0,6 ml de cianoborohidruro de Na 1 M y después se agitó la mezcla durante toda la noche a 4°C. Se lavó la columna con 50 ml de tampón de elución Pierce Gentle (Pierce) seguido de 150 ml de PBS. Se filtraron para esterilización 50 ml de sueros de conejos inmunizados a través de un filtro de 0,45 µm, se añadieron a la columna y se agitó la mezcla durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se dejó en reposo el contenido de la columna y se drenó la fase líquida. A continuación, se lavó la columna con 150 ml de PBS hasta un OD₂₈₀ de 0,002. A continuación, se añadió tampón de elución Pierce Gentle con 1% de ácido acético glacial al 1% a la columna y se recogieron fracciones de 1 ml a intervalos de 10 minutos y se analizaron según OD₂₈₀. Se distribuyeron las fracciones que contenían la cantidad más alta de material de absorción OD₂₈₀ y se dializaron contra dos litros de PBS durante 48 horas. Se produjo un cambio de tampón durante este tiempo.

Se llevaron a cabo los ensayos ELISA en distribuciones de fago eluidos colocando en placa OPGbp[143-317] a 1,5 µg/ml en PBS, pH 8,0 durante 1 hora a temperatura ambiente, en inmunoplasmas Nunc Maxisopr en una batidora. Se añadió una solución de enjuagado de MPBS 2% (Tampón de bloqueo) a las inmunoplasmas, se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente y se descartaron. Se llevó a cabo el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con MPBS al 2%. Se realizaron lavados 5 x utilizando TBS-Tween-20 (0,1%) (TBS; Solución salina tamponada Tris; Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM). Se añadió una valoración de fago utilizando un mínimo de 10¹⁰ fagos/pocillo en tampón de dilución conjugado (0,4% leche deshidratada sin grasa en TBS o 0,4% M-TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados utilizando TBS-Tween-20 (0,1%). Se utilizó conjugado de anticuerpo monoclonal peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-M13 (Farmacia Piscataway, NJ) en una dilución 1/2000 en MTBS al 0,4% durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo los lavados 5 veces con TBS-Tween-20 (0,1%). Se añadió ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenztiazolina-sulfónico) (ABTS) (Pierce, Rockford, IL) una sustrato colorimétrico para detección a OD₄₀₅. Se llevaron a cabo los controles positivos para la detección de huOPG bp [143-317] en placa por adición de OPG[22-194]-Fc, seguido de fosfatasa anti-Fc-alcalina y sustrato para-nitrofenilfenol (pNPP) para la detección.

Condiciones PCR y cultivo 2xTY-AG

Se llevó a cabo una reacción en cadena de polimerasa típica (PCR) en una placa Thermowell de 96 pocillos. Cada pocillo contenía 20 µl de una mezcla de reacción PCR (2 µl 10 x tampón PCR (Gibco BRL Products, Grand Island, NY), 17,3 µl de agua, 0,2 µl dNTPs (25 mM), 0,2 µl Primer 870-02, 0,2 µl cebador 2182-83 (reservas de cebador 10 pmoles/µl para amplificación por inserto), 0,1 µl de polimerasa Taq]. Se recogieron colonias individuales y se resuspendieron en un pocillo y se superpusieron 20 µl de aceite mineral, se sellaron y después se colocaron en una máquina PCR.

870-02 5'-CCG ACT TTG CAC CTA GTT (SEQ ID NO: 22)

2182-83 5'-TTT GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT (SEQ ID NO: 23)

Se generó una placa por duplicado para preparar cultivos transfiriendo la misma colonia recogida a la posición de pocillo correspondiente en un segundo bloque de 96 pocillos profundos. Se dejaron crecer los cultivos en 0,3 a 1,0 ml 2 x TY-AG (caldo de cultivo 2x TY (16 g bacto-triptona/litro de agua, 10 g extracto de levadura/litro de agua, 5 g NaCl/litro de agua), con un contenido de 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa). Se selló el bloque con una cinta adhesiva permeable al aire, se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos para que bajara el líquido, y se incubó a 37°C a 300 a 350 rpm durante toda la noche para el cultivo. Los cultivos de toda la noche recibieron 150 µl/pocillo de 50% glicerol, se mezclaron y se congelaron a -80°C.

Las condiciones de reacción PCR fueron 40 ciclos de 45 segundos, a 90°C, 45 segundos a 55°C, 1,5 minutos a 72°C, seguido de 72°C de extensión durante 10 minutos. Una vez completada la reacción PCR, se hicieron correr 2,5 a 4,0 µl sobre geles de agarosa al 1% de 25-pocillos con 0,5 µl/ml de bromuro de etidio, utilizando patrones de peso molecular de ADN (Gibco BRL Products, Grand Island, NY, o Stratagene, La Jolla, CA) durante 90 minutos a 90 voltios. Se consideraron solamente insertos de longitud total de más de 1,6 kb.

Se digirieron con BstNI partes alícuotas de 16 µl de reacciones PCR durante 3 horas a 60°C con una mezcla de digestión total de 30 µl que contenía 10 µl de agua, 3 µl de 10X tampón 2 React (GIBCO BRL products), 0,3 µl BSA (10 mg/ml), 0,7 µl BstNI (GIBCO: 10.000 unidades/ml). Se hicieron correr las muestras digeridas en geles de agarosa al 3% de 25-pocillos durante 3,5 horas a 80 voltios.

Ensayo de células RAW

Se mezclaron varias concentraciones de muestras de ensayo Fab con una cantidad constante de OPGb [143-317] humana y se incubaron durante al menos una hora a temperatura ambiente en DMEM, suero bovino fetal al 10% y 1 x mezcla de glutamina-penicilina-estreptomicina. Se indican las concentraciones de muestras Fab y OPGb para cada experimento. Tras la incubación, se añadió la mezcla a 2 x 10⁴ células RAW 246,7/pocillo (American Type Culture Collection, Manassas, VA, Accession N° TIB-71) en una placa de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos. Se cultivaron las células RAW en DMEM con suero bovino fetal al 10% y 1 x glutamina-penicilina-estreptomicina. Al cabo de tres días a 37°C y CO₂ al 5%, se aspiró el medio desde los pocillos y se mancharon las células para determinar la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), un marcador de diferenciación de osteoclasto, por adición de 100 µl por pocillo de tampón citrato 0,1 M con Tritón X-100 al 0,1%, incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, adición de sustrato de paranitrofenilfosfato (pNPP) y tartrato en tampón citrato que contenía Triton X-100 (la concentración de sustrato fue 20 mM pNPP y 335 mM tartrato) e incubación durante 5 minutos más a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción por adición de NaOH hasta una concentración de 0,05 M. La fosfatasa ácida convierte el sustrato pNPP en para-nitrofenol que se detecta por absorbancia a 405 nm. Se trazó el gráfico del cambio de absorbancia a 405 nm en función del log de dosis para los controles y las muestras de ensayo. Se calculó un análisis de varianza (ANOVA) y potencia relativa con un límite de confianza del 95%. Los controles positivos incluyeron diferentes concentraciones de proteína de fusión OPG [22-194]-Fc o una preparación de anticuerpo policlonal anti-OPGb preincubada con OPGb [143-317] e incubada con células RAW 264,7 tal como se ha descrito antes.

Ensayo de médula ósea

Se llevó a cabo un ensayo de la médula ósea murínica para la determinar la formación de osteoclasto, esencialmente, tal como describe Lacey y cols. (Cell 93, 165-176 (1988)) y Kong y cols., (Nature, 397, 315-323 (1999)). Brevemente, el ensayo es una modificación del ensayo de co-cultivo de médula ósea murínica descrito en PCT WO 97/23614 en el que se cultivaron células de médula ósea murínica no-adherentes en medio durante siete días en presencia de OPGb humana (143-317), pero sin adición de la línea celular de estroma ST2, 1,25 (OH)₂ vitamina D3 y dexametasona. Se detectaron las células que tenían un fenotipo de osteoclasto según la presencia de células TRAP-positivas. Se midió la actividad TRAP en solución y por manchado histoquímico.

Para la detección de la actividad TRAP en solución, se lisaron las células de la médula ósea adultas en tampón citrato 100 mM (Sigma, Cat # 91-5) + 0,1% Triton X-100, pH 5,0, 3-5 minutos. Se añadieron pNPP 20 mM, tartrato 80 mM y citrato 100 mM + Tritón 0,1% X-100, pH 5,0 y se incubaron a temperatura ambiente durante 3-5 minutos y se midieron a 405 nm después de detener la reacción con 50 µl de 500 mM NaOH/pocillo. Una respuesta positiva fue una disminución de la absorbancia dependiente de la concentración a 450 nm desde ~2,0 OD a ~0,6 OD.

Para el manchado histoquímico, se fijaron las células en una solución fijadora a base de formaldehído, después se mancharon con Fast Garnet GBC (solución 2-metil-4-[(2-metilfenil)-azo]bencenodiazonio) + solución fosfato Naftol AS-BI (C₁₈H₂₅BrNO₆P) + solución acetato + solución tartrato), se incubó durante 1 hora a 37°C, después se enjuagó, se secó y se evaluó con el microscopio. Se consideró que una célula que era TRAP positiva y contenía tres o más núcleos (MNC TRAP-positiva) era una célula osteoclastica.

*Ejemplo 2**45 Detección selectiva de biblioteca Fab humana*

Se obtuvo una biblioteca de aproximadamente 4 x 10¹⁰ fragmentos Fab humanos únicos en bacteriofago M13 de Target Quest, NV (Amsterdam, Países Bajos). Los procedimientos generales para la construcción y detección selectiva de bibliotecas Fab humanos se describe en Haard y cols. (Advanced Drug Delivery Reviews 31, 5-31 (1998); J. Biol. Chem. 274, 18218-18230 (1999)). Se realizó la detección selectiva de la biblioteca para los fragmentos Fab que se unen a OPGb [143-317] siguiendo los procedimientos que se indican a continuación.

Depósito en placa directo en fase sólida

Se inmovilizó OPGb [143-317] tal como se ha descrito anteriormente en una fase sólida utilizando tubos de inmunoensayo Nunc Maxisorb (12 x 75 mm, capacidad 5 ml) por depósito directo en la fase sólida a una concentración de proteína de 1,5 µg/ml en TBS, pH 8,0 (TBS es solución salina tamponada con Tris: Tris 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM) a temperatura ambiente durante 2 horas. Estas condiciones permitieron un 80% de depósito máximo de la fase sólida en 2 horas (máximo en 2 horas seguía no saturado) al mismo tiempo que se retenían las capacidades de unión a OPG [22-194]-Fc. Al cabo de 2 horas de incubación, se lavó el tubo tres veces con PBS. Se bloqueó la diana depositada rellenando el tubo de inmunoensayo con leche deshidratada no grasa al 2% (Marvel o Carnation) en PBS (MPBS) durante 1 a 4 horas a temperatura ambiente, se lavó dos veces, cada una de ellas en PBS-Tween 20 (0,1%) y PBS. Se pre-bloquearon los fagos concentrados con PEG (aproximadamente 10¹³) en MPBS al 2% para absorber el fago de unión a leche antes de la exposición del fago a la diana en fase sólida. Se incubaron los fagos pre-bloqueados en 4 ml con la diana depositada a temperatura ambiente durante 2 horas (30 minutos de rotación transversal ("end-over-end") y 90 minutos de reposo). Se lavó el contenido unido al tubo 20 veces con PBS-Tween 20 (0,1%) y 20 veces con PBS para eliminar el fago sin unir y reducir la unión no específica. Se eluyeron los fagos desde la fase sólida con de elución de fagos total de diez minutos con 1 ml de trietilamina 100 mM (TEA) pH 12, rotación del

ES 2 307 594 T3

tubo longitudinal (end-to-end), seguido de neutralización con 0,5 ml de 1 M Tris-HCl pH 7,4. Alternativamente, se recuperaron ligadores de fago específicos por elución con 1 ml de 1 uM OPGbp[143-317] o 1 uM OPG[22-194]-Fc en 0,4% MPBS, pH 8,0 o pH 7,4, respectivamente.

- 5 Se valoraron los fagos eluidos (ligadores) sobre cepa TG1 de *E. coli* (Pharmacia, Piscataway, NJ.). Se llevó a cabo la valoración por duplicado según una modificación del método "Dilución continua" (Huycke y cols., BioTechniques 23, 648-650 (1997)) con 10 μ l de dilución de fago en caldo de cultivo 2x TY en 90 μ l de células TG1 en fase log (A600, 0,2 a 1,0 ODS, se mezclaron y se incubaron 20-30 minutos a temperatura ambiente. Se vetearon horizontalmente 10 μ l en una línea, 6 líneas por cada placa petri cuadrada 2xTY-AG (caldo de cultivo 2xTY, que contenía 2% de glucosa, 100 μ l/ml ampicilina y 15 g/litro agar), y se incubó durante toda la noche a 37°C.

- Se amplificaron los fagos eluidos (aglutinantes) a través de la infección bacteriana en células TG1. Se inocularon en 25 ml de caldo de cultivo 2 x TY células TG1 de *E. coli* y se cultivaron a 30°C durante más de 12 horas, 270 rpm. Se inoculó el cultivo durante toda la noche 1:100 con 50 ml de caldo de cultivo 2x TY caldo de cultivo, y se desarrolló 15 ~1,5 horas, 270 rpm hasta un OD₆₀₀ de 0,5. Para la amplificación de fago seleccionado, se añadieron 5 volúmenes de células TG1 de *E. coli* exponenciales, 4 volúmenes de caldo 2xTY y 1 volumen de fago eluido (neutralizado) en combinación y se incubó en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Para reducir el volumen para el depósito, se centrifugaron las células a 4.000 rpm y se resuspendió el aglomerado en caldo de cultivo 2 x TY-AG (100 μ g/ml ampicilina, 2% glucosa). En la primera vuelta de selección, se depositó la muestra en dos a cuatro placas 16 cm² 2 x 20 TT-G (caldo de cultivo 2 x TY que contenía 2% de glucosa, 100 μ g/ml de ampicilina y 15 g de agar) para mantener la diversidad. Para las últimas vueltas de selección, fue suficiente una placa. Se incubaron las placas durante toda la noche a 30°C. Después de un crecimiento durante toda la noche, se añadieron 5 ml de 2xTG-AG a cada placa grande, y se rasparon las bacterias para soltarlas con un dispersador esterilizado. Una vez completada la resuspensión y la concentración por centrifugado a 4.000 rpm, 10 minutos, se transfirió una muestra concentrada a un criotubo Nunc. 25 Se añadió glicerol esterilizado a una concentración final de 15% y se almacenó inmediatamente a -70°C.

- Se resuspendieron las células amplificadas en caldo de cultivo 2 x TY-AG hasta ~0,1 OD y se desarrolló durante 1,5-2,5 horas a 37°C, 270 rpm, a un OD₆₀₀ de 0,5 y se transfirió (5 ml) a un tubo Falcon de 50 ml que contenía una cantidad apropiada de fago ayudador M13K07 (Gibco BRL Products, Grand Island, NY) con una relación de 20 30 a 1 de fago a bacteria. Se incubó la mezcla de fagos y bacterias a 37°C durante 30 minutos sin agitación seguido de centrifugado durante 15 minutos, 3.700 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el aglomerado de bacterias en 25 ml de 2xTY-AK (100 μ g/ml ampicilina, 25 μ l/ml canamicina) y se transfirió a un matraz de 250 ml para incubación durante toda la noche a 30°C con agitación a 270 rpm. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo en un tubo Falcon de 50 ml durante 20 minutos a 3.700 rpm para aglomerar las bacterias. Se añadió al sobrenadante 1/5 del volumen de 35 una solución de polietilén glicol (PEG) (20% PEG 8000, 2,5 M NaCl) y se mantuvo sobre hielo durante al menos 1 hora. Se aglomeraron los fagos durante 20 minutos, 3.700 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el aglomerado en ~1,0 ml de PBS esterilizado y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se microcentrifugó la muestra 2 minutos, ~14.000 rpm para eliminar el resto de las bacterias y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se repitió el precipitado de PEG. Se utilizaron los fagos precipitados con PEG concentrados en los ensayos de 40 selección o detección selectiva. El rendimiento normal fue aproximadamente 1-5 x 10¹³ fago desde un cultivo de 25 ml. Para un almacenamiento más prolongado, se añadió glicerol al fago (15% de concentración final) y se almacenaron los fagos a -70°C.

- En este procedimiento se describe una ronda de detección selectiva que comprende las etapas de unión, elución y 45 amplificación. Típicamente, se llevaron a cabo de tres a cinco rondas de detección selectiva con el fin de obtener una distribución de fagos eluidos que se unen a OPGbp [143-317] en un ensayo ELISA a un nivel al menos cuatro veces mayor con respecto al fondo. Una vez completada la detección selectiva, se depositaron en placa los fagos eluidos finales para colonias individuales y se analizó el ADN insertado por PCR de colonia y digestión con BstNI tal como se describe a continuación.

50 Fase en solución

- Se bloquearon previamente los fagos durante 60 minutos en un rotador a temperatura ambiente en MPBS al 2%. Se añadió bucle b-b' de OPGbp biotinilado (500 nM) directamente a la mezcla de fagos equilibrada y se incubó durante 55 30 minutos a 1 hora en un rotador (transversal) a temperatura ambiente. El péptido de bucle tenía la secuencia [biotina [LC]-TDIPSGSHKVSLSWYHDRG] (SEQ ID NO: 24) en la que se utilizó LC (cadena lineal, es decir (CH₂)₅-NH₂) para unir la secuencia de bucle b-b' OPGbp con biotina. Se utilizaron perlas Dynabead revestidas con estreptavidina (100 μ l por selección en tubos Eppendorf de 1,5 ml) para la captura en fase solución de complejos antígeno biotinilado-fago (3 x para selección de antígeno negativo, y 1X para selección de antígeno diana). Se pre-equilibraron las perlas 60 recubiertas con estreptavidina arrastrándolas hacia un lado del tubo utilizando un imán Dynal, se separó el tampón y se resuspendieron las perlas en 1 ml de MPBs al 2%. El equilibrio a temperatura ambiente fue 1 a 2 horas en un rotador transversal.

- Se realizaron tres selecciones negativas en las rondas 2 y 3. Para la selección negativa, se añadieron fagos preblo- 65 queados a un tubo de perlas Dynabeads revestidas con estreptavidina pre-equilibradas en MPBS al 2% y se incubaron durante 30 minutos en un rotador transversal a temperatura ambiente (se repitió dos veces). Se arrastraron las perlas a un lado y se transfirieron los fagos sin unir a un tubo Eppendorf nuevo para su utilización para la selección de antígeno. Se añadió péptido de bucle b-b' huOPGbp biotinilado (500 nM) directamente a la mezcla de fagos equilibrada y se

ES 2 307 594 T3

incubó durante 30 minutos a 1 hora en un rotador transversal a temperatura ambiente. Se arrastraron perlas equilibradas a un lado del tubo, se separó el tampón y se resuspendió con la mezcla de péptido biotinilado-fago seguido de incubación durante 15 minutos en un rotador transversal a temperatura ambiente. Se colocaron los tubos en una rejilla magnética durante 1 minuto, se aspiraron y se lavaron las perlas 6x con 1 ml de 2% MPBS-Tween-20 (0,1%), 6 x de 1 ml de PBS-Tween-20 (0,1%) y 2 x con 1 ml de PBS. Se eluyeron los fagos con 1 ml de TEA 100 mM, pH 12 durante 5-10 minutos en un rotador a temperatura ambiente, seguido de neutralización con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7,4.

Ejemplo 3

10 *Identificación de clones Fab que se unen OPGbp*

Se infectaron células TG1 de *E. coli* con la distribución de fagos de una ronda de respuesta a ELISA y se recogieron colonias individuales para el análisis PCR. Típicamente, se recogieron de una a cuatro placas de las 96 colonias para cada selección. Se amplificaron los ADNc de Fab por PCR con un grupo específico de cebadores y se analizaron en un gel de agarosa para determinar la longitud del inserto Fab. El inserto Fab tiene una longitud de > 1,6 Kb de longitud completa. Se digirieron también ADNc con la enzima de restricción BstNI y se analizó el patrón de banda por electroforesis en geles de agarosa. Los clones que presentaron insertos de longitud completa PCR de tamaño idéntico y patrones de banda BstNI idénticos en dos o más aislados fueron candidatos para otros análisis. Utilizando los criterios mencionados, se identificaron los siguientes Fabs.

Se identificó el patrón “P” de Fab tras la detección selectiva en fase solución utilizando tres rondas de elución con trietilamina, pH 12, seguido de la detección selectiva en fase sólida, tal como se ha descrito antes utilizando una ronda de elución con 1 uM OPGbp [143-317].

Se identificó el patrón “S” de Fab por detección selectiva en fase solución utilizando tres rondas de elución con trietilamina, pH 12, seguido de detección selectiva en fase sólida tal como se ha descrito antes utilizando dos rondas de elución con 1 uM de OPG[22-194]-Fc.

Se identificó el patrón “AT” de Fab por detección selectiva en fase sólida tal como se ha descrito antes utilizando cuatro rondas de elución con 1 uM OPG[22-194]-Fc.

Se identificó el patrón “Y” de Fab por detección selectiva en fase sólida tal como se ha descrito utilizando tres rondas de elución con OPGbp[143-317].

Se prepararon los fagos para colonias individuales que presentaban los patrones AT, Y, P y S de Fab a través del siguiente procedimiento. Se realizaron las preparaciones de plasmidio y se transformaron en células TG1. Los análisis de PCR confirmaron la transformación de un inserto de longitud completa. Se desarrollaron las células tanto en un bloque de pocillo profundo (0,5 ml de volumen) como en un cultivo de 10 ml. Se rescataron los fagos por infección en una relación 20:1 de fago ayudador M13K07/células, se hicieron precipitar en PEG 1 vez (como en el protocolo de depósito en placa directo en fase sólida) y se resuspendieron en ~ 200 ul desde un bloque de pocillo profundo de tamaño de pocillo de 2 ml o ~500 ul desde el cultivo de 10 ml en PBS.

Las valoraciones de fago fueron en el intervalo de 10^{11} - 10^{14} fago/ml en el ELISA. Se realizaron las valoraciones en función del volumen utilizando un máximo de adiciones de 50 μ l/pocillo dando un intervalo típico de 10^9 - 10^{11} fago pocillo en un ensayo ELISA. Se llevó a cabo el ensayo ELISA de fago tal como se ha descrito antes. En el ensayo ELISA se utiliza conjugado anti-M13-HRP para la detección de fago unido con ABTs, un sustrato colorimétrico a 405 nm. Un conjugado anti-M13 HRP fue específico para la proteína VIII de recubrimiento principal en el fago. Los valores fueron de determinaciones en un solo punto.

En la figura 1 se muestran los resultados de un ELISA de un clon representativo para cada uno de los patrones principales “AT”, “Y”, “P” y “S”. Los cuatro clones Fab mostraron una reactividad significativa con OPGbp [143-317]. Se secuenciaron todos los miembros de clon de los patrones “AT” y “Y” (27 miembros de 672 clones y 9 miembros de 96 clones, respectivamente) y se encontraron idénticos dentro de sus patrones. Por lo tanto, los miembros del patrón serán representativos de todo el patrón para los patrones “AT” e “Y”.

Los patrones “Q” (3 miembros de 96 clones), “X” (3 miembros de 96 clones) y “AB” (2 miembros de 96 clones) también fueron ELISA positivos para OPGbp[143-317] en placa según lo determinó un clon representativo (figura 1). Dado que las señales ELISA fueron considerablemente más bajas que los patrones “AT”, “Y”, “P” y “S” y estaban representados solamente por dos o tres miembros en los 96 clones, se asumió que tenían Kds en el intervalo μ M y no se siguieron analizando. El patrón “X” fue solamente ELISA positivo cuando la concentración de Tween-20 en los lavados se redujo de 0,1% a 0,01%.

Ejemplo 4

65 *Purificación de Fabs solubles*

Se infectaron fagos que contenían Fabs “AT”, “Y”, “P” y “S” en HB2151 de *E. coli* (Pharmacia, Piscataway, NJ) y se indujo la expresión de fragmentos Fab por adición de IPTG a 1 mM generalmente durante al menos 5 horas, a

excepción de que para el patrón Y se redujeron los niveles de IPTG a 0,25 mM. Tras la inducción, se recogieron las células (750 ml) por centrifugado y se liberaron los Fabs desde el espacio periplásmico por choque osmótico.

Se resuspendió el aglomerado total en 8 ml de TES enfriado con hielo (Tris 0,2 M, EDTA 0,5, sacarosa al 17,1%, pH 8,0), se transfirió a un tubo de 50 ml y se incubó durante 5 a 10 minutos en hielo con agitación suave ocasionalmente. Al mismo tiempo, se lavaron tubos vacíos con 8,8 ml TES/H₂O (1:3) para recuperar el resto del aglomerado de células y se añadió a las otras células y se incubó durante otros 20 minutos sobre hielo. Se centrifugaron las células a 14.000 rpm durante 3 minutos y se transfirió el sobrenadante desde el aglomerado de células ligeramente enlodado a otro tubo de 50 ml. Se volvió a centrifugar el sobrenadante a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar la contaminación de células residuales. El sobrenadante recibió el nombre de fracción periplásmica liberada por TES. Se resuspendió el aglomerado bacteriano en 10 ml de TES más MgSO₄ 15 mM, se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó dos veces como en el caso anterior. El sobrenadante recibió el nombre de fracción periplásmica liberada con Mg. Se añadió albúmina de suero bovino (BSA; tipo RIA, Sigma) como vehículo y estabilizante a cada fracción periplásmica hasta una concentración final de 1 mg/ml y se dializó durante toda la noche a 4°C en 2 L con 1 intercambio de tampón de columna Talon (Tris-HCl 20 mM/NaCl 0,1 M, pH 8,5) más inhibidores de proteasa a las concentraciones finales, Pefabloc 0,05 mg/ml, leupeptina 50 nM, aprotinina 0,06 µg/ml y pepstatina A 0,9 µg/ml.

Se sometieron los extractos periplásmicos que contenían Fab (liberados con TES y Mg) por separado a la unión por método discontinuo 1 hora agitando a 4°C con 0,8 ml a 1,5 ml (1/20 del volumen de extracto) de resina Talon pre-equilibrada (Clontech), a continuación lavado por método discontinuo en al menos 2 x volúmenes de 20 columnas de tampón de columna. Se cargó la columna con resina Talon, se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de columna y 2 volúmenes de columna de tampón columna más 50 mM de imidazol para liberar las proteínas unidas no específicamente. Se eluyeron los Fabs purificados con 2 a 3 volúmenes de columna de 200 mM de imidazol, 4% de glicerol. A continuación, se concentraron/intercambiaron los extractos purificados con un Centricon 10 (Amicon, Inc. Beverly, MA) en PBS, pH 7,4 hasta una concentración final de 0,5 a 5 mg/ml. Se determinó la pureza de Fab "AT" soluble en un gel Bis Tris NuPAGE Novex (San Diego, CA) al 10% con tampón de deslizamiento NuPAGE MOPS SDS (no reductor) y tampón de muestra 4x LDS (pH 8,45). Se calentaron muestras Fab purificadas que contenían el tampón de muestra LDS a 70°C durante 10 minutos y se cargaron con 40 µl/línea. Se corrió el gel a 200 voltios, 20 minutos, después se redujo a 50 voltios, ~ 1,5 horas, se manchó con Novex Colloidal Coomassie Blue Stain ~14 h, y se destiñó. Se determinó Fab "AT" soluble para que tuviera más de 98% de pureza.

Ejemplo 5

Actividad de Fabs anti-OPGbp purificadas

Se analizó la actividad de Fabs "AT" y "Y" solubles purificadas con los siguientes ensayos.

Ensayo de inhibición de la interacción OPGbp/ODAR

Se midió la interacción de OPGbp humana [143-317] y su receptor ODAR en un ensayo de transferencia de energía por fluorescencia (FRET). Se añadió una hora de pre-incubación con OPGbp para una mayor sensibilidad. Se construyó un dominio extracelular soluble de ODAR humano como polipéptido de fusión con una etiqueta FLAG amino terminal y una región Fc humana carboxi terminal. La región Fc es reconocida por y se une a alofocianina Fc específica anti-humana de cabra policlonal (APC) que es detectada por absorbancia a 665 nm. Se etiquetó OPGbp [143-317] con Eu2+ que fue detectado por absorbancia a 620 nm. La unión de OPGbp con ODAR en este ensayo impulsa una transferencia de energía fluorescente y es muy sensible para curvas de competencia. Una disminución en la relación de absorbancia A665/A620 indica la inhibición de la unión de OPGbp a ODAR.

Se observó una inhibición dependiente de concentración de la unión OPGbp-Eu con sODAR-Fc para preparaciones por duplicado de Fabs solubles "AT" y "Y". Fab "AT" soluble (preparación A) inhibió la unión de OPGbp con la fusión ODAR-Fc soluble con una IC₅₀ de 550 nM. Fab "Y" soluble la inhibió con una IC₅₀ de 6 µM. El clon de Fab "AT" 1B5 fue del patrón de 27 miembros predominante desde siete placas de 96 pocillos (todas con la misma secuencia de aminoácido) obtenidas por elución desde la diana OPGbp utilizando una solución de 1 µM OPG[22-194]-Fc durante 90 minutos. El clon de Fab "Y" 1B4 fue del patrón de 9 miembros predominante desde una placa de 96 pocillos (todas con la misma secuencia de aminoácido) desde el tamiz OPGbp depositado en placa optimizado utilizando una elución de OPGbp 1 µM durante 90 minutos. Una segunda purificación del clon de Fab "AT" 6F11 (designada preparación B) produjo una IC₅₀ similar de 440 nM para PBS y una IC₅₀ de 354 nM para TBS. Una segunda purificación de Fab "Y" (preparación B) produjo una IC₅₀ similar de 4,1 µM para TBS. El control positivo fue OPGbp [143-317] en TBS o PBS con las IC₅₀s correspondientes de 0,89 y 0,93 nM, respectivamente. De manera similar, se obtuvieron las IC₅₀ con las preparaciones "A" y "B" por duplicado. Los resultados de la preparación "B" de los Fabs "AT" y "Y" en TBS se muestran en la figura 2.

Ensayo de médula ósea

Se purificaron Fabs "AT", "Y" y "P" solubles como en el ejemplo 4 seguido de dos etapas de separación de endotoxina sucesivas utilizando una columna de afinidad de polimixina (~1 ml; BioRad, Hercules, CA) en PBS a temperatura ambiente con arreglo a las instrucciones del fabricante, a excepción de lo que se señala a continuación. Para aumentar la probabilidad de eliminación de endotoxina unida a Fab, tras cada adición de muestra, se reciclaron

partes alícuotas de 100 μ l a 150 μ l desde el fondo y la parte superior de la columna cada 5 minutos durante 2 a 2,5 horas. Se eluyó Fab con 3 volúmenes de columna de PBS con glicerol al 4%.

Se sometieron a ensayo las muestras para determinar la endotoxina utilizando el sistema de detección de E-toxato (lisado de amebocitos de limulus) (Sigma, St. Louis MO) con arreglo a las instrucciones del fabricante. A continuación, se esterilizaron por filtración las muestras (0,2 μ m). Se desnaturalizó Fab "PE" tras la purificación y se unió escasamente a OPGbp [143-317] en un ensayo ELISA. Se utilizó como control negativo en estos experimentos.

El formato de ensayo incluye una pre-incubación de 1 hora del Fab anti-OPGbp con 10 ng/ml de OPGbp humano [143-317] (concentración de células final por pocillo). Se llevaron a cabo los ensayos TRAP en solución utilizando sustrato cromogénico pNPP. En la figura 3 se muestran los resultados. Fab "AT" dio una disminución del 50% (IC_{50}) a 57,8 nM; Fab "Y" dio una disminución del 50% a 212 nM; Fab "P" dio una disminución del 50% a 1,5 μ M. Se utilizó un peso molecular de Fab estimado de 50.000 en estos cálculos para dar un factor de conversión de 1 μ g/ml = 20 nM.

Las IC_{50} tal como se determinaron por manchado histoquímico TRAP fueron similares a las determinadas en el ensayo pNPP.

Ensayo de células RAW

En la figura 4 se muestran los efectos de añadir Fabs "AT", "Y" y "P" solubles al ensayo de células RAW. El punto 50% para el gráfico fue tomado como 1,65 OD_{405} nm. Fab "AT" tiene una IC_{50} de 15 μ g/ml, 300 nM (suponiendo un peso molecular Fab de 50.000). Fab "Y" tiene una disminución de la señal a 2,15 OD_{405} desde 2,5 OD_{405} , un punto 80%. Por extrapolación, un OD_{405} al punto de 50% de 1,65 para Fab "Y" se alcanzaría a ~ 400 μ g/ml $\times 20 = \sim 8$ μ M. "P" no presenta ninguna reactividad detectable en el ensayo.

Ejemplo 6

Secuenciado y análisis de clones Fab

Las secuencias de ADN y aminoácido previstas para las cadenas ligeras de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se presentan en las figuras 5, 6, 7 y 8, respectivamente. Las secuencias de ADN y aminoácido previstas para cadenas pesadas de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se presentan en las figuras 9, 10, 11 y 12, respectivamente. La figura 13 presenta una matriz de comparación de la secuencia de aminoácido de la cadena pesada y ligera, respectivamente de los cuatro clones de patrón Fab predominantes en función de la identidad y la similitud. Se obtuvieron la identidad y similitud o bien con programa GCG o bien se calculó a mano. Las secuencias de cadena pesada de Fabs "AT" y "Y" tienen la pareja más próxima ya que difieren en un solo aminoácido (cambio conservador) y por tanto tienen una identidad de 99,6% y una similitud de 100%. Se compararon las secuencias de aminoácido de cadena ligera entre los cuatro patrones de arriba tanto la identidad como la similitud entre sí. Fabs "AT", "Y" y "P" presentaron una identidad de al menos 85% y una similitud de al menos 89%. El patrón "S" fue el más disimilar al ser de la familia lambda V más rara.

En la figura 14 se muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs). Los Fabs "AT" e "Y" tuvieron idénticas secuencias de aminoácido de cadena pesada en CDR1, CDR2 y CDR3. La CDR1 de cadena pesada de Fabs "PE" y "S" tenían 3 radicales de aminoácido idénticos a los de la secuencia CDR1 "AT" e "Y". La secuencia de CDR2 de "P" y "S" presentó una mayor identidad entre sí que con la secuencia CDR2 de "AT" e "Y". Las cadenas ligeras de Los Fabs "AT" e "Y" presentaron longitudes idénticas a las de CDR1, CDR2 y CDR3. Las CDR 1 y 3 de cadena ligera de patrones "AT" e "Y" presentaron identidad en 7 de 11 radicales (64%) y 3 de 5 radicales (60%) respectivamente. Si bien la CDR2 de cadena ligera de patrones "AT" e "Y" no presentan identidad entre sí, cada uno de ellos contiene parte de la secuencia de consenso para la CDR2 de cadena ligera. Cuando se combinaron los primeros 4 radicales del patrón "AT" con los últimos 3 radicales del patrón "Y", se obtuvo la cadena ligera CDR2 del patrón "P". La cadena ligera CDR3 puede variar de longitud desde 5 a 25 radicales. Por lo tanto, las CDR3 de cadena ligera obtenidas en los patrones "AT", "Y" y "P" es muy corta. El más único de los cuatro clones de patrón predominante fue Fab "S".

En la figura 15 se muestra una comparación de las clases Fab representadas en los cuatro patrones predominantes. Estos resultados fueron obtenidos del análisis de gráfico de ADN V-Base. Según lo esperado los Fabs "AT" e "Y" fueron de la misma familia VH1 (familia 1 pesada variable) con las mismas regiones VDJ (Variable, diversidad y unión). Los Fabs "AT" e "Y" pertenecen a diferentes familias de cadena ligera. Los Fabs "P" y "S" pertenecen a la misma familia de cadena pesada VH3, pero a diferentes familias de cadena ligera. Todas las cadenas pesadas tienen las mismas regiones de unión JH4b.

En las figuras 16-18 se muestra un alineamiento de las secuencias Fab y las secuencias de línea germinal correspondientes para las cadenas pesadas y, en las figuras 19-22 para las cadenas ligeras. Los cambios en las cadenas pesada y ligera de "AT", "Y", "P" y "S" son el resultado de metástasis somática natural que tiene lugar en las secuencias de línea germinal de anticuerpo durante la respuesta a anticuerpo. Las regiones variables de las cadenas pesadas "AT" e "Y" (Los aminoácidos 127 amino terminales de las figuras 9 y 10, respectivamente) tuvieron cambios de aminoácido 17 y 18 respectivamente, en comparación con las secuencias de línea germinal VDJ correspondientes. La región variable de la cadena pesada "P" (los aminoácidos 117 amino terminales en la figura 11) tiene los cambios de aminoácido 16 en comparación con la secuencia de línea germinal VDJ correspondiente. La región variable de la cadena pesada

“S” (los aminoácidos 124 amino terminales de la figura 12) tuvieron los cambios de aminoácido 14 en comparación con las secuencias de línea germinal. La región variable de la cadena ligera “AT” (radicales 6-108 en la figura 5) tuvo los cambios de aminoácido 16 en comparación con la secuencia de línea germinal VJ correspondiente; la cadena ligera “Y” (radicales 6-108 en la figura 6) tuvo cambios de aminoácido 14; la cadena ligera “P” (radicales 5-108 en la figura 7) tuvo los cambios de aminoácido 14; y la cadena ligera “S” (radicales 5-112 en la figura 8) tuvo los cambios de aminoácido 12. En general, las diferencias de aminoácido se dieron con mayor frecuencia en las regiones CDR3 de las cadenas tanto pesada como ligera.

Ejemplo 7

Clonación y expresión de anticuerpos OPGbp humana de longitud completa

Se convirtieron clones Fab en anticuerpos de longitud completa siguiendo los procedimientos que se indican a continuación.

Construcción de pDSR α 19:hCH

Se digirió el plasmidio pDSR α 19: EPO con Hind III y SalI para eliminar la región de codificación para eritropoyetina. Se utilizó el plasmidio pCRBLuntCH1-3 que contenía los dominios C_H1, bisagra, C_H2 y C_H3 de IgG humana insertados en el vector pCRBLunt (Invitrogen) para obtener un dominio constante IgG1 humano de 1,4 kb. Se digirió pCRBLuntCH1-3 con HindIII y SalI y se insertaron las secuencias de dominio constante en pDSR α 19 para generar pDSR α 19: hCH

Construcción de pDSR α 19: AT-VH21

Se clonaron cuatro ADNs de cadena pesada Fab anti-huOPGbp en pDSR α 19: hCH para convertir los Fabs en IgGs de longitud completa. La construcción de un plasmidio que codifica cadena pesada “AT” se describe en el presente documento. Se clonaron las otras cadenas pesadas Fab utilizando procedimientos similares. Para generar Fab con una secuencia de señal, se llevó a cabo PCR en tres etapas. En la primera, se utilizaron los cebadores 2249-25 y 2248-22 con la plantilla de ADNc Fab. Las condiciones fueron: 94°C durante 1 minuto, (95°C durante 3 segundos, 50°C durante 1 minuto, 68°C durante 1 minuto) durante 20 ciclos, 68°C durante 10 minutos, con Pfu polimerasa y el tampón y los nucleótidos apropiados. A continuación, se amplificó el producto PCR con los cebadores 2209-21 y 2248-22 seguido de la amplificación con los cebadores 2209-20 y 2248-22. Se limpió el producto PCR final, se cortó con HindIII y BsmBI, y se purificó con gel. Este fragmento contiene el Fab con un sitio 5'-Kozak (iniciación de traducción) y la siguiente señal de secuencia de señal para expresión de mamífero de la cadena pesada “AT” de Fab:

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 25)

Esta secuencia de señal se designa la secuencia de señal VH2₁.

Se digirió el plasmidio pDSR α 19: hCH con HindIII y BamBI para eliminar el poliligador antes de los dominios C_H1-3 de IgG y se insertó el producto PCR Fab para generar pDSR α 19: AT-VH21.

Cebadores:

HindIII Kozak

2209-20 5' -CAGAAGCTTAGACCACC ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC T-3'

(SEQ ID NOS: 26 Y 27)

M E W S W V F L F

2209-21 5' -G AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACG ACT GGT GTC CA-3' (SEQ ID NOS: 28 Y 29)

S W V F L F F L S V T T G V

2249-25 5' TCA GTA ACG ACT GGT GTC CAC TCA CAG GTC CAG CTG GTG CAG-3' (SEQ ID NOS: 30 Y 31)

S V T T G V H S Q V Q L V Q

BsmBI

2248-22 5' - GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTGACC AGG GTG-3' (SEQ ID NO: 32)

ES 2 307 594 T3

Construcción de pDSR α 19: AT-L

Se clonaron los ADNs de cadena ligera Fabs “AT”, “Y”, “P” y “S” en pDSR α 19 para convertir los Fab en anticuerpos de longitud completa. Se describe aquí la construcción de un plasmidio que codifica la cadena ligera “AT”. Se clonaron los otros Fab utilizando procedimientos similares. Para generar Fab “AT” con una secuencia de señal, se llevó a cabo la PCR en tres etapas. En la primera, se utilizaron los cebadores 2233-50 y 2233-51 con la plantilla de ADNc Fab. Las condiciones de PCR fueron: 94°C durante 1 minuto (95°C durante 30 segundos, 50°C durante 1 minuto, 68°C durante 2 minutos) durante 20 ciclos, 68°C durante 10 minutos con Pfu polimerasa y el tampón y los nucleótidos apropiados. A continuación, se amplificó el producto de PCR con los cebadores 2148-98 y 2233-51 seguido de la amplificación con los cebadores 2148-97 y 2233-51. Se limpió el producto PCR final, se cortó con HindIII y SalI, y se purificó con gel. Este fragmento contiene el Fab con un sitio 5' Kozak (iniciación de la traducción) y la siguiente secuencia de señal para expresión de mamífero de la cadena ligera de “AT”:

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 33)

Esta secuencia de señal se designa secuencia de señal “ligera”.

Se digirió el plasmidio pDSR α 19: EPO con HINDIII y SalI para eliminar el gen EPO antes de insertar el producto de PCR de cadena ligera de IgG para generar pDSR α 19: AT-L.

Cebadores:

HindII Kozak

2148-97 5'-CAGAAGCTTGACCACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GG-
3' (SEQ ID NO: 34 Y 35)

M D M R V P A Q L L

2148-98 5'-CC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA TTG TGG TTG AGA GGT GCC AGA
T-3' (SEQ ID NO 36-37)

A Q L L G L L L L

W L R G A R

2233-50 5'- G TGG TTG AGA GGT GCC AGA TGT CAA ATT GTG ATG ACA CAG TCT C-
3' (SEQ ID NO 38 Y 39)

W L R G A R C E I V M T Q S

sA11

2233-51 5'- TTTGGACGTCGAC TTA TTA ACA CTC TCC CCT G-3' (SEQ ID NO. 40 Y
41)

* * C E G R

Construcción de pDSR α 19: AT-tPA

Se construyeron los vectores de expresión para la producción de cadenas pesadas de longitud completa “AT”, “Y”, “P” y “S” tal como se ha descrito anteriormente, a excepción de que se modificaron los cebadores para introducir la siguiente secuencia de señal:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVFSPSRGRFRR (SEQ ID NO: 42)

Esta secuencia de señal se designa la secuencia de señal “tPA-RGR”.

Construcción de pLDH-AT

Se construyó el vector de expresión que incluía las cadenas pesada y ligera de “AT”. Se digirió el plasmidio pDSR α 19: AT-Vh21 con AatII y NdeI y se cargaron los extremos con T4 ADN polimerasa. Se purificó con gel el fragmento que contenía el cassette de expresión de cadena pesada “AT” (secuencia de codificación de cadena pesada “AT” flanqueada por el promotor y el sitio de poliadenilación desde pDSR α 19) y se ligó con pDSR α 19: AT-L que había sido linearizado con NheI, cargado con T4 ADN polimerasa y desfosforilado con fosfatasa alcalina. El cassette

de expresión de cadena pesada se encontraba en la misma orientación de transcripción que la cadena ligera y los genes DHFR.

Preparación de anticuerpo

Se transfectaron los vectores de expresión que contenían ADNc de codificación de anticuerpos de longitud completa de cadena pesada y ligera "AT", "Y", "S" y "P" (o bien en vectores separados o bien en un único vector) en células CHO y se cultivaron en condiciones que permitieron la expresión de cadenas pesada y ligera y la secreción en el medio de células. Se filtraron los medios acondicionados a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm (Corning, Acton, MA) y se aplicó a columna de sefarsa de proteína G (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) que había sido equilibrada con PBS - solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin cloruro cálcico y sin cloruro de magnesio (Gibco BRL Products, Grand Island NY). Tras la aplicación de muestra se lavó la columna con PBS hasta que la absorbencia a 280 nm alcanzó la línea de referencia. Se consiguió la elución de proteína utilizando glicina 100 mM, pH 2,5. Se recogieron fracciones y se neutralizaron inmediatamente por adición de Tris-HCl 1M, pH 9,2. Se detectaron los anticuerpos con geles de SDS-poliacrilamida visualizados por manchado Commassie.

Se distribuyeron las fracciones que contenían anticuerpo, se concentraron y se diafiltraron en PBS utilizando o bien Centricon 10 (Amicon) o bien, para volúmenes más grandes Centriprep 10 (Amicon).

El anticuerpo aislado se caracterizó por filtración de gel en Superose 6 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se demostró que corría como una IgG monomérica.

Ejemplo 8

Análisis BIAcore de Fab y unión de anticuerpo a OPGbp

Se determinaron la constante de unión (K_d), constante de velocidad de encendido (k_a) y constante de velocidad de apagado (k_d) para los Fabs "AT" e "Y" y se determinó el anticuerpo "AT" a través de técnicas de resonancia de plasmón superficial (BIAcore, Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey) cuyos resultados se muestran en la tabla II. Se prepararon Fabs tal como se ha descrito en el ejemplo 4 y se preparó anticuerpo "AT" tal como se ha descrito en el ejemplo 7. Se inmovilizó OPGbp en un CM5-chip por acoplado con amina normal. Se determinaron las constantes de velocidad y K_d con el programa informático BIOEVALUATION 3.0 (Pharmacia).

TABLA II

Análisis BIAcore de Fabs "AT" e "Y" y anticuerpo "AT"

	K_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
Fab "Y"	$9,44 \times 10^3$	$5,91 \times 10^{-3}$	594
Fab "AT"	$2,2 \times 10^6$	0,31	140
"AT" Ab (147 RU)	$5,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-3}$	0,42
"AT" Ab (80 RU)	$8,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^{-3}$	0,33
"AT" Ab (47 RU)	$7,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^{-3}$	0,43

La afinidad de unión de Fab "AT" aumentó de aproximadamente 140 nM a aproximadamente entre 0,33 y 0,43 nM, o aproximadamente 350 a 400 veces más, cuando se añadió la región constante de IgG1 Fc como se describe en el ejemplo 7.

Ejemplo 9

Actividad de anticuerpos anti-OPGbp

Ensayo de células RAW

Se sometieron a ensayo preparaciones de anticuerpo "AT" designadas 405, 406 y 407 en un ensayo de células RAW tal como se ha descrito en el ejemplo 1. "AT" 405, "AT" 406 y "AT" 407 difirieron solamente en las secuencias líder utilizadas para expresión ("AT" 405 fue expresado utilizando la secuencia de señal "ligera", "AT" 406 utilizó la secuencia de señal tPA-RGR y "AT" 407 utilizó la secuencia de señal VH21). Los anticuerpos maduros purificados fueron idénticos en cada preparación. En la figura 23 se muestran los resultados.

Las IC_{50} para “AT” 405, “AT” 406 y “AT” 407 fueron 20,1 nM, 60,3 nM y 21,4 nM, respectivamente, que corresponden a 3,0 ug/ml, 9,0 ug/ml y 3,2 ug/ml, respectivamente (presuponiendo un peso molecular de 150.000). Los controles positivos de OPG[22-194]-Fc y anticuerpo policlonal anti-OPGbp fueron a 33 ng/ml y 150 ng/ml, respectivamente.

La diferencia en IC_{50} en el ensayo de células RAW del fragmento Fab “AT” fue 300 nM en comparación con aproximadamente 20 nM para la longitud completa “AT”, o aproximadamente 15 veces más para el anticuerpo de longitud completa “AT”. Teniendo en cuenta las diferencias en las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos (150 ng/ml/60 ng/ml = 2,5 veces), el aumento en la afección de la función celular para el anticuerpo de longitud completa “AT” fue aproximadamente $15 \times 2,5 = 37,5$ veces.

Ensayo de médula ósea

En la figura 24 se muestran los efectos de la adición de preparaciones de “AT” 405 o “AT” 407 al ensayo de médula ósea murínica. Las IC_{50} para “AT” 405 y “AT” 407 fueron 2,15 ug/ml (14,4 nM) y 1,85 ug/ml (12,5 nM), respectivamente (peso molecular = 150.000). Un anticuerpo policlonal anti-OPGbp de rata inhibió la formación TRAP con una IC_{50} de ~50 ng/ml.

En un experimento por separado, se sometió a ensayo “AT” 406 en el ensayo de co-cultivo de médula ósea e inhibió la formación TRAP con una IC_{50} de 2,35 ug/ml (14,4 nM) asumiendo un peso molecular de anticuerpo de 150.000 (ver figura 25).

La diferencia en la IC_{50} en el ensayo de médula ósea para el fragmento Fab “AT” fue aproximadamente 50 nM en comparación con aproximadamente 13 nM para anticuerpo de longitud completa “AT” o un aumento de 3,85 veces más. Teniendo en cuenta las diferencias de las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos (50 nM/9 nM = 5,55 veces), la ganancia aproximada de afección de función celular a partir del anticuerpo de longitud completa “AT” fue aproximadamente $3,85 \times 5,55 = 21,4$ veces.

Se fusionaron también ADNc que codificaban Fab “Y”, “P” y “S” para secuencias CH1, CH2, y CH3 de IgG1 humana tal como se describe en el ejemplo 7 y se transfectaron en células CHO. Se expresaron los anticuerpos resultantes y se purificaron desde medio acondicionado y se eliminó la endotoxina como en el caso anterior. Se sometieron a ensayo los anticuerpos de cadena ligera “S” e “Y” (que recibieron el nombre de “S ligero” e “Y ligero”) en el ensayo de médula ósea, mostrándose los resultados en la figura 26. Los anticuerpos “S ligero” e “Y ligero” fueron expresados utilizando las secuencias líder de cadena ligera correspondientes y se designaron “S” 435 e “Y” 429 respectivamente. “Y” 429 (“Y ligero”) tenía una IC_{50} de 23 ug/ml o 154 nM. “S” 435 (“S ligero”) no presentó suficiente actividad para una determinación de una IC_{50} .

“Y Campath” y “P ligero” fueron la secuencia Hu-IgG1 “Y” y “P”, respectivamente, con la secuencia líder para la cadena “Campath” y “ligera” y se designaron “Y” 442 y “P” 444, respectivamente. “Y” 442 (“Y Campath”) tenía una IC_{50} de 20 ug/ml o 134 nM. “P” 444 (“P ligera”) no presentó una actividad detectable (ver figura 27).

La diferencia en la IC_{50} en el ensayo de la médula ósea del fragmento “Y” Fab fue 212 nM en comparación con 134-154 nM para el anticuerpo de longitud completa “Y” o un aumento de aproximadamente 1,38 a 1,58 veces. Teniendo en cuenta las diferencias de las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos (50 nM/9 nM = 5,55 veces), la ganancia aproximada en la afección de la función celular desde “Y” Fab a anticuerpo de longitud completa “Y” fue aproximadamente $(1,38 \text{ a } 1,58) \times 5,55 = 7,7 \text{ a } 8,8$ veces o aproximadamente 8 veces más.

Ejemplo 10

Identificación de epítipo para anticuerpo “AT” sobre OPGbp

Producción de OPGbp murínica variante

Se produjo OPGbp [143-317] humana tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Se produjo OPGbp [158-316] murínica que contenía los radicales de aminoácido 158 a 316 tal como se muestra en la figura 1 de PCT WO 98/46751 precedido de un radical de metionina N-terminal introducido en *E. coli* y se purificó desde la fracción soluble de bacterias, tal como se ha descrito anteriormente (Lacey y cols., Cell. 93, 165-176 (1998)). Se generó OPGbp[158-316] FLAG-murínico por introducción de radicales de ácido nucleico que codificaban una metionina N-terminal seguido de una secuencia de etiqueta FLAG (DYKDDDDKKL (SEQ ID NO: 99)) fusionada con el término N de los radicales 158-316, tal como se muestra en la figura 1 de PCT WO 98/46751 utilizando métodos conocidos entre las personas especializadas en este campo. Se clonó la molécula FLAG-OPGbp [158-316] en el vector de expresión de bacteria pAMG21 (depositado en la American Type Culture Collection que tenía el número de acceso 98113).

Se construyó una variante de polipéptido OPGbp [158-316] FLAG-murínica en la que se habían sustituido los radicales de aminoácido SVPTD en las posiciones 229-233 inclusive, tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) de WO 98/46751 con los radicales de aminoácido correspondientes DLATE en las posiciones 230-234 inclusive, tal como se muestra en la figura 4 (SEQ ID NO: 3) de WO 98/46751. El constructo resultante que se denomina “OPGbp [158-316]/DE FLAG-murínico” tiene la secuencia de ácido nucleico y proteína que se muestra en la figura 28. Los

cambios en la secuencia de aminoácido se localizan en una región de OPGbp comprendida entre las regiones D y E. La figura 29 presenta una comparación de las secuencias de aminoácido murínica, humana, y variante DE murínica en esta región. Los cambios de secuencia en la variante murínica son S229D, V230L, P231A y D233E con la T en la posición 234 invariable. Las secuencias de flanqueo en esta región son virtualmente idénticas entre OPGbp murínica y humana.

Se construyó esta molécula utilizando una reacción PCR de dos etapas, comprendiendo la primera etapa dos reacciones PCR por separado, designadas reacción A y reacción B. tanto para la reacción A como para la reacción B se utilizó ADN OPGbp[158-316] pAMG21-FLAG murínico como plantilla para PCR. La reacción A empleó oligonucleótidos #2640-90 y #2640-91 para PCR, mientras que la reacción B empleó oligonucleótidos #2640-92 y 2640-93. Se llevó a cabo el termociclado y se purificaron los productos de PCR de las reacciones A y B desde un gel de agarosa aplicando los métodos disponibles en la especialidad. La reacción de PCR en segunda etapa, designada reacción C, empleó productos de PCR de reacción A y reacción B purificados como plantilla y oligonucleótidos #2640-90 y #2640-93 como cebadores. Tras el termociclado, se clonó el producto de la reacción C en vector de clonación pCRII-TOPO (Invitrogen) y se electroporó en células DH10b (Gibco) utilizando los métodos proporcionados por el fabricante. Se seleccionaron clones y se confirmó la secuencia que verificaba que las mutaciones introducidas tenían como resultado un cambio de la secuencia de aminoácido SVPTD en OPGbp [158-316] murínica en DLATE. La secuencia verificó que se había digerido entonces ADN con NdeI y XhoI, se había purificado y se había subclonado en el vector de expresión bacteriana pAMG21 para dar lugar al plásmido pAMG1-FLAG-murínico OPGbp[158-316]/DE.

2640-90: CCTCTCATATGGACTACAAGGAC (SEQ ID NO: 100)

2640-91: AGTAGCCAGGTCTCCCGATGTTTCATGATG (SEQ ID NO: 101)

2640-92: CTGGCTACTGAATATCTTCAGCTGATGGTG (SEQ ID NO: 102)

2640-93: CCTCTCCTCGAGTTAGTCTATGTCC (SEQ ID NO: 103)

Se cultivó el huésped GM94 de *E. coli* (depositado en la American Type Culture Collection con el número de acceso 202173) que contenía el plásmido pAMG21-FLAG-murínico OPGbp [158-316]/DE en medio 2x YT hasta una fase de crecimiento exponencial y se indujo para que expresara proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica por adición de autoinductor *v. Fisheri* sintético a 100 ng/ml. Aproximadamente 3-6 horas después de la inducción, se aglomeraron las células y se purificó proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG murínica recombinante desde la fracción soluble de *E. coli* utilizando los métodos descritos en Lacey y cols. *ibid*.

Unión de anticuerpo "AT" a OPGbp[143-317] humana, OPGbp[158-316] murínica y OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica

Se recubrieron placas Costar E.I.A./R.I.A. (Flat Bottom High Binding, Cat. # 3590) con 100 µl/pocillo de proteína OPGbp[143-317] humana, proteína OPGbp[158-316] murínica y proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica a 3 µg/ml en PBS, durante toda la noche a 4°C con agitación. Tras toda la noche de incubación, se sacaron las soluciones de proteína de la placa y se añadieron 200 µl de suero de pollo al 5% (Gibco/BRL cat # 16110-082) en PBST (PBS más 0,05% Tween 20) a cada pocillo de la placa y se incubaron las placas a temperatura ambiente (RT) durante 90 minutos con agitación. Tras la incubación y el bloqueo se lavaron las placas 4 veces con solución de lavado 1 X K-P en dH₂O (cat# 50-63-00, Kirkegaard & Perry Laboratories) y se secaron. Se diluyó en serie el anticuerpo "AT" purificado o la proteína OPG[22-194]-Fc humana 1:1 desde 2 µg/ml descendientemente hasta 1,953 ng/ml en PBST y se añadieron 100 µl/pocillo a los pocillos apropiados de la placa de microvaloración recubierta con proteína OPGbp[143-317] humana, OPGbp[158-316] murínica o OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica. Se incubaron las placas durante tres horas a temperatura ambiente, con agitación, se lavaron cuatro veces con solución de lavado 1 x K-P y se secaron. Se diluyó IgG anti-humana de cabra (Fc) (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-036-098) 1:5000 en suero de pollo al 5% en PBST y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 1,25 horas a temperatura ambiente con agitación, se lavaron seis veces con solución de lavado 1 X K-P y se secaron. Se añadieron 100 µl de sustrato ABTS sin diluir (Kirkegaard & Perry; cat # 50-66-00) a cada uno de los pocillos y se incubó el plato a temperatura ambiente hasta que se reveló suficiente color azul-verde. Se detuvo el revelado del color por adición de 100 µl % SDS. Se llevó a cabo la cuantificación del revelado de color utilizando una lectora de placa de microvaloración con detección a 405 nm.

En la figura 30 se muestran los resultados de EIA. El anticuerpo "AT" se une a OPGbp[143-317] humana pero no muestra una unión detectable a OPGbp [158-316] murínica por encima del intervalo de concentración analizado. No obstante, el anticuerpo "AT" se une tanto a OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica como OPGbp[143-317] humana en las condiciones de ensayo mencionadas. Se concluyó que los cambios de aminoácido en OPGbp[158-316]/DE murínica en comparación con OPGbp[158-316]/DE murínica tenían relación con la unión de anticuerpo "AT".

Se sometió a ensayo OPGbp[143-317]/DE FLAG-murínico para determinar la actividad en el ensayo de células RAW tal como se ha descrito en el ejemplo 1 y se observó que tenía ED50 similar para la formación de osteoclasto

ES 2 307 594 T3

con respecto a OPGbp[143-317] humana, lo que indica que la variante DE es activa para promover la actividad de osteoclasto *in vitro*. Por consiguiente, la unión de anticuerpo "AT" a OPGbp[158-316]/DE murínica probablemente inhibe la formación de osteoclasto.

El epítipo del anticuerpo "AT" está localizado en una región de OPGbp humana que incluye al menos radicales de aminoácido DLATE (radicales 230 a 234 de OPGbp humana tal como se muestra en la figura 4 de PCT WO98/46751).

Ejemplo 11

Construcción de variantes de Fab "AT" y variantes de anticuerpo

Se utilizaron tres métodos para generar variantes CDR de anticuerpo "AT"; mutagénesis de exploración de alanina de la región CDR3 de cadena pesada; mutagénesis de sustitución de sitios seleccionados en la región CDR3 de cadena pesada y mutagénesis de inserción de la región CDR3 de cadena ligera.

Variantes de alanina de CDR3 de cadena pesada

Se llevó a cabo la mutagénesis de exploración de alanina en la región CDR3 de la cadena pesada AT. La secuencia de aminoácido para la exploración de alanina fue:

DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 104)

Se sometieron a anelación los cebadores 12 y 15 entre sí y se extendieron por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en las siguientes condiciones: 25 pmoles para cada cebador, 6 ciclos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 55°C y 20 segundos a 74°C.

12) 5' AGA GAT TCC TCA AAT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA GCG
(SEQ ID NO: 105)

15) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT TCC CCG AAC
(SEQ ID NO: 106)

El producto de esta reacción recibe el nombre de plantilla A.

Se extendió la plantilla A por PCR utilizando los cebadores 22 y 14 en las siguientes condiciones: 0,5 microlitros de plantilla A, 10 pmoles cada cebador, 15 ciclos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 43°C, 20 segundos a 74°C.

11) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC TCA AAT ATG
(SEQ ID NO: 107)

14) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA GTA CGC
(SEQ ID NO: 108)

El producto PCR de esta reacción recibe el nombre de plantilla B.

Se generaron variantes de alanina de CDR3 utilizando la plantilla A o la plantilla B. Se realizaron dos vueltas de PCR (20 ciclos de 94°C durante 20 segundos y 74°C durante 40 segundos) utilizando un cebador que contenía el codón alanina deseado. El cebador que contenía el codón de alanina se encontraba en la orientación de avance para los radicales CDR3 (la numeración sigue el sistema Kabat, ver Kabat y cols., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 4ª edición (1991) D95, S96, V100, R100a. El cebador que contenía el codón de alanina se encontraba en la orientación invertida para los radicales S97, N98, M99, G100b, I100c, I100d, I100e, Y100g, Y100h, F100i, D101, Y102.

A continuación, se realizaron las reacciones de mutagénesis con hasta tres reacciones de extensión utilizando seis cebadores comunes. Estas reacciones extendieron el producto para abarcar toda la región CDR3 hasta los sitios de restricción de flanqueado únicos BgqII y BstEII, e incluyéndolos.

ES 2 307 594 T3

A continuación, se muestran los cebadores para la sustitución de alanina en la orientación 5' a 3'. El codón de alanina aparece en negrita.

5 60) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA **GCT** TCC TCA AAT ATG GTT CGG
(SEQ ID NO: 109)

10 59) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT **GCC** TCA AAT ATG GTT CGG
(SEQ ID NO: 110)

15 58) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT **TGC** GGA ATC TCT CGC ACA
GTA (SEQ ID NO: 111)

57) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT **AGC** TGA GGA ATC TCT CGC ACA
(SEQ ID NO: 112)

20 56) 5' AAT AAT TCC CCG AAC **GGC** ATT TGA GGA ATC TCT CGC (SEQ
ID NO: 113)

25 55) 5' GAT TCC TCA AAT ATG **GCT** CGG GGA ATT ATT ATA GCG (SEQ
ID NO: 114)

54) 5' GAT TCC TCA AAT ATG GTT **GCC** GGA ATT ATT ATA GCG TA
(SEQ ID NO: 115)

30 53) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT **TGC** CCG AAC CAT
ATT TGA (SEQ ID NO: 116)

35 52) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT **GGC** TCC CCG AAC CAT
ATT (SEQ ID NO: 117)

51) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT **GGC** AAT TCC CCG AAC CAT
(SEQ ID NO: 118)

40 50) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC **TGC** AAT AAT TCC CCG AAC (SEQ
ID NO: 119)

45 20) 5' GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA **GGC** CGC TAT AAT
AAT TCC (SEQ ID NO: 120)

50 19) 5' GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA **AGC** GTA CGC TAT AAT
AAT TCC (SEQ ID NO: 121)

18) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC **AGC** ATA GTA CGC TAT
55 AAT (SEQ ID NO: 122)

17) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA **GGC** AAA ATA GTA CGC TAT
(SEQ ID NO: 123)

60 16A) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA **GGC** GTC AAA ATA GTA CGA TAT
(SEQ ID NO: 124)

65

ES 2 307 594 T3

A continuación se muestran los seis cebadores comunes para PCR de extensión. Las secuencias de los sitios BglII (hebra superior) BstEII (hebra inferior) de flanqueo se muestran en negrita.

Cebadores comunes directos

10) 5' AGT CTG **AGA TCT** GAA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG
AGA (SEQ ID NO: 125)

11) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC TCA AAT ATG (SEQ ID
NO: 126)

12) 5' AGA GAT TCC TCA AAT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA GCG
(SEQ ID NO: 127)

Cebadores comunes inversos

13) 5' CTT GAG ACG **GTG ACC** AGG GTG CCC TGG CCC CA (SEQ ID NO:
128)

14) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA GTA CGC (SEQ
ID NO: 129)

15) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT TCC CCG AAC (SEQ
ID NO: 130)

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 307 594 T3

En la tabla que se muestra a continuación, se indican los pares de cebador y plantilla de partida utilizados en secuencia para construir fragmentos de ADN sintéticos que contienen radicales de alanina sustituidos.

TABLA III

Radical CDR	Plantilla	Reacciones PCR Para cebador de alanina	Cebadores de extensión	Cebadores de extensión	Cebadores de extensión
D95	A	60 + 14	10 + 13		
S96	A	59 + 14	10 + 13		
S97	B	10 + 58	10 + 15	10 + 14	10 + 13
N98	B	10 + 57	10 + 15	10 + 14	10 + 13
M99	B	10 + 56	10 + 15	10 + 14	10 + 13
V100	A	55 + 14	10 + 14	10 + 13	
R100a	A	54 + 14	10 + 14	10 + 13	
G100b	A	11 + 53	10 + 14	10 + 13	
I100c	A	11 + 52	10 + 14	10 + 13	
I100d	A	11 + 51	10 + 14	10 + 13	
I100e	A	11 + 50	10 + 14	10 + 13	
Y100g	B	11 + 20	10 + 13		
Y100h	B	11 + 19	10 + 13		
F100i	B	11 + 18	10 + 13		
D101	B	11 + 17	10 + 13		
Y102	B	11 + 16a	10 + 13		

Para los cebadores utilizados para la exploración de alanina, las condiciones de PCR fueron 20 ciclos a 94°C durante 20 segundos, a continuación 74°C durante 40 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 + 15, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 42°C durante 1 minuto 30 segundos, 74°C durante 20 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 a 14, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 48-50°C durante 1 minuto 30 segundos, 74°C durante 20 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 a 13, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 64°C durante 1 minuto 30 segundos, 74°C durante 20 segundos. Se digirieron los productos de PCR con las enzimas de restricción BglII y BstEII y se clonaron en FabAT que había sido digerido con BglII y BstEII, reemplazando así la CDR3 de AT con la CDR3 sustituida de alanina. Se verificaron los constructos sustituidos con alanina por secuenciado con ADN.

Variantes de sustitución de CDR3 de cadena pesada

Se utilizó una estrategia similar a la utilizada para la mutagénesis de exploración de alanina para la aleatorización de las posiciones S96, S97 y N98 de la CDR3 de "AT" de cadena pesada. Se generaron las plantillas A y B tal como se ha descrito previamente. Se aleatorizaron las posiciones 96, 97 y 98 con un grupo de cuatro cebadores para cada posición. Las posiciones entre paréntesis tienen nucleótidos variables tal como queda indicado.

ES 2 307 594 T3

para la posición S96

23) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA G(AT) (ACGT) ATC TCT
CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 131)

24) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA G(CG) (ACGT) ATC TCT
CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 132)

25) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA CT (CGT) ATC TCT CGC
ACA GTA (SEQ ID NO: 133)

26) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA C(A) (AT) ATC TCT CGC
ACA GTA (SEQ ID NO: 134)

Para la posición S97

27) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT G(AT) (ACGT) GGA ATC TCT
CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 135)

28) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT G(CG) (ACGT) GGA ATC TCT
CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 136)

29) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT CT(CGT) GGA ATC TCT CGC
ACA GTA (SEQ ID NO: 137)

30) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT C(A) (AT) GGA ATC TCT CGC
ACA GTA (SEQ ID NO: 138)

Para la posición N98

31) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT G(AT) (ACGT) TGA GGA ATC TCT
CGC ACA (SEQ ID NO: 139)

32) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT G(CG) (ACGT) TGA GGA ATC TCT
CGC ACA (SEQ ID NO: 140)

33) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT CT(CGT) TGA GGA ATC TCT CGC
ACA (SEQ ID NO: 141)

34) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT C(AC) (AT) TGA GGA ATC TCT CGC
ACA (SEQ ID NO: 142)

Se realizaron las reacciones de PCR utilizando el cebador de aleatorización inversa y el cebador 10. Se extendió el producto resultante con cuatro reacciones PCR sucesivas utilizando los pares de cebadores 10 + 15, 10 + 14, 10 + 13 y 10 + 22. Se amplificó el extremo 5' de la región variable de cadena pesada de "AT" a partir de un clon de longitud completa de la región variable de cadena pesada "AT" utilizando los cebadores 16 y 72. Se purificaron con gel todos los productos PCR. Se solaparon los productos de aleatorización con el producto 16/72, siendo los cebadores de flanco 16 y 22. A continuación, se clonó la región variable de longitud completa en un vector que contenía la región constante IgG1 como un fragmento HindIII/BsmBI. Se seleccionaron los clones de anticuerpo de longitud completa por secuenciado.

ES 2 307 594 T3

Los cebadores utilizaron la PCR de superposición para aletorización de mutantes

10 5' AGT CTG AGA TCT GAA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA
5 (SEQ ID NO: 143)

10 16 5' CAG CAG AAG CTT AGA CCA CCA TGG ACA TGA GGG TCC CCG CTC
AGC TCC TGG G (SEQ ID NO: 144)

15 72 5' CAC AGC CGT GTC TTC AGA TCT CAG ACT GCG CAG CTC (SEQ ID
NO: 145)

20 22 5' GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTG (SEQ ID NO:
146)

25 Se convirtieron las variantes S96A, S97A y N98A desde Fabs a anticuerpos de longitud completa por amplificación por PCR del clon Fab que tenía la secuencia de señal bacteriana reemplazada con una secuencia de señal de mamífero. Se utilizó el ADN de plasmidio del Fab que contenía la mutación deseada como plantilla. Los pares de cebador en secuencia utilizados fueron 21 + 22, 98 + 22 y 16 + 22. Se seleccionaron clones correctos por análisis de secuencia de ADN.

30 Se generaron variantes de alanina múltiples (S96A, S97A; S96A, N98A; S97A, N98A y S96A, S97A y N98A) utilizando el plasmidio de IgG1 de longitud completa de cadena pesada de AT como platilla. Se llevaron a cabo las reacciones PCR iniciales con uno de los cebadores enumerados a continuación y el cebador 22. A continuación, se extendieron estos productos utilizando pares de cebador 10 + 22. A continuación, se solapó ese producto con el
35 producto 16/72 utilizando cebadores de flanqueo 16 y 22, y se clonaron en la región constante de IgG1 como en el caso anterior. Se seleccionaron clones correctos por análisis de secuencia de ADN.

40 S96A, S97A

63) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC GCA AAT ATG GTT CGG
45 GGA ATT ATT (SEQ ID NO: 147)

50 S96A, N98A

64) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC TCA GCT ATG GTT CGG
55 GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 148)

60 S97A, N98A

65) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC GCA GCT ATG GTT CGG
65 GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 149)

ES 2 307 594 T3

S96A, S97A, N98A

66) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC GCA GCT ATG GTT CGG
GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 150)

21) 5' GTG GTT GAG AGG TGC CAG ATG TCA GGT CCA GCT GGT GCA G
(SEQ ID NO: 151)

98) 5' CCG CTC AGC TCC TGG GGC TCC TGC TAT TGT GGT TGA GAG
GTG CCA GAT (SEQ ID NO: 152)

Variantes de inserción de la región CDR3 de cadena ligera

La CDR3 de cadena ligera de AT contiene un bucle de cinco aminoácidos que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09). Se construyeron las variantes de secuencia de CDR3 de cadena ligera del siguiente modo. Se utilizaron los siguientes cebadores para PCR utilizando un plasmidio que contenía ADNc de cadena ligera "AT" Fab como plantilla:

(HincII)CCG GTC AAC ACA CT(ACGT) (ACGT) (GT)G CGG CGG CGC GGG
CGT TCG GCC AAG GG (SEQ ID NO: 153)

indicando (ACGT) cuatro bases mixtas en esta posición.

CCG GGC GCG CCT TAT TAA CAC TC(AscI) (SEQ ID NO: 154)

El producto PCR resultante tenía una secuencia de bucle CDR3 aumentada de cinco a nueve aminoácidos y cambió desde QHTRA a GHTXAAARA pudiendo ser X cualquier aminoácido. Se digirió un clon de AT con digestión HincII y AscI y se reemplazó la región CDR3 de cadena ligera de "AT" con la secuencia variante. Se aislaron los clones que contenían los veinte radicales de aminoácido en la posición X junto con tres radicales de alanina insertados en el bucle CDR3 y se confirmó su identidad por secuenciado de ADN.

Purificación y variantes Fab

Se produjeron variantes de sustitución de alanina de la CDR3 de cadena pesada y variantes de inserción de CDR3 de cadena ligera y se purificaron como fragmentos Fab a través del siguiente procedimiento. Se cultivó cada variante en 50 ml de 2XYT con glucosa al 2% y 100 µg/ml de ampicilina al mismo tiempo que se agitaba a 37°C hasta un OD₆₀₀ de 0,8-1,0. A continuación, se centrifugó cada cultivo y se resuspendió en 50 ml de 2XYT con 100 µg/ml de ampicilina con 1 mM IPTG a 30°C para inducir la producción de Fabs solubles. A continuación, se desplazaron las Fab solubles al área periplásmica y se concentraron durante toda la noche antes de la liberación por choque osmótico. Se llevó a cabo el choque osmótico por lavado de las células con solución de sacarosa 0,5 M fría en tampón Tris y EDTA para romper la pared celular bacteriana y a continuación, por dilución rápida en solución fría de concentración osmótica baja. Se purificaron las Fabs solubles diluidas por cromatografía de afinidad de metal TALON a través de 6 x radicales etiquetados con His en la Fab expresada. Se eliminaron las impurezas por lavado con NaCl y concentraciones de imidazol más bajas antes de eluir la proteína con imidazol. Se analizó la expresión y purificación de cada mutante con manchas de reducción, no reducción y de Western anti-His. Se determinó la concentración de proteína total por A₂₈₀.

Ejemplo 12

Análisis BIAcore de variantes "AT"

Se determinaron la constante de unión (K_d) la constante de velocidad de encendido (K_a) y la constante de velocidad de apagado (k_d) para las variantes de anticuerpo "AT" y la constante de velocidad de apagado (K_d) para las variantes Fab "AT" por técnicas de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) utilizando OPGbp [143-317] inmovilizada. En las tablas IV -VIII se muestran los resultados. Las variantes CDR3 de cadena ligera descritas en el ejemplo 11 no muestran una unión detectable.

ES 2 307 594 T3

TABLA IV

Análisis BIAcore de Fabs "AT" desde mutagénesis de exploración de alanina de CDR3 de cadena pesada

	Kd(s ⁻¹)
AT (alaninas no sustituidas)	0,284
D95A	sin unión detectable
S96A	7,20 x10 ⁻³
S97A	6,20x10 ⁻³
N98A	1,20x10 ⁻²
M99A	1,12
V100A	0,261
R(100a)A	0,303
G(100b)A	0,657
I(100c)A	0,53
I(100d)A	0,622
I(100e)A	6,90x10 ⁻³
A(100f)	0,197
Y(100g)A	7,4x10 ⁻²
Y(100h)A	0,368
F(100i)A	0,251
D110A	0,127
Y111A	0,414

ES 2 307 594 T3

TABLA V

Análisis BIAcore de Abs "AT" de mutagénesis de exploración de alanina de CDR3 de cadena pesada

	$K_a \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$K_d \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_D \text{ (nm)}$
AT	$1,70 \times 10^5$	$2,00 \times 10^{-3}$	1,18
S96A	$2,60 \times 10^5$	$6,40 \times 10^{-2}$	2,50
S97A	$5,30 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-3}$	2,90
N98A	$1,30 \times 10^5$	$9,00 \times 10^{-3}$	0,67
S96A, S97A	$3,17 \times 10^5$	$2,84 \times 10^{-3}$	8,90
S97A, N98A			Unión no detectable
S96A, S97A, N98A			Unión no detectable
S96A, N98A			Unión no detectable

TABLA VI

Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituido en S96 de CDR3 de cadena pesada

	$K_n \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$K_d \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_D \text{ (nM)}$
S96F	$3,17 \times 10^5$	$2,68 \times 10^{-3}$	8,45
S96Q	$1,16 \times 10^5$	$3,59 \times 10^{-3}$	3,09
S96M	$3,57 \times 10^5$	$8,70 \times 10^{-3}$	2,43
S96V	$5,37 \times 10^5$	$1,21 \times 10^{-3}$	2,25
S96I	$2,99 \times 10^5$	$4,66 \times 10^{-3}$	1,56
S96N	$1,40 \times 10^5$	$2,15 \times 10^{-3}$	1,53
S96P	$1,45 \times 10^5$	$1,88 \times 10^{-3}$	1,29
S96W	$1,61 \times 10^5$	$2,03 \times 10^{-3}$	1,26
S96T	$3,14 \times 10^5$	$1,67 \times 10^{-3}$	0,53
S96D	$2,28 \times 10^5$	$1,18 \times 10^{-3}$	0,51
S96R	$6,97 \times 10^5$	$2,62 \times 10^{-3}$	0,38
S96E	$2,54 \times 10^5$	$9,01 \times 10^{-3}$	0,35
S96K	$4,55 \times 10^5$	$1,41 \times 10^{-3}$	0,31
S96L	$5,84 \times 10^5$	$1,75 \times 10^{-3}$	0,30
S96H	$4,12 \times 10^5$	$7,64 \times 10^{-3}$	1,86
S96G	$3,87 \times 10^5$	$1,50 \times 10^{-3}$	3,85
S96Y	$2,75 \times 10^5$	$1,85 \times 10^{-3}$	0,67

ES 2 307 594 T3

TABLA VII

Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituidas en S97 de CDR3 de cadena pesada

	K_n ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
S97F			unión no detectable
S97Y			unión no detectable
S97G			Unión no detectable
S97W			Unión no detectable
S97D			Unión no detectable
S97E	Rápido conectado	Rápido desconectado	1940
S97R	$4,09 \times 10^5$	$1,18 \times 10^{-1}$	28,90
S97P	$1,10 \times 10^5$	$2,69 \times 10^{-2}$	24,50
S97M	$2,33 \times 10^5$	$2,90 \times 10^{-2}$	12,40
S97Q	$7,30 \times 10^5$	$5,98 \times 10^{-3}$	8,19
S97N	$8,95 \times 10^5$	$4,11 \times 10^{-3}$	4,59
S97H	$8,39 \times 10^5$	$2,48 \times 10^{-3}$	3,00
S97T	$4,63 \times 10^5$	$1,16 \times 10^{-3}$	2,51
S97V	$3,04 \times 10^5$	$3,58 \times 10^{-3}$	1,18
S97L	$7,50 \times 10^5$	$6,90 \times 10^{-3}$	0,92
S97I	$2,10 \times 10^6$	$1,80 \times 10^{-3}$	0,87
S97K	$1,45 \times 10^7$	$5,78 \times 10^{-3}$	0,40

TABLA VIII

Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituidas en N98 de CDR3 de cadena pesada

	K_n ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
N98K			Unión no detectable
N98F	$3,70 \times 10^3$	$9,90 \times 10^{-2}$	26600
N98Y	$2,72 \times 10^5$	$1,12 \times 10^{-2}$	41,30
N98M	$2,96 \times 10^5$	$8,14 \times 10^{-2}$	27,50
N98T	$2,46 \times 10^5$	$6,62 \times 10^{-2}$	26,90
N98G	$2,30 \times 10^5$	$5,59 \times 10^{-3}$	24,30
N98I	$5,68 \times 10^5$	$4,36 \times 10^{-3}$	7,60
N98W	$2,62 \times 10^5$	$7,68 \times 10^{-3}$	2,93
N98E	$2,72 \times 10^5$	$3,59 \times 10^{-3}$	1,32
N98P	$1,51 \times 10^5$	$1,71 \times 10^{-3}$	1,13
N98H	$2,20 \times 10^5$	$2,34 \times 10^{-3}$	1,06
N98L	$1,48 \times 10^5$	$1,22 \times 10^{-3}$	0,82
N98Q	$1,86 \times 10^5$	$1,51 \times 10^{-3}$	0,81
N98S	$2,67 \times 10^5$	$1,54 \times 10^{-3}$	0,58
N98D	$6,85 \times 10^5$	$3,12 \times 10^{-3}$	0,46
N98V	$4,56 \times 10^5$	$1,97 \times 10^{-4}$	0,43
N98R	$3,59 \times 10^5$	$1,08 \times 10^{-3}$	0,30

Si bien la invención ha sido descrita en los que se refiere a los modos de realización preferibles, debe entenderse que las personas especializadas en este campo podrán pensar en variaciones y modificaciones de la misma. Por consiguiente, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas dichas variaciones equivalentes que entran dentro del marco de la invención, tal como se reivindica.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que reconoce un epítipo DE en proteína de unión a osteoprotege-
rina humana (OPGbp),

a) siendo el epítipo DE un epítipo que comprende una porción de la secuencia de aminoácido de la región DE de OPGbp humana desde el radical de aminoácido 212 hasta el radical de aminoácido 250 de la secuencia

GFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIP, y

b) comprendiendo el epítipo DE la secuencia DLATE.

2. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1, que se une a OPGbp murínica que comprende las sustituciones de aminoácido S229D, V230L, P231A, y D233E, pero que no se une a OPGbp murínico que carece de dichas sustituciones.

3. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1, que inhibe la formación o activación de osteoclastos.

4. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1, que inhibe la resorción ósea.

5. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, comprendiendo la cadena ligera la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 43 y comprendiendo la cadena pesada la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 51.

6. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno según las reivindicación 1 a 5 que es un anticuerpo humano o humanizado, CDR injertado o quimérico.

7. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o dominio de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 6.

8. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.

9. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 8.

10. La célula huésped según la reivindicación 9, que es una célula CHO.

11. Un método para producir un anticuerpo que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 10 en condiciones que permitan la expresión de la molécula de ácido nucleico.

12. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 6, que se selecciona entre IgG, IgM, IgA, IgE e IgD.

13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en el que el isotipo es IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.

14. Una composición que comprende el anticuerpo o dominio de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Uso de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la formación o activación de osteoclasto.

16. Uso de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la resorción ósea.

17. Uso de un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar la pérdida de masa ósea.

18. El uso de la reivindicación 17, siendo la pérdida de masa ósea resultado de osteoporosis, metástasis de cáncer de huesos; artritis reumatoide, hipercalcemia de malignidad y osteoporosis inducida por esteroide.

19. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, administrándose además una composición que comprende al menos un agente anti-resortivo óseo.

20. El uso de la reivindicación 19, siendo el agente anti-resortivo un estrógeno, un fوسفonato, un modulador receptor de estrógeno selectivo.

21. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, administrándose además una composición que comprende un agente anabólico.

ES 2 307 594 T3

22. El uso de la reivindicación 21, siendo el agente anabólico una hormona paratiroides o un complejo de factor de crecimiento de tipo insulina y una proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina.

23. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, administrándose además un inhibidor de interleucina-1 o un inhibidor de factor alfa de necrosis de tumor.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

figura 1
Fago ELISA

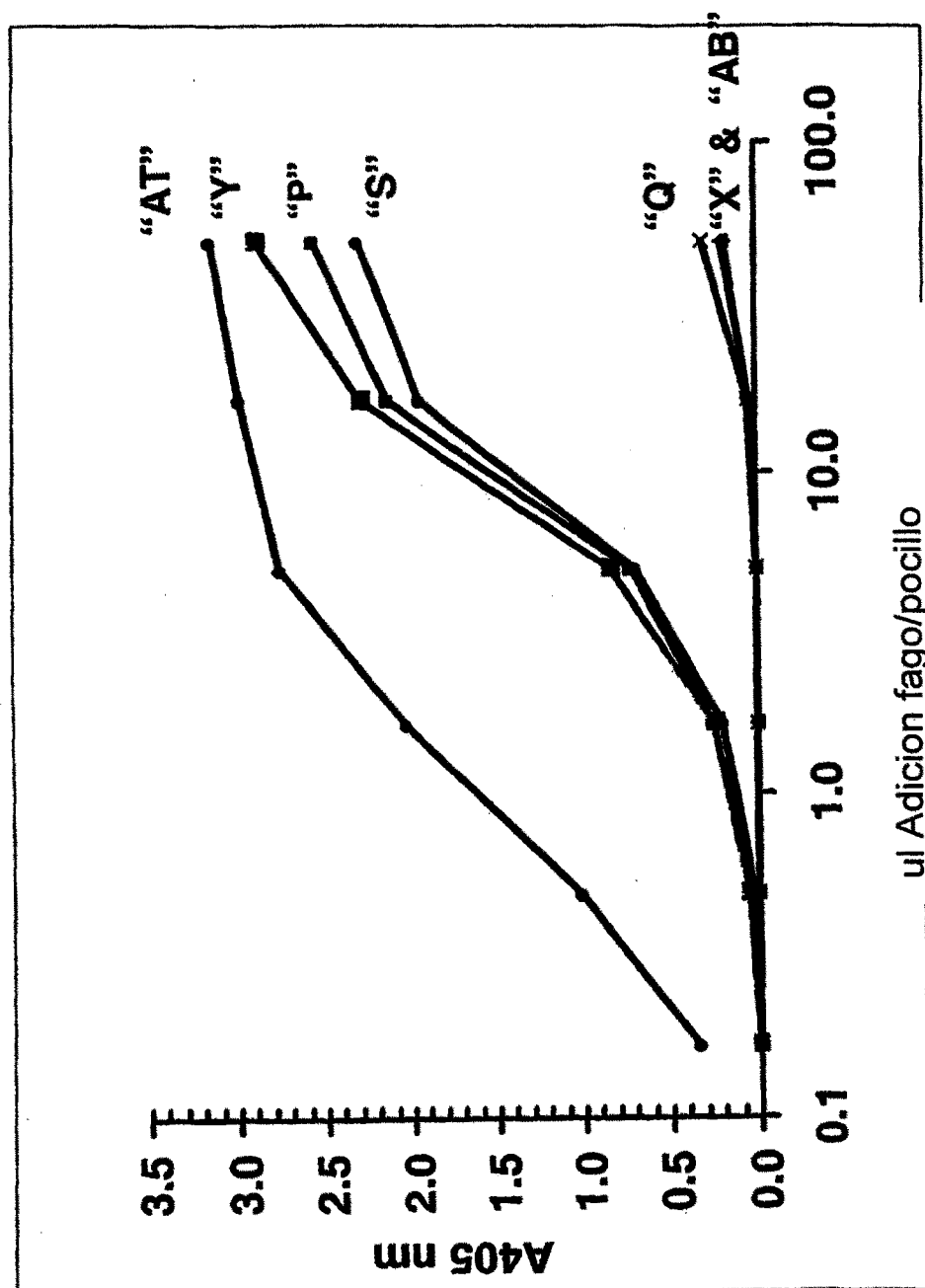


Figura 2

Inhibición de interacción de OPGbp/ODAR por Fabs "AT" e "Y"

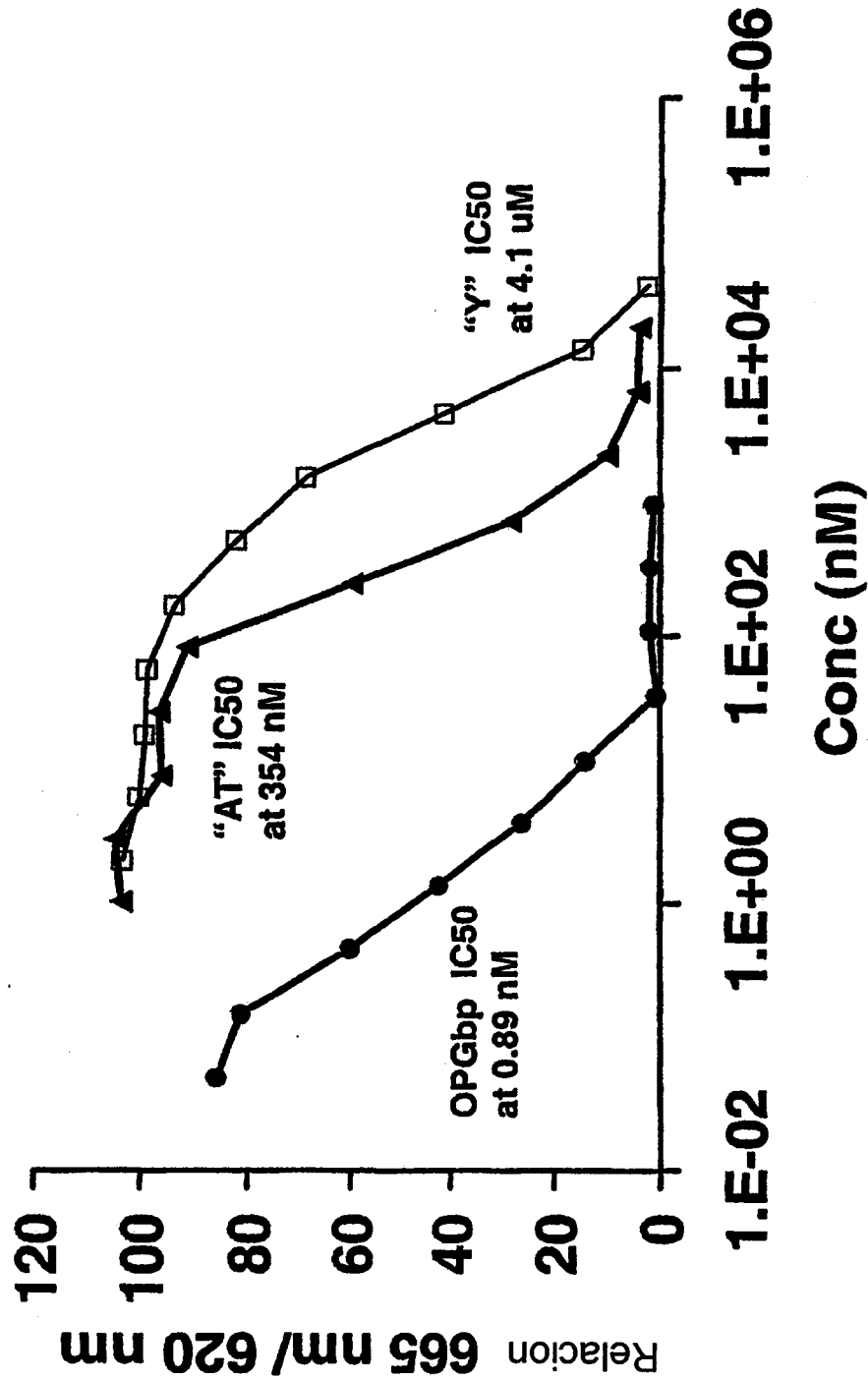


Figura 3
Ensayo de medula osea
Fabs "AT" "Y" "P"

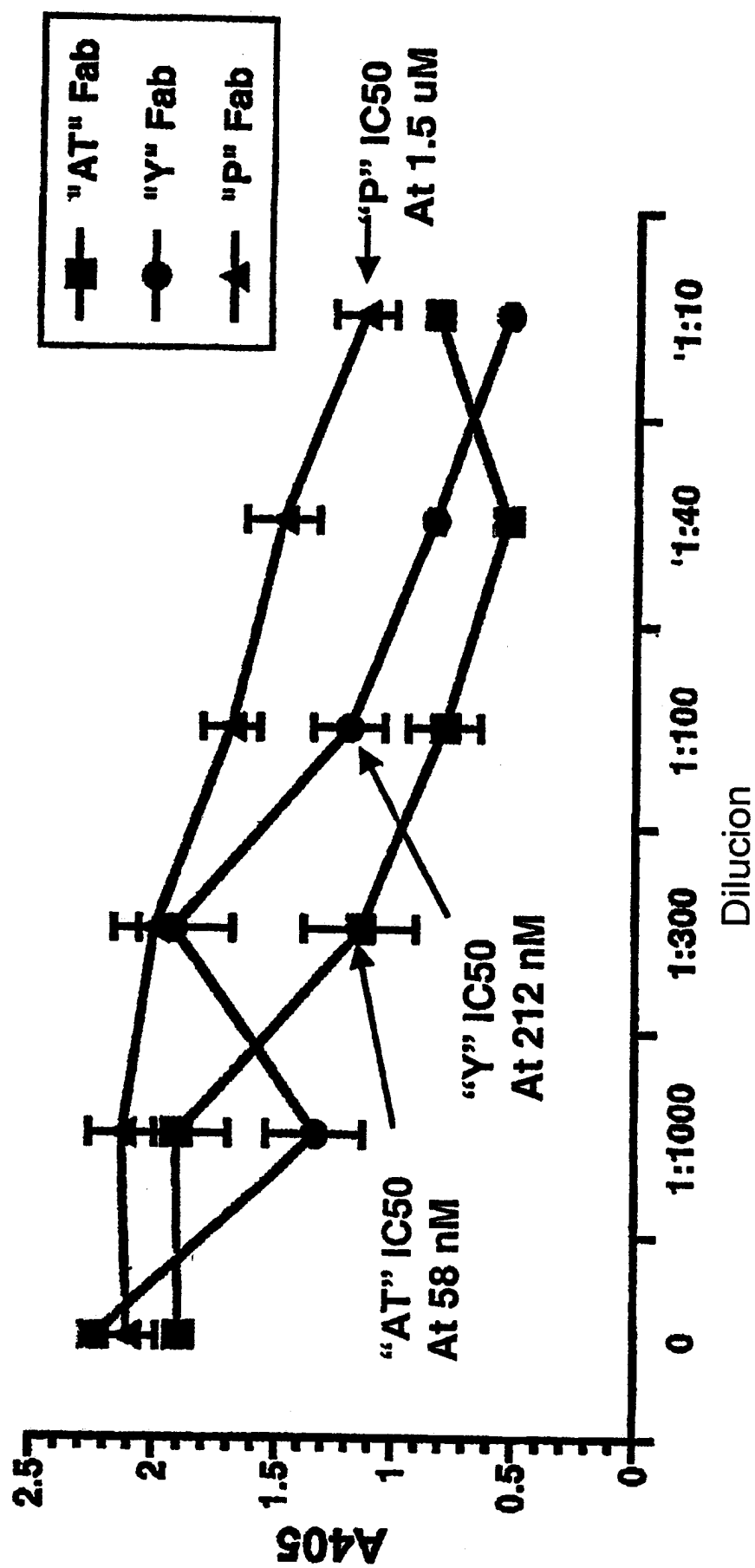


Figura 4
Bioensayo de célula Raw
Fabs "AT" "Y" y "P"

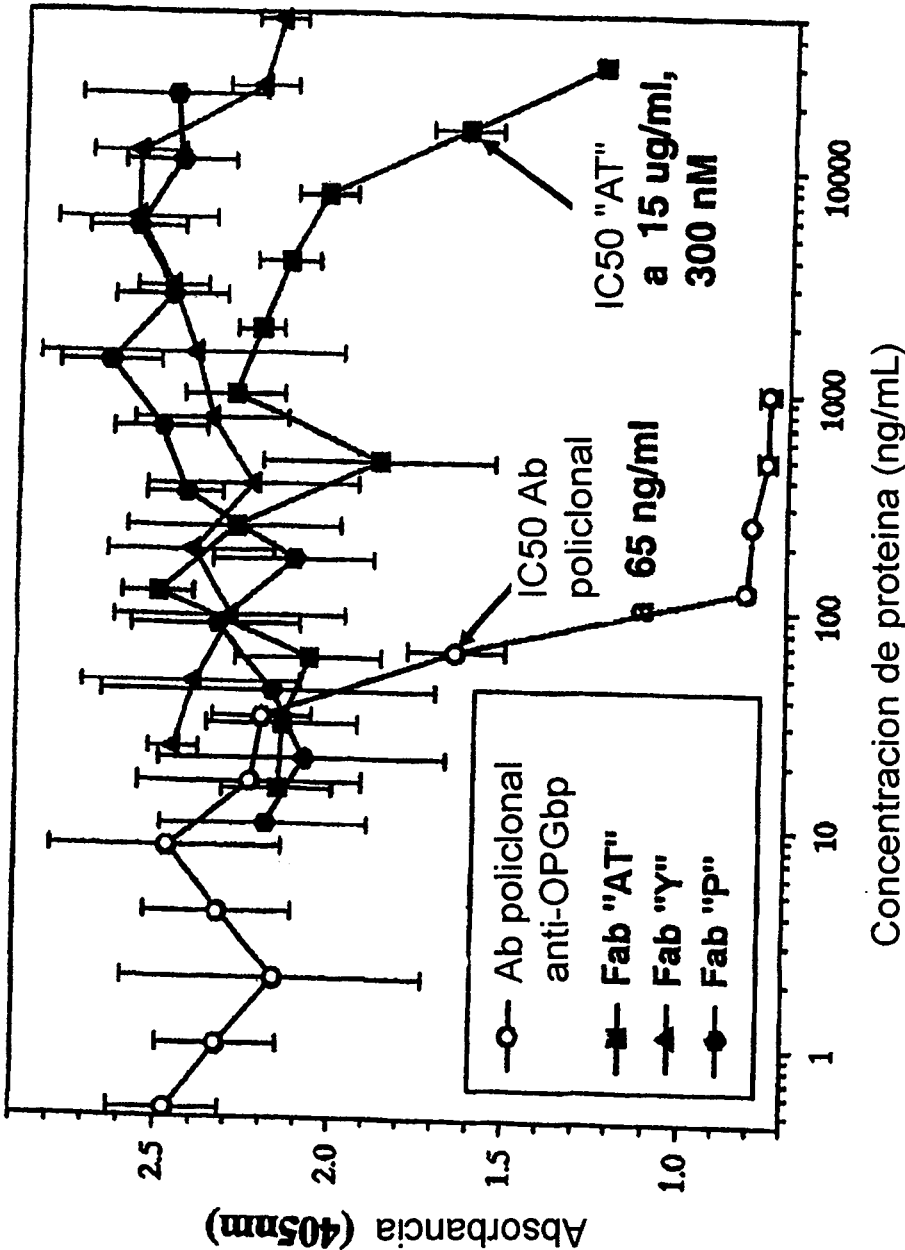


Figura 5

AT ligero

TCT	CAC	AGT	GCA	CTT	GAA	ATT	GTG	ATG	ACG	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	48
Ser	His	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	
1				5					10					15		
TCT	GCG	TCT	GTT	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	96
Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	
			20					25					30			
AGC	ATT	AGC	AGA	TAT	TTA	AAT	TGG	TAT	CAG	CTT	AAA	CCA	GGG	AAA	GCC	144
Ser	Ile	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Leu	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	
		35					40					45				
CCT	AGG	CTC	CTG	ATC	TAT	GGT	GCA	TCC	AGT	TTG	CAA	AGT	GGA	GTC	CCA	192
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	
	50					55					60					
TCA	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	GCA	GAG	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	240
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
65					70					75					80	
AGC	AGT	CTA	CAA	CCT	GAA	GAC	ATT	GCC	ACT	TAC	TAC	TGT	CAA	CAC	ACT	288
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Thr	
				85					90					95		
CGG	GCG	TTC	GGC	CAA	GGG	ACC	AAG	GTT	GAA	ATC	AAG	CGA	ACT	GTG	GCT	336
Arg	Ala	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
			100					105					110			
GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	384
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
		115					120					125				
GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC	AGA	GAG	432
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
	130					135					140					
GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	480
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
145					150					155					160	
CAG	GAG	AGT	GCC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	528
Gln	Glu	Ser	Ala	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
			165					170						175		
AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	576
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
			180					185					190			
TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	CAT	CAG	GGC	CTG	AGC	TCG	CCC	GTC	ACA	AAG	624
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
		195					200					205				
AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT										645
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215										

Figura 6

Y ligero

TCT	CAC	AGT	GCA	CTT	GAA	ATT	GTG	CTG	ACT	CAG	TCT	CCA	GCC	ACC	CTG	48
Ser	His	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	
1				5				10						15		
TCT	TTT	TCT	CCG	GGT	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGT	CAG	96
Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	
			20					25						30		
AGT	GTT	GGC	AGC	TAC	TTA	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	AGA	CCT	GGC	CAG	GCT	144
Ser	Val	Gly	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	
		35					40						45			
CCC	AGG	CCC	CTC	ATC	TAT	GAT	GCA	ACC	AAC	AGG	GCC	ACT	GGC	ATC	CCA	192
Pro	Arg	Pro	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Thr	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	
	50					55						60				
ACC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	240
Thr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
65					70					75					80	
AGC	AGC	CTA	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	ACT	TAT	TAC	TGT	CAA	CAC	CGA	288
Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Arg	
				85					90					95		
AGG	ACT	TTT	GGC	CGG	GGG	ACC	AAG	TTG	GAG	ATC	AAA	CGA	ACT	GTG	GCT	336
Arg	Thr	Phe	Gly	Arg	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
			100					105						110		
GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	384
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
		115					120					125				
GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC	AGA	GAG	432
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
	130					135						140				
GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	480
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
145					150					155					160	
CAG	GAG	AGT	GTC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	528
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
				165					170					175		
AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	576
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
			180					185					190			
TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACT	CAT	CAG	GGC	CTG	AGC	TCG	CCC	GTC	ACA	AAG	624
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
		195					200					205				
AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT										645
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215										

Figura 7

P ligero

CAC	AGT	GCA	CTT	GAA	ATT	GTG	ATG	ACA	CAG	TCT	CCA	GGC	ACC	CTG	TCT	48
His	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	
1				5					10					15		
TTG	TCT	CCA	GGG	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGT	CAG	AGT	96
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	
			20					25					30			
GTT	AGC	AGC	AGC	TCC	TTA	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCT	GGC	CAG	GCT	144
Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	
			35				40					45				
CCC	AGG	CTC	CTC	ATC	TAT	GGT	GCA	TCC	AGC	AGG	GCC	ACT	GGC	ATC	CCA	192
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	
	50					55					60					
GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	240
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
65				70					75						80	
AGC	AGA	CTG	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	GTG	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG	TAT	288
Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	
				85					90					95		
GGT	GCT	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAG	ATC	AAA	CGA	ACT	GTG	GCT	336
Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
			100					105					110			
GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	384
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
			115				120					125				
GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC	AGA	GAG	432
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
	130					135					140					
GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	480
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
145				150					155					160		
CAG	GAG	AGT	GTC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	528
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
			165						170					175		
AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	576
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
			180					185					190			
TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	CAT	CAG	GGC	CTG	AAC	TCG	CCC	GTC	ACA	AAG	624
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Asn	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
			195				200					205				
AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT										645
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215										

Figura 8

S ligero

TCT	CAC	AGT	GCA	CAG	TCT	GTG	CTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCG	GTG	TCA	GTG	48
Ser	His	Ser	Ala	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	
1				5					10					15		
TCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	ACG	ATC	ACC	TGC	TCT	GGA	GAT	GCA	TTG	CCA	96
Ser	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Ala	Leu	Pro	
			20					25					30			
AAG	CAA	TAT	GTT	TAT	TGG	TAC	CGG	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	GCC	CCT	CTA	144
Lys	Gln	Tyr	Val	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Leu	
		35					40					45				
TTG	GTG	ATA	TAT	GAA	GAC	AGT	GAG	AGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GAA	CGA	192
Leu	Val	Ile	Tyr	Glu	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	
	50					55					60					
TTC	TCT	GGC	TCC	AGT	TCA	GGG	ACT	GAA	GTC	ACG	TTG	AGT	ATC	AGT	GGA	240
Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Gly	
65					70				75					80		
GTC	CAG	GCA	GAA	GAC	GAG	GCT	GAC	TAT	TAT	TGT	CAA	TCA	ACA	GAC	AGC	288
Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Thr	Asp	Ser	
			85					90						95		
AGT	GGG	ACT	TAT	GTC	GTC	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	336
Ser	Gly	Thr	Tyr	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	
			100				105					110				
AGT	CAG	CCC	AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC	TCT	384
Ser	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	
		115					120					125				
GAG	GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTG	GTG	TGT	CTC	ATA	AGT	GAC	432
Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	
	130					135					140					
TTC	TAC	CCG	GGA	GCC	GTG	ACA	GTG	GCC	TGG	AAG	GCA	GAT	AGC	AGC	CCC	480
Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	
145					150				155						160	
GTC	AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	ACC	ACA	CCC	TCC	AAA	CAA	AGC	AAC	AAC	528
Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	
			165					170					175			
AAG	TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAT	CTG	AGC	CTG	ACG	CCT	GAG	CAG	TGG	AAG	576
Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	
		180					185					190				
TCC	CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTC	ACG	CAT	GAA	GGG	AGC	ACC	GTG	624
Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	
		195				200					205					
GAG	AAG	ACA	GTG	GCC	CCT	ACA	GAA	TGT	TCA							654
Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser							
	210					215										

Figura 9

AT pesado

GCC	CAG	GTG	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AGG	AAG	CCT	GGG	48
Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	
1				5				10					15			
GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	GAC	TTC	AGT	AAT	96
Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Asn	
			20					25					30			
TAT	GCT	ATA	CAT	TGG	GTG	CGC	CAG	GCC	CCC	GGA	CAA	AGG	CTT	GAG	TGG	144
Tyr	Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
ATG	GGA	TGG	ATC	AAC	GCT	GGC	AAT	GGG	AAC	ACA	AAA	TTT	TCA	CAG	AAG	192
Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Phe	Ser	Gln	Lys	
	50					55					60					
TTC	CAG	GGC	AGA	ATC	ACC	GTT	ACC	AGG	GAC	ACA	GCC	GCG	AGC	ACA	GCC	240
Phe	Gln	Gly	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	
65					70					75					80	
TAC	ATG	GAG	CTG	CGC	AGT	CTG	AGA	TCT	GAA	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	288
Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
TGT	GCG	AGA	GAT	TCC	TCA	AAT	ATG	GTT	CGG	GGA	ATT	ATT	ATA	GCG	TAC	336
Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Met	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Ile	Ala	Tyr	
			100					105					110			
TAT	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGC	ACC	CTG	GTG	ACC	GTG	TCA	AGC	GCC	384
Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
		115					120					125				
TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTG	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	432
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	
		130					135				140					
ACC	TCT	GGG	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTG	AAG	GAC	TAC	TTC	480
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
145					150				155						160	
CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	528
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
				165				170						175		
GTC	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTG	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	576
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
			180					185					190			
AGC	AGC	GTA	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	624
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	
		195					200					205				

Figura 9 (continuacion)

ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	672
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
210						215					220					
GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT											690
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys											
225					230											

Figura 10

Y pesado

GCC	GAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AGG	AAG	CCT	GGG	48
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	
1				5				10						15		
GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	GAC	TTC	AGT	AAT	96
Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Asn	
			20					25					30			
TAT	GCT	ATA	CAT	TGG	GTG	CGC	CAG	GCC	CCC	GGA	CAA	AGG	CTT	GAG	TGG	144
Tyr	Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
ATG	GGA	TGG	ATC	AAC	GCT	GGC	AAT	GGG	AAC	ACA	AAA	TTT	TCA	CAG	AAG	192
Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Phe	Ser	Gln	Lys	
	50					55					60					
TTC	CAG	GGC	AGA	ATC	ACC	GTT	ACC	AGG	GAC	ACA	GCC	GCG	AGC	ACA	GCC	240
Phe	Gln	Gly	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	
	65				70					75					80	
TAC	ATG	GAG	CTG	CGC	AGT	CTG	AGA	TCT	GAA	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	288
Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
TGT	GCG	AGA	GAT	TCC	TCA	AAT	ATG	GTT	CGG	GGA	ATT	ATT	ATA	GCG	TAC	336
Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Met	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Ile	Ala	Tyr	
			100					105					110			
TAT	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGC	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCA	AGC	GCC	384
Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
		115					120					125				
TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	432
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	
	130					135					140					
ACC	TCT	GGG	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	480
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
	145				150				155						160	
CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	528
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
			165					170					175			
GTC	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	576
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
			180					185					190			
AGC	AGC	GTA	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	624
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	
		195					200					205				

Figura 10 (continuacion)

ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	672
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
210						215					220					
GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT											690
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys											
225					230											

Figura 11

P pesado

GCC	GAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTC	CAG	CCT	GGG	48
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5				10						15		
GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	TTA	GTC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AAT	AAC	96
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Asn	
			20					25					30			
TAT	CCT	ATG	CAC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	144
Tyr	Pro	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
GTG	GCA	GTT	ATA	TCA	TAT	GAT	GGA	AAT	AAT	AAA	TAC	TAC	GCA	GAC	TCC	192
Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	
	50					55					60					
GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	240
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	
65					70				75						80	
TAT	TTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	288
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85				90						95		
TGT	GCG	AGG	GGG	GGC	GGT	GGC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	336
Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
GTC	ACC	GTC	TCA	AGC	GCC	TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	384
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
		115					120					125				
GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC	TCT	GGG	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	432
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
	130					135					140					
CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	480
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
145					150				155						160	
GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTC	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	528
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
				165				170						175		
TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTA	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	576
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
			180					185					190			
TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	624
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
		195					200					205				
ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT					660
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys					
	210					215					220					

Figura 12

S pesado

GCC	GAG	GTG	CAG	CTG	CTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTA	CAA	CCT	GGC	48
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5				10					15			
AGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	GAT	GAT	96
Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	
			20				25					30				
TAT	GCC	ATG	CAC	TGG	GTC	CGG	CAA	GCT	CCA	GGG	AAG	GGC	CTG	GAG	TGG	144
Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
		35				40						45				
GTC	TCA	GGT	ATT	AGT	TGG	AAT	AGT	GGT	AGG	ATA	GGC	TAT	GCG	GAC	TCT	192
Val	Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Arg	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	
	50					55					60					
GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	AAC	TCC	CTG	240
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	
	65				70				75						80	
TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGT	CTG	AGA	CCT	GAG	GAC	ACG	GCC	TTC	TAT	TAC	288
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe	Tyr	Tyr	
				85				90					95			
TGT	GCA	AAA	GGG	GGT	TCT	ACA	AGC	GCG	AGG	TAT	AGC	AGT	GGC	TGG	TAC	336
Cys	Ala	Lys	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Ala	Arg	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Tyr	
		100					105						110			
TAC	TGG	GGC	CAG	GGC	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCA	AGC	GCC	TCC	ACC	AAG	384
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	
		115				120						125				
GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC	TCT	GGG	432
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	
	130					135					140					
GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	480
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
	145				150				155					160		
GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTC	CAC	ACC	528
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
				165				170						175		
TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTA	576
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
			180					185					190			
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC	AAC	624
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	
		195					200					205				
GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GTT	GAG	CCC	672
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	
	210					215					220					

ES 2 307 594 T3

figura 12 (continuacion)

AAA TCT TGT
Lys Ser Cys
225

681

Figura 13
Comparacion de secuencia de aminoacido Fab

		Matriz cadena pesada de secuencia				Matriz cadena ligera de secuencia				
SIMILITUD	IDENTIDAD				IDENTIDAD					
	AT	Y	P	S	AT	Y	P	S		
	AT	---	99.6	76.9	72.3	AT	---	85.7	86.9	46.9
	Y	100	---	78.6	72.8	Y	89.0	---	91.5	47.4
	P	80.5	81.6	---	88.6	P	89.4	92.3	---	47.4
	S	78.6	79.0	91.8	---	S	59.3	59.8	60.8	---

FIGURA 14
Comparacion CDRs Fab

Patron	Cadena pesada		
	CDR1	CDR2	CDR3
AT	NYA ¹ I ¹ H	WINAGNGNTKFSQKFQ ² G	DSSNMVRGIITIA ³ Y ³ FD ³ Y
Y	NYA ¹ I ¹ H	WINAGNGNTKFSQKFQ ² G	DSSNMVRGIITIA ³ Y ³ FD ³ Y
P	NYP ¹ M ¹ H	VISYDGN ² NKYADSVK ² G	GGGG ³ FD ³ Y
S	DYA ¹ M ¹ H	GISWN ² SGRIGYADSVK ² G	GGSTSA ³ RYSSG ³ W ³ Y ³
Patron	cadena ligera		
	CDR1	CDR2	CDR3
AT	RASQ ¹ SI ¹ SR ¹ YL ¹ N	GAS ² SL ² Q ² S	QH ³ TR ³ A
Y	RASQ ¹ SV ¹ GS ¹ YL ¹ A	DAT ² NR ² AT ²	QH ³ RR ³ T
P	RASQ ¹ SV ¹ SS ¹ SL ¹ A	GAS ² SR ² AT ²	QQ ³ YGA
S	SGD ¹ AL ¹ PK ¹ Q ¹ Y	ED ² SER ² PS	QST ³ DSSG ³ T ³ Y ³ V ³

Figura 15
Clases Fab

Patron	Cadena Pesada		Cadena ligera	
	Familia	V	Familia	V
		D		J
AT	VH1	1-03 3-10 JH4b	Vk1	012/02 JK1
Y	VH1	1-03 3-10 JH4b	Vk3	L6 JK2
P	VH3	3-30 * JH4b	Vk3	A27 JK4
S	VH3	3-09 6-19 JH4b	V_L3	** JL2/JL3

Figura 16
comapracion de secuencia de cadena pesada
fabs "AT" e "Y" con linea germinal

H1									
FR1					CDR1		FR2		
	1	2	3				4		
Locus	123456789012345678901234567890	1ab2345	67890123456789						
1-03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YAMH	WVRQAPGQRLEWMG						
"AT"	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFS	N YAIH	WVRQAPGQRLEWMG						
"Y"	EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFS	N YAIH	WVRQAPGQRLEWMG						
H2									
CDR2					FR3				
	5	6	7	8	9				
Locus	012abc3456789012345	67890123456789012abc345678901234							
1-03	WINA--GNGNTKYSQKFQG	RVTITRDTASTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR						
"AT"	WINA GNGNTKFSQKFQG	RITVTRDTAASTAYMELRSLRSED	TAVYYCAR						
"Y"	WINA GNGNTKFSQKFQG	RITVTRDTAASTAYMELRSLRSED	TAVYYCAR						
Diversidad									
	3-10	VLLWFGELL*	YYYGSGSYYN	ITMVRGVII					
	"AT"		DS	SNMVRGII IAY					
	"Y"		DS	SNMVRGII IAY					
H3									
CDR3									
Union									
	100	110							
JH4	YFDYWQGQGLVTVSS								
"AT"	YFDYWQGQGLVTVSS								
"Y"	YFDYWQGQGLVTVSS								

Figura 17
Comparacion secuencia de cadena pesada
Fab "P" con linea germinal

H1									

Figura 18
Comparacion de secuencia de cadena
pesada Fab "S" con linea geminal

	H1																											
	FR1										CDR1					FR2												
	1					2					3					4												
Locus	123456789012345678901234567890											1ab2345						67890123456789										
3-09	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTFD											D--YAMH						WVRQAPGKGLEWVS										
"S"	EVQLLESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTFD											D YAMH						WVRQAPGKGLEWVS										
	H2																											
	CDR2										FR3																	
	5					6					7					8					9							
Locus	012abc3456789012345											67890123456789012abc345678901234																
3-09	GISW--NSGSIGYADSVKG											RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRRAEDTALYYCAKD																
"S"	GISW NSGRIGYADSVKG											RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAFFYYCAGK																
Diversidad																												
6-19	GYSSGWY											GIAVAG						V*QWLW										
"S"	GSTSARY											SS																
	H3																											
	CDR3																											
Union	100										110																	
JH4	YFDYWQGQTLVTIVSS																											
"S"	GWYYWGQGTLLTVSS																											

Figura 19
Comparacion de secuencia de cadena pesada
Fab "AT" con linea germinal

	L1					L2	
	FR1		CDR1		FR2	CDR2	
	1	2	3	4	5		
Locus	12345678901234567890123	45678901234567890123	456789012345678901234	567890123456789	0123456		
O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC	RASQSISS-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS			
"AT"	EIVMTQSPSSLSASVGDRTTTC	RASQSISS-----YLN	WYQLKPGKAPRLLIY	GASSLQS			

	L3			
	FR3		CDR3	
	6	7	8	9
Locus	78901234567890123456789012345678	9012345		
O12	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTP		
"AT"	GVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPEDFATYYC	QETRA--		

Union

JK1	WTFGQGTKVEIK
"AT"	--FGQGTKVEIK

Figura 20
Comparacion de secuencia de cadena
ligera Fab "Y" con linea germinal

	L1					L2	
	FR1		CDR1		FR2	CDR2	
	1	2	3	4	5		
Locus	12345678901234567890123	456789012345678901234	567890123456789				
O123456	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSS-----YLA	WYQQKPGQAPRLLIY				
L6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVGS-----YLA	WYQQKPGQAPRLLIY				
DASNRAT	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVGS-----YLA	WYQQKPGQAPRLLIY				
"Y"	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVGS-----YLA	WYQQKPGQAPRLLIY				
DATNRAT	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVGS-----YLA	WYQQKPGQAPRLLIY				

	L3			
	FR3		CDR3	
	6	7	8	9
Locus	78901234567890123456789012345678	9012345		
L6	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC	QQRSNWP		
"Y"	GIPTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC	QHR----		

Union

JK2	YTFGQGTKLEIK
"Y"	RTFGRGTKLEIK

Figura 21
comparacion de secuencia de cadena
ligera Fab "P" con linea germinal

CDR2	FR1		L1 ----- CDR1		FR2	L2 -----
	1	2	3		4	
Locus	12345678901234567890123	45678901234567890123	456789012345678901234		567890123456789	5
0123456						
A27	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC		RASQSVSS-----YLA		WYQQKPGQAPRLLIY	
DASNRAT						
"P"	EIVMTQSPGTLSLSPGERATLSC		RASQSVSS	SSLA	WYQQKPGQAPRLLIY	
GASSRAT						

Locus	FR3			L3 ----- CDR3	
	6	7	8	9	
A27	78901234567890123456789012345678			9012345	
"P"	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC			QQRSNWP	
	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC			QQY----	

Union	L3 ----- CDR3	
	100	
JK4	LTFGGGTKVEIK	
"P"	GAFGGGTKVEIK	

Figura 22
comparacion de secuencia de cadena ligera Fab "S"
con linea germinal

Locus	FR1		CDR1	FR2	CDR2	
	1	2	3	4	5	
*3m	1234567891234567890123	45678901234567890123	456789012345678901234	567890123456789	01abcde23456	
"S"	SYELMQPPSVSVSPGQTARITC		SG-DA-LPKQ-YAY	WYQQKPGQAPVLVIY	KD-----SERPS	
	QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC		SG DA LPKQ YVY	WYRQKPGQAPLLVIY	ED SERPS	

Locus	FR3			CDR3	
	6	7	8	9	
*3m	78901234567890123456789012345678			9012345abcde	
"S"	GIPERFSGSSSG--TTVTLTISGVQAEDEADYYC			QSADSSGTY	
	GIPERFSGSSSG TEVTLSISGVQAEDEADYYC			QSTDSSGTY	

union	CDR3 -----	
	100	
JL2	VVFEGGGTKLTVL	
"S"	VVFEGGGTKLTVL	

*Se identifico la region variable pero no fue nombrada todavia. La pareja mas proxima siguiente es "3m" mostrada.

Figura 23
Bioensayo de Celula Raw
"AT" 405, "AT" 406, "AT" 407

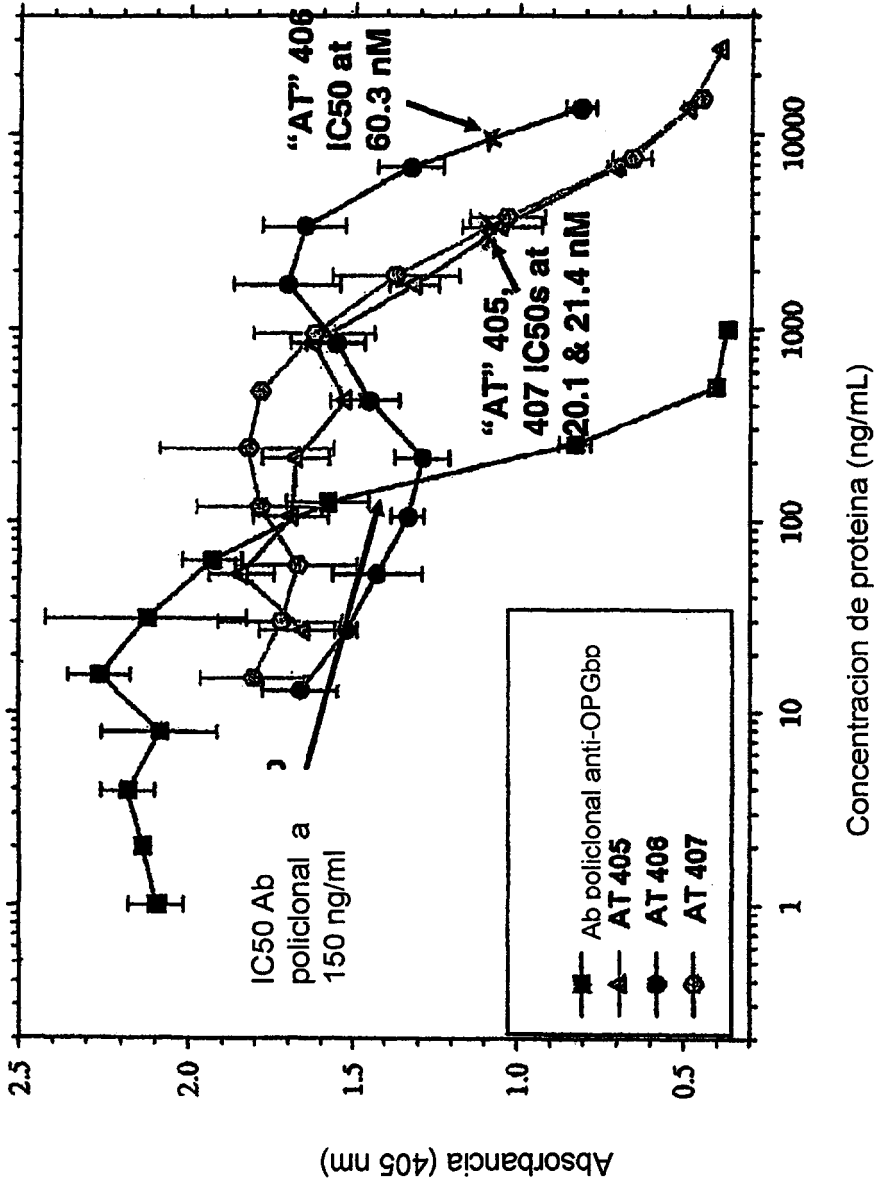


Figura 24
Ensayo de medula osea
"AT" 405, "AT" 407

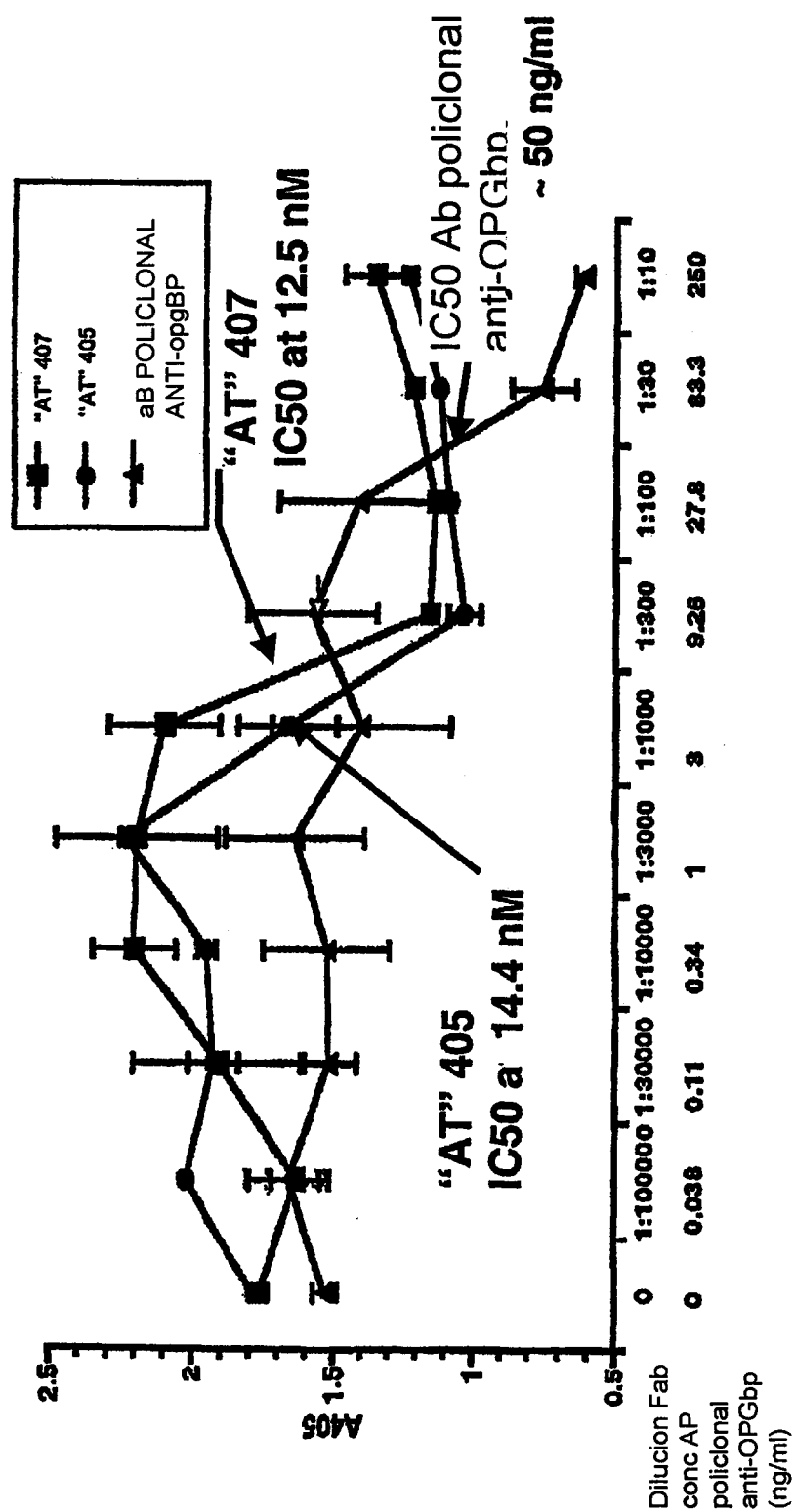


Figura 25
Ensayo de medula osea "AT" 406

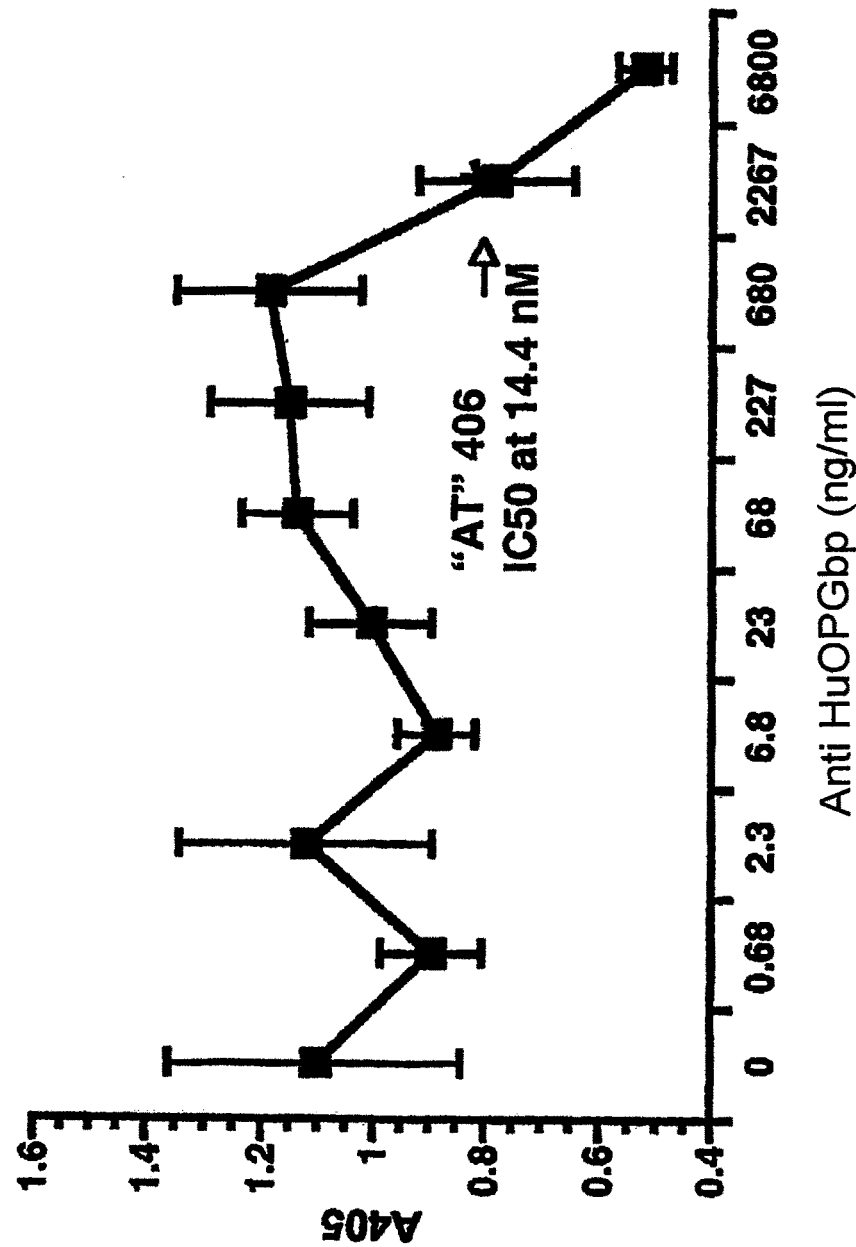


Figura 26
Ensayo de medula osea
"S" 435 e "Y" 429

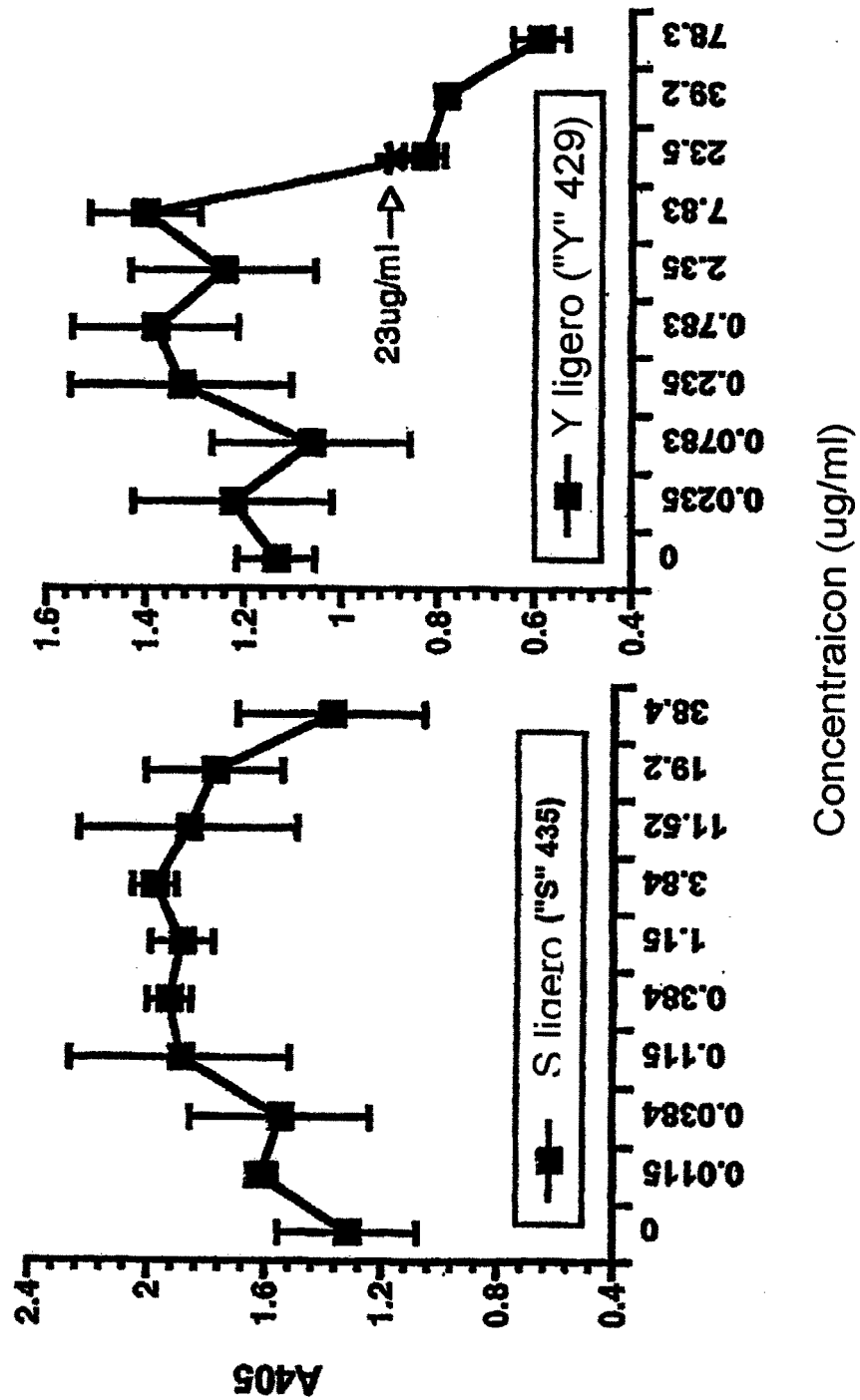


Figura 27
Ensayo de medula osea
"Y" 442 y "P" 444

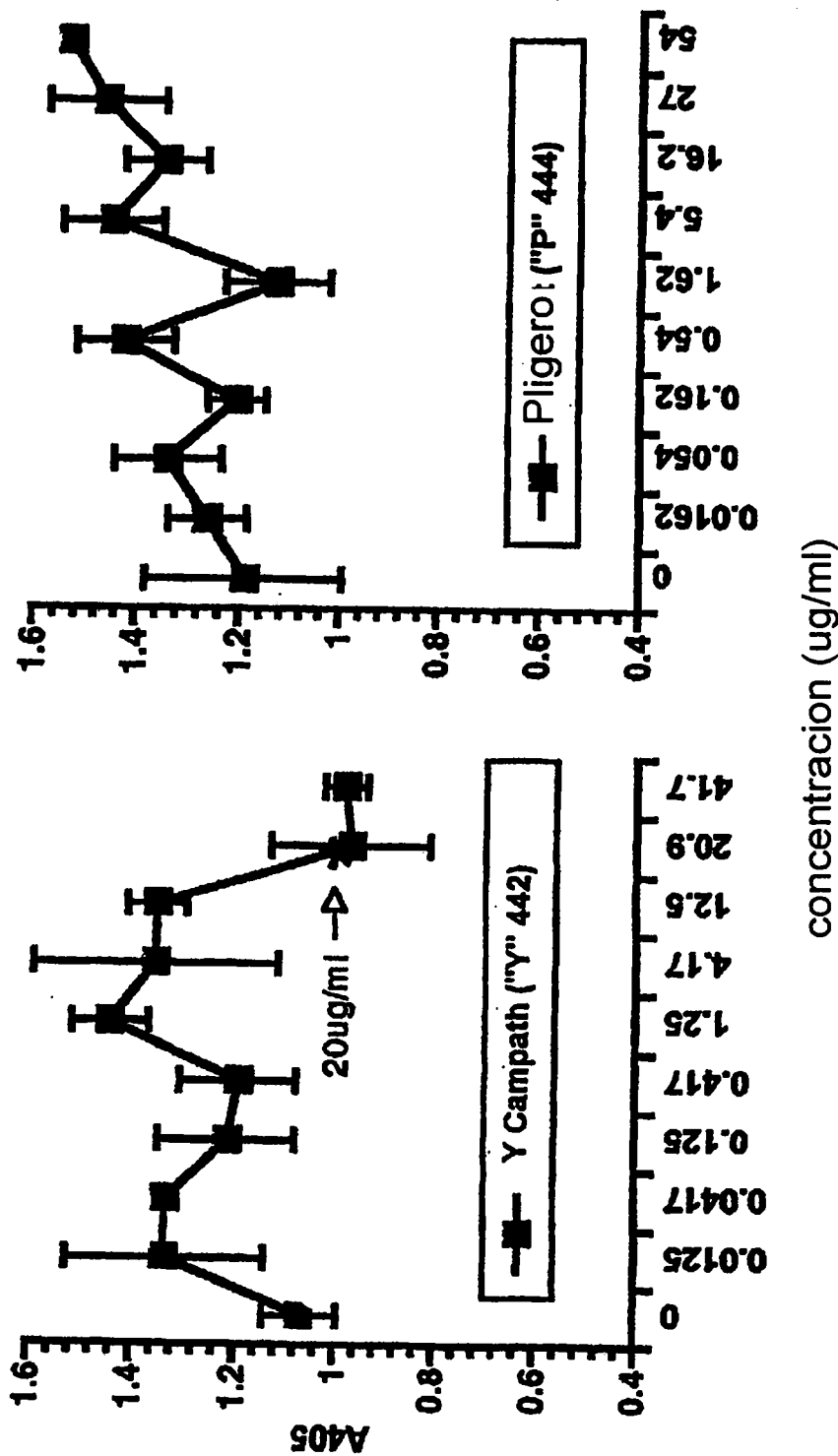


FIGURA 28

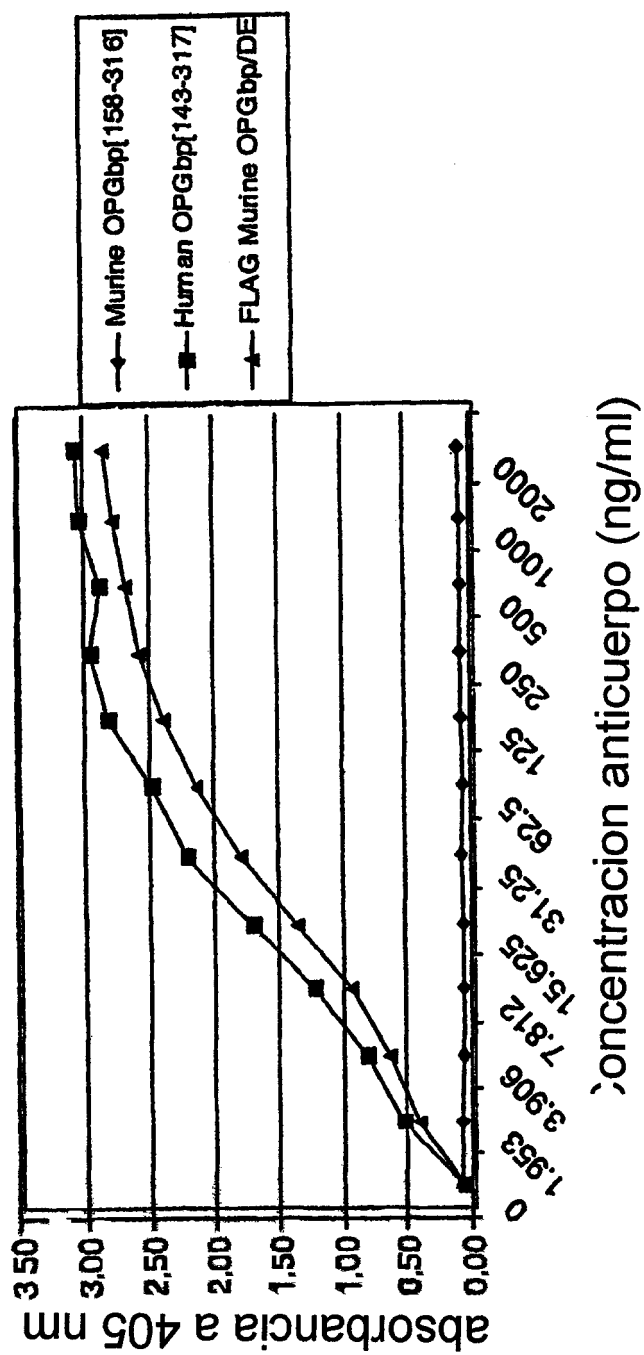
cat atg gac tac aag gac gac gat gac aag aag ctt aag cct gag gcc	48
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala	
1 5 10 15	
cag cca ttt gca cac ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg ggt	96
Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly	
20 25 30	
tcc cat aaa gtc act ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg gcc	144
Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala	
35 40 45	
aaa atc tct aac atg acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac caa	192
Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln	
50 55 60	
gat ggc ttc tat tac ctg tac gct aac att tgc ttt cgg cat cat gaa	240
Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu	
65 70 75	
aca tcg gga gac ctg gct act gaa tat ctt cag ctg atg gtg tat gtc	288
Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val	
80 85 90 95	
gtt aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa gga	336
Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly	
100 105 110	
ggg agc acg aaa aac tgg tcg ggc aat tct gaa ttc cac ttt tat tcc	384
Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser	
115 120 125	
ata aat gtt ggg gga ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att agc	432
Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser	
130 135 140	
att cag gtg tcc aac cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg acg	480
Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr	
145 150 155	
tac ttt ggg gct ttc aaa gtt cag gac ata gac taa ctc gag	522
Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp	
160 165 170	

FIGURA 29

Human OPGbp[143-317]
Murine OPGbp[158-316]
FLAG Murine OPGbp [158-316]/DE

Figura 30

Union de anticuerpo AT a OPGbp



ES 2 307 594 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.

5 <120> AGENTES DE UNIÓN SELECTIVOS DE PROTEÍNA DE UNIÓN DE OSTEOPROTEGERINA
<130> A-633A
<150> 09/511.139
<151> 2000-02-23

10 <160> 154
<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

15 <211> 11
<212> PRT
<213> Humano

20 <400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr Leu Asn

25 1 5 10

<210> 2

30 <211> 11
<212> PRT
<213> Humano

35 <400> 2

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala

40 1 5 10

<210> 3

<211> 12

45 <212> PRT
<213> Humano

<400> 3

50 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Leu Ala

1 5 10

55 <210> 4
<211> 9
<212> PRT

60 <213> Humano

<400> 4

65 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr

1 5

ES 2 307 594 T3

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Humano

 <400> 5

 10 Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

 15 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Humano
 20
 <400> 6

 Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr
 25 1 5

 <210> 7
 30 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Humano

 35 <400> 7

 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 40 1 5

 <210> 8
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Humano

 <400> 8
 50
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

 55 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Humano

 <400> 9

 65 Gln His Thr Arg Ala
 1 5

ES 2 307 594 T3

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Humano

 <400> 10

 10 Gln His Arg Arg Thr
 1 9

 15 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Humano
 20
 <400> 11

 25 Gln Gln Tyr Gly Ala
 1 5

 <210> 12
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humano
 35 <400> 12

 Gln Ser Thr Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Val Val
 40 1 5 10

 <210> 13
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Humano

 <400> 13
 50
 Asp Tyr Ala Ile His
 1 5
 55
 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Humano

 <400> 14

 65 Asp Tyr Pro Met His
 1 5

ES 2 307 594 T3

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Humano

 <400> 15

 10 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

 15 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Humano
 20
 <400> 16

 Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe Gln
 25 1 5 10 15
 Gly

 30 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 35 <213> Humano

 <400> 17

 40 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

 45 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> Humano

 <400> 18

 55 Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 60

 <210> 19
 <211> 17
 65 <212> PRT
 <213> Humano

ES 2 307 594 T3

<400> 19

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp

5 1 5 10 15

Tyr

10 <210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Humano

15 <400> 20

20 Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5

25 <210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> Humano

30 <400> 21

Gly Gly Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr

35 1 5 10

40 <210> 22
<211> 18
<212> PRT
<213> Humano

45 <400> 22

ccgactttgc acctagtt

18

50 <210> 23
<211> 24
<212> ADN
<213> Humano

55 <400> 23

60 tttgtcgtct ttccagacgt tagt

24

65 <210> 24
<211> 20

ES 2 307 594 T3

<212> PRT

<213> Humano

5 <400> 24

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

15

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

20 <213> Humano

<400> 25

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser

30

<210> 26

<211> 45

<212> ADN

35

<213> Humano

<210>

<221> CDS

40 <222> (18)...(44)

<400> 26

cagaagctta gaccacc atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc t
45

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe
50 1 5

<210> 27

<211> 9

55

<212> PRT

<213> Humano

60 <400> 27

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe
1 5

65

<210> 28

ES 2 307 594 T3

<211> 44
<212> ADN
<213> Humano
5
<220>
<221> CDS
<222> (2)...(43)
10
<400> 28

a gct ggg tct ttc tct tct tcc tgt cag taa cga ctg gtg tcc a
15
44
Ala Gly Ser Phe Ser Ser Ser Cys Gln Arg Leu Val Ser
20 1 5 10

<210> 29
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Humano

<400> 29
30
Ala Gly Ser Phe Ser Ser Ser Cys Gln
1 5

35
<210> 30
<211> 4
<212> PRT
40 <213> Humano

<400> 30

45 Arg Leu Val Ser
1

50 <210> 31
<211> 42
<212> ADN
<213> Humano
55
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(42)
60

65

ES 2 307 594 T3

<400> 31

5 tca gta acg act ggt gtc cac tca cag gtc cag ctg gtg cag
42
Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Gln
10 1 5 10

<210> 32

<211> 14

15 <212> PRT

<213> Humano

<400> 32

20 Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln
1 5 10

<210> 33

<211> 30

<212> ADN

30 <213> Humano

<400> 33

35 gtggaggcac tagagacggt gaccaggggtg
30

<210> 34

<211> 22

<212> PRT

45 <213> Humano

<400> 34

50 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Arg Gly Ala Arg Cys

55 20

<210> 35

<211> 48

60 <212> ADN

<213> Humano

<210>

65 <221> CDS

<222> (17)...(46)

ES 2 307 594 T3

<400> 35

cagaagcttg accacc atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg gg

5 48

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu

10 1 5 10

<210> 36

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Humano

<400> 36

20

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu

1 5 10

25 <210> 37

<211> 48

<212> ADN

30 <213> Humano

<220>

<221> CDS

35 <222> (3)... (47)

<400> 37

40 cc cgt cag ctc ctg ggg ctc ctg cta ttg tgg ttg aga ggt gcc aga t

48

Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg

45 1 5 10 15

<210> 38

50 <211> 15

<212> PRT

<213> Humano

55 <400> 38

Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg

60 1 5 10 15

<210> 39

<211> 44

65 <212> ADN

<213> Humano

ES 2 307 594 T3

<220>

<221> CDS

<222> (2)... (43)

5

<400> 39

g tgg ttg aga ggt gcc aga tgt gaa att gtg atg aca cag tct c

10

44

Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser

1

5

10

15

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

20

<213> Humano

<400> 40

25

Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser

1

5

10

30

<210> 41

<211> 32

<212> ADN

<213> Humano

35

<220>

<221> CDS

<222> (20)... (31)

40

<400> 41

tttggacgtc gacttatta aca ctc tcc cct g

45

32

Thr Leu Ser Pro

50

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Humano

55

<400> 42

60

Thr Leu Ser Pro

1

65

<210> 43

ES 2 307 594 T3

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Humano
 5
 <400> 43

 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 10 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Phe Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Arg Arg
 15 20 25 30

 <210> 44
 <211> 645
 20 <212> ADN
 <213> Humano

 <220>
 25 <221> CDS
 <222> (1)... (645)

 <400> 44
 30

 tct cac agt gca ctt gaa att gtg atg acg cag tct cca tcc tcc ctg
 48
 35 Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 1 5 10 15

 40 tct gcg tct gtt gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag
 96
 45 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30

 50 agc att agc aga tat tta aat tgg tat cag ctt aaa cca ggg aaa gcc
 144
 Ser Ile Ser Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala
 55 35 40 45

 60 cct agg ctc ctg atc tat ggt gca tcc agt ttg caa agt gga gtc cca
 192
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro
 65 50 55 60

ES 2 307 594 T3

tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg gca gag ttc act ctc acc atc
240

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

10 agc agt cta caa cct gaa gac att gcc act tac tac tgt caa cac act
288

15 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr
85 90 95

20 cgg gcg ttc ggc caa ggg acc aag gtt gaa atc aag cga act gtg gct
336

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

30 gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct
384

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

40 gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag
432

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

50 gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc
480

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

60 cag gag agt gcc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc
528

65 Gln Glu ser Ala Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

ES 2 307 594 T3

agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc
 576
 5 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 10 tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag
 624
 15 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 20 agc ttc aac agg gga gag tgt
 645
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 25 210 215
 <210> 45
 <211> 215
 30 <212> PRT
 <213> Humano
 35 <400> 45
 Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 1 5 10 15
 40 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30
 45 Ser Ile Ser Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 50 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro
 55 50 55 60
 60 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65

ES 2 307 594 T3

	65	70	75	80
5	Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr	85	90	95
10	Arg Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala	100	105	110
15	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser	115	120	125
20	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu	130	135	140
25	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser	145	150	155
30	Gln Glu Ser Ala Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu	165	170	175
35	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lus Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	180	185	190
40	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys	195	200	205
45	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210	215	
50	<210> 46			
55	<211> 645			
	<212> ADN			
	<213> Humano			
60	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1) ... (645)			
65				

ES 2 307 594 T3

<400> 46

```

5      tct cac agt gca ctt gaa att gtg ctg act cag tct cca gcc acc ctg
      48
      Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
10     1          5          10          15

      tct ttt tct ccg ggt gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag
15     96
      Ser Phe Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
      20          25          30
20

      agt gtt ggc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aga cct ggc cag gct
      144
25     Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
      35          40          45
30

      ccc agg ccc ctc atc tat gat gca acc aac agg gcc act ggc atc cca
      192
35     Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
      50          55          60
40

      acc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc
      240
45     Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
      65          70          75          80
50

      agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cac cga
      288
55     Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg
      85          90          95
60

65

```

ES 2 307 594 T3

agg act ttt gtc cgg ggg acc aag ttg gag atc aaa cga act gtg gct
336

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

10 gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct
384

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

20 gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag
432

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

30 gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc
480

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

40 cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc
528

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

50 agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc
576

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

60 tac gcc tgc gaa gtc act cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag
624

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

ES 2 307 594 T3

agc ttc aac agg gga gag tgt

645

5 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

10 <210> 47

<211> 215

<212> PRT

<213> Humano

15

<400> 47

20 Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

1

5

10

15

Ser Phe Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

25

20

25

30

Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala

30

35

40

45

Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro

35

50

55

60

Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

40

65

70

75

80

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg

45

85

90

95

Arg Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

50

100

105

110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

55

115

120

125

60

65

ES 2 307 594 T3

	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu				
	130	135	140		
5					
	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser				
	145	150	155	160	
10					
	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu				
		165	170	175	
15					
	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val				
		180	185	190	
20					
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys				
		195	200	205	
25					
	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
		210	215		
30					
	<210> 48				
35	<211> 645				
	<212> ADN				
	<213> Humano				
40	<220>				
	<221> CDS				
	<222> (1) ... (645)				
45	<400> 48				
	cac agt gca ctt gaa att gtg atg aca cag tct cca ggc acc ctg tct				
	48				
50					
	His Ser Ala Leu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser				
	1	5	10	15	
55					
	ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt				
60					
65					

ES 2 307 594 T3

96

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

5 20 25 30

gtt agc agc agc tcc tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct

10 144

Val Ser Ser Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

15 35 40 45

ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca

20 192

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

25 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc

240

30 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat

288

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

40 85 90 95

ggc gct ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct

336

Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

50 100 105 110

gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct

55 384

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

60 115 120 125

gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag

65

ES 2 307 594 T3

433

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

5 130 135 140

gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc

10 480

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

145 150 155 160

cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc

20 528

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc

25 576

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg aac tcg ccc gtc aca aag

35 624

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Asn Ser Pro Val Thr Lys

40 195 200 205

agc ttc aac agg gga gag tgt

45 645

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

50 210 215

<210> 49

55 <211> 215

<212> PRT

<213> Humano

60

65

ES 2 307 594 T3

<400> 49

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

ES 2 307 594 T3

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

5 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

10 <210> 50
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Humano
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (654)
 20 <400> 50

25 tct cac agt gca cag tct gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg
 48

Ser His Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
 30 1 5 10 15

tcc cca gga cag acg gcc acg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca
 35 96

Ser Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro
 40 20 25 30

aag caa tat gtt tat tgg tac cgg cag aag cca ggc cag gcc cct cta
 45 144

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

50 ttg gtg ata tat gaa gac agt gag agg ccc tca ggg atc cct gaa cga
 192

55 Leu Val Ile Tyr Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 50 55 60

60

65

ES 2 307 594 T3

```

    ttc tct ggc tcc agt tca ggg act gaa gtc acg ttg agt atc agt gga
      240
5    Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Glu Val Thr Leu Ser Ile Ser Gly
    65              70              75              80

10   gtc cag gca gaa gac gag gct gac tat tat tgt caa tca aca gac agc
      288
15   Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Thr Asp Ser
      85              90              95
    agt ggg act tat gtc gtc ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta
20   336
    Ser Gly Thr Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100              105              110

25   agt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct
      384
30   Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
      115              120              125

35   gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac
      432
40   Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
      130              135              140

45   ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc
      480
50   Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
    145              150              155              160

55   gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac
      528
    Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
    60              165              170              175

    aag tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag
65

```

ES 2 307 594 T3

576

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

5 180 185 190

tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg

10 624

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val

15 195 200 205

gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca

20 654

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

25

<210> 51

<211> 218

<212> PRT

30 <213> Humano

<400> 51

35

Ser His Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val

1 5 10 15

40

Ser Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro

20 25 30

45

Lys Gln Tyr Val Tyr Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Leu

35 40 45

50

Leu Val Ile Tyr Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg

50 55 60

55

Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Glu Val Thr Leu Ser Ile Ser Gly

65 70 75 80

60

Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Thr Asp Ser

85 90 95

65

ES 2 307 594 T3

Ser Gly Thr Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 5
 Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125
 10
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 130 135 140
 15
 Phe tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 20
 Val Ly s Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 165 170 175
 25
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 180 185 190
 30
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 195 200 205
 35
 Glu Lys Thr val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 40
 <210> 52
 <211> 690
 45 <212> ADN
 <213> Humano
 <220>
 50 <221> CDS
 <222> (1) ... (690)
 55 <400> 52
 gcc cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg
 60
 65

ES 2 307 594 T3

48

Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly

5

1

5

10

15

gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac gac ttc agt aat

10

96

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn

15

20

25

30

tat gct ata cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg

20

144

Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp

25

35

40

45

atg gga tgg atc aac gct ggc aat ggg aac aca aaa ttt tca cag aag

192

30

Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys

50

55

60

35

ttc cag ggc aga atc acc gtt acc agg gac aca gcc gcg agc aca gcc

240

40

Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala

65

70

75

80

45

tac atg gag ctg cgc agt ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac

288

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

50

85

90

95

tgt gcg aga gat tcc tca aat atg gtt cgg gga att att ata gcg tac

55

336

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr

60

100

105

110

tat ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc

65

ES 2 307 594 T3

384

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

5 115 120 125

tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc

10 432

Ser Tyr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser

15 130 135 140

acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc

20 480

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe

25 145 150 155 160

cca gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc

30 528

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

35 165 170 175

gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc

40 576

Val His Thr Phe Pro Ala Val Ley Gln ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu

45 180 185 190

agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac

50 624

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr

55 195 200 205

atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa

60 672

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys

65 210 215 220

gtt gag ccc aaa tct tgt

65

ES 2 307 594 T3

690

Val Glu Pro Lys Ser Cys

5 225 230

<210> 53

<211> 230

10 <212> PRT

<213> Humano

15 <400> 53

Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly

20 1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn

25 20 25 30

Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp

30 35 40 45

Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys

35 50 55 60

Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala

40 65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

45 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr

50 100 105 110

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

55 115 120 125

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser

60 130 135 140

65

ES 2 307 594 T3

	Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe			
	145	150	155	160
5				
	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly			
		165	170	175
10				
	Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu			
		180	185	190
15				
	Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr			
		195	200	205
20				
	Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys			
		210	215	220
25				
	Val Gly Pro Lys Ser Cys			
	225	230		
30				

	<210> 54
35	<211> 690
	<212> ADN
	<213> Humano
40	<220>
	<221> CDS
	<222> (1) ... (690)
45	<400> 54

	gcc gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg
50	48
	Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly
	1 5 10 15
55	
	gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac gac ttc agt aat
60	96
65	

ES 2 307 594 T3

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

5

tat gct ata cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg
144

10

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

15

atg gga tgg atc aac gct ggc aat ggg aac aca aaa ttt tca cag aag
192

20

Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys
50 55 60

25

ttc cag ggc aga atc acc gtt acc agg gac aca gcc gcg agc aca gcc
240

30

Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala
65 70 75 80

35

tac atg gag ctg cgc agt ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac
288

40

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

45

tgt gcg aga gat tcc tca aat atg gtt cgg gga att att ata gcg tac
336

50

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr
100 105 110

55

tat ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc
384

60

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

65

tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc
432

ES 2 307 594 T3

Ser Tyr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140

5 acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc
 480

10 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160

15 ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc
 528

20 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175

25 gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc
 576

30 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190

35 agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac
 624

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205

40 atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa
 672

45 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220

50 gtt gag ccc aaa tct tgt
 690

55 Val GlU Pro Lys Ser Cys
 225 230

60 <210> 55
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Humano

65

ES 2 307 594 T3

<400> 55

	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Gly
5	1				5					10					15	
	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Asn
				20					25					30		
10	Tyr	Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp
				35					40					45		
	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Phe	Ser	Gln	Lys
15		50					55					60				
	Phe	Gln	Gly	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala
	65					70				75					80	
20	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95		
	Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Met	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Ile	Ala	Tyr
25				100					105					110		
	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
30			115				120						125			
	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
		130					135					140				
35	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
	145					150				155					160	
	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
40				165					170				175			
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
45				180					185				190			
	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
			195				200					205				
50	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
		210					215					220				
	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys										
55		225					230									

<210> 56

<211> 660

60 <212> ADN

<213> Humano

<220>

65 <221> CDS

<222> (1) ... (660)

ES 2 307 594 T3

<400> 56

```

5      gcc gag tgc cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg
      48
      Ala Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
10     1          5          10          15

      ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt tta gtc tct gga ttc acc ttc aat aac
15     96
      Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn
      20          25          30

20     tat cct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg
      144
25     Tyr Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
      35          40          45

30     gtg gca gtt ata tca tat gat gga aat aat aaa tac tac gca gac tcc
      192
35     Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
      50          55          60

40     gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg
      240
45     Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
      65          70          75          80

```

ES 2 307 594 T3

tat ttg caa atg aac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac
 288
 5 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 10 tgt gcg agg ggg ggc ggt ggc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg
 336
 15 Cys Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 20 gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg
 384
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 25 115 120 125
 30 gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc
 432
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 35 130 135 140
 40 ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca
 480
 Ley Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gly Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 45 ggc gcc ctg acc agc ggc gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc
 528
 50 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 55 tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc
 576
 60 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 65

ES 2 307 594 T3

ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac
 624
 5 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 10 acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt
 660
 15 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 <210> 57
 20 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Humano
 25 <400> 57
 30 Ala Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn
 20 25 30
 35 Tyr Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gly Trp
 35 40 45
 40 Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 45 65 70 75 80
 Tyr Ley Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 50 Cys Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 55 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 60 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gly Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

ES 2 307 594 T3

	145		150		155		160									
	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
5					165				170					175		
	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				180					185					190		
10	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
				195					200					205		
	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys				
15		210					215					220				

<210> 58

20 <211> 681

<212> ADN

<213> Humano

25 <220>

<221> CDS

<222> (1) ... (681)

30 <400> 58

	gcc	gag	gtg	cag	ctg	ctg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	caa	cct	ggc
35	48															
	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
	1			5					10					15		
40																
	agg	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttt	gat	gat
	96															
45	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp
				20					25					30		
50																
	tat	gcc	atg	cac	tgg	gtc	cgg	caa	gct	cca	ggg	aag	ggc	ctg	gag	tgg
	144															
55	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
			35					40					45			

60

65

ES 2 307 594 T3

gtc tca ggt att agt tgg aat agt ggt agg ata ggc tat gcg gac tct
192

5 Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

10 gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg
240

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

20 tat ctg caa atg aac agt ctg aga cct gag gac acg gcc ttc tat tac
288

25 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr
85 90 95

30 tgt gca aaa ggg ggt tct aca agc gcg agg tat agc agt ggc tgg tac
336

35 Cys Ala Lys Gly Gly Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr
100 105 110

40 tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag
384

45 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

50 ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg
432

55 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

60 ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg
480

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

ES 2 307 594 T3

gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtc cac acc
528

5 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

10 ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gta
576

15 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

20 gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac
624

25 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

30 gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc
672

35 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

<210> 59

<211> 227

40 <212> PRT

<213> Humano

<400> 59

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

50

55

60

65

ES 2 307 594 T3

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

Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

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

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Lys Gly Gly Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220

Lys Ser Cys
 225

<210> 60

<211> 141

<212> PRT

<213> Humano

ES 2 307 594 T3

<400> 60

```

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

```

<210> 61

<211> 126

<212> PRT

<213> Humano

<400> 61

```

50      Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      1          5          10          15
      Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn Tyr
          20          25          30
55      Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
          35          40          45
      Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
60

```

65

ES 2 307 594 T3

50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 5 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Arg Asp`Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr
 100 105 110
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gln Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Phe
 15 115 120 125

<210> 62
 20 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Humano
 25 <400> 62

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

<210> 63
 60 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Humano

65

ES 2 307 594 T3

<400> 63

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
10 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
15 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys As Thr Leu Tyr
20 65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
25 Ala Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
30 Ser

<210> 64

<211> 116

35 <212> PRT

<213> Humano

<400> 64

40 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30
Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
50 35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
55 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

60

65

ES 2 307 594 T3

	65		70		75		80									
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
5				85				90					95			
	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110			
10	Thr	Val	Ser	Ser												
			115													
15	<210>	65														
	<211>	132														
	<212>	PRT														
20	<213>	Humano														
	<400>	65														
25	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
	1			5						10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Asn	Tyr
30			20					25					30			
	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45				
35	Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50				55					60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
40	65			70					75				80			
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95			
45	Ala	Lys	Asp	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Tyr	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Gly
			100					105					110			
50	Val	Gln	Trp	Leu	Val	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			115					120					125			
	Thr	Val	Ser	Ser												
55			130													
	<210>	66														
60	<211>	123														
	<212>	PRT														
	<213>	Humano														
65																

ES 2 307 594 T3

<400> 66

```

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

```

<210> 67

35 <211> 107

<212> PRT

<213> Humano

40 <400> 67

```

      Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
45     1              5              10              15
      Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
      20              25              30
50     Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ls Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35              40              45
      Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
55     50              55              60
      Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
60     65              70              75              80
      Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
      85              90              95
65     Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100             105

```

ES 2 307 594 T3

<210> 68
 <211> 103
 <212> PRT
 5 <213> Humano

 <400> 68
 10 Gln Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
 15 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 20 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 25 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Arg Ala Phe Gly Gln
 85 90 95
 30 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100
 35 <210> 69
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humano
 40
 <400> 69
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 45 1 5 10 15
 Gly Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 50 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 55 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 60 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Tyr
 85 90 95
 65 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 307 594 T3

<210> 70

<211> 103

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 70

```

10      Gly Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Phe Ser Pro Gly
      1              5              10              15
      Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr
15              20              25              30
      Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile
              35              40              45
20      Tyr Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Thr Arg Phe Ser Gly
              50              55              60
      Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
25      65              70              75              80
      Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg Arg Thr Phe Gly Arg
              85              90              95
30      Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
              100

```

35 <210> 71

<211> 107

<212> PRT

40 <213> Humano

<400> 71

```

45      Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      1              5              10              15
      Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
              20              25              30
50      Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
              35              40              45
55      Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
              50              55              60
      Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
60      65              70              75              80
      Glu Asp Phe Ala Val Tyr tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
              85              90              95
65      Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              100              105

```

ES 2 307 594 T3

<210> 72

<211> 104

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 72

```

10      Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      1           5           10           15
      Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
15           20           25           30
      Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
           35           40           45
20      Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
           50           55           60
      Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
25      65           70           75           80
      Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ala Phe Gly
           85           90           95
30      Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100
35      Thr Val Ser Ser
           115

```

<210> 73

40 <211> 108

<212> PRT

<213> Humano

45 <400> 73

```

      Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1      1           5           10           15
50      Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
           20           25           30
      Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
           35           40           45
55      Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
           50           55           60
60      Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
      65           70           75           80
      Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
           85           90           95
65      Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
           100           105

```

ES 2 307 594 T3

<210> 74

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 74

10 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
15 Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Val
20 25 30
Tyr Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Leu Leu Val Ile Tyr
35 40 45
20 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
25 Ser Ser Gly Thr Glu Val Thr Leu Ser Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80
30 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Thr Asp ser Ser Gly Thr Tyr
85 90 95
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105
35

<210> 75

<211> 522

40 <212> ADN

<213> Murínico

<220>

45 <221> CDS

<222> (4)... (513)

<400> 75

50 cat atg gac tac aag gac gac gat gac aag aag ctt aag cct gag gcc
48
55 Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala
1 5 10 15
60 cag cca ttt gca cac ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg ggt
96
65

ES 2 307 594 T3

Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly
 20 25 30
 5
 tcc cat aaa gtc act ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg gcc
 144
 10 Ser His Lys Val Thr Lue Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala
 35 40 45
 15
 aag atc tct aac atg acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac caa
 192
 20 Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln
 50 55 60
 25
 gat ggc ttc tat tac ctg tac gct aac att tgc ttt cgg cat cat gaa
 240
 30 Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu
 65 70 75
 35
 aca tcg gga gac ctg gct act gaa tat ctt cag ctg atg gtg tat gtc
 288
 Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val
 40 80 85 90 95
 45
 gtt aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa gga
 336
 Val Lys Thr ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly
 50 100 105 110
 55
 ggg agc acg aaa aac tgg tcg ggc aat tct gaa ttc cac ttt tat tcc
 384
 Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Gly Phe His Phe Tyr Ser
 115 120 125
 60
 ata aat gtt ggg gga ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att agc
 432
 65

ES 2 307 594 T3

Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser
130 135 140

5

att cag gtg tcc aac cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg acg
480

10

Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr
145 150 155

15

tac ttt ggg gct ttc aaa gtt cag gac ata gac taactcgag
522

20

Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
160 165 170

25

<210> 76
<211> 170
<212> PRT
<213> Murínico

30

<400> 76

35

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala GLn
1 5 10 15

Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser

40

20 25 30

His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys

35 40 45

45

Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp
50 55 60

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr

50

65 70 75 80

Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val

55

85 90 95

Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Glu Gly

100 105 110

60

Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile
115 120 125

65

ES 2 307 594 T3

Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Gly Ile Ser Ile
 130 135 140
 5 Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr
 145 150 155 160
 10 Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
 165 170

<210> 77
 15 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Humano
 20 <400> 77

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 25 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Thr
 20 25 30
 30 Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
 35

35 <210> 78
 <211> 39
 <212> PRT
 40 <213> Murínico
 <400> 78

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 45 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val
 50 20 25 30
 Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
 55 35

<210> 79
 <211> 39
 60 <212> PRT
 <213> Murínico

65

ES 2 307 594 T3

<400> 79

5 Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
1 5 10 15
Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val
10 20 25 30
Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
35

15 <210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Sintético
20 <220>
<221> rasgo misc
<223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición
25 <400> 80

30 Xaa Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15
Tyr

35 <210> 81
<211> 17
<212> PRT
40 <213> Sintético
<220>
<221> rasgo misc
45 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición
<400> 81

50 Asp Xaa Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15
55 Tyr

<210> 82
<211> 17
60 <212> PRT
<213> Sintético
<220>
65 <221> rasgo misc
<223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

ES 2 307 594 T3

<400> 82

5 Asp Ser Xaa Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

10 <210> 83

 <211> 17

 <212> PRT

15 <213> Sintético

 <220>

 <221> rasgo misc

20 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

 <400> 83

25 Asp Ser Ser Xaa Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

30

 <210> 84

 <211> 17

35 <212> PRT

 <213> Sintético

 <220>

40 <221> rasgo misc

 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

 <400> 84

45

 Asp Ser Ser Asn Xaa Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

50 Tyr

 <210> 85

55 <211> 17

 <212> PRT

 <213> Sintético

60 <220>

 <221> rasgo misc

 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

65

ES 2 307 594 T3

<400> 85

```

5      Asp Ser Ser Asn Met Xaa Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
      1          5              10              15
      Tyr

```

10 <210> 86

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Sintético

<220>

<221> rasgo misc

20 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 86

```

25      Asp Ser Ser Asn Met Val Xaa Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
      1          5              10              15
      Tyr

```

30

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Sintético

<220>

40 <221> rasgo misc

<223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 87

```

45      Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Xaa Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
      1          5              10              15
50      Tyr

```

<210> 888

<211> 17

55 <212> PRT

<213> Sintético

<220>

60 <221> rasgo misc

<223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

65

ES 2 307 594 T3

<400> 88

5 Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Xaa Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

10 <210> 89

 <211> 17

 <212> PRT

15 <213> Sintético

 <220>

 <221> rasgo misc

20 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

 <400> 89

25 Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Xaa Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

30

 <210> 90

 <211> 17

 <212> PRT

35 <213> Sintético

 <220>

40 <221> rasgo misc

 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

 <400> 90

45 Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Xaa Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

50

 <210> 91

 <211> 17

55 <212> PRT

 <213> Sintético

 <220>

60 <221> rasgo misc

 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

65

ES 2 307 594 T3

<400> 91

```

    Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Xaa Tyr Tyr Phe Asp
5      1              5              10              15
    Tyr

```

10 <210> 92

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Sintético

<220>

<221> rasgo misc

20 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 92

```

    Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Xaa Tyr Phe Asp
25     1              5              10              15
    Tyr

```

30

<210> 93

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Sintético

<220>

<221> rasgo misc

40 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 93

```

    Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Xaa Phe Asp
45     1              5              10              15
    Tyr

```

50

<210> 94

<211> 17

55 <212> PRT

<213> Sintético

<220>

60 <221> rasgo misc

<223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

65

ES 2 307 594 T3

<400> 94

5 Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Xaa Asp
 1 5 10 15
 Tyr

10 <210> 95

 <211> 17

 <212> PRT

15 <213> Sintético

 <220>

 <221> rasgo misc

20 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

 <400> 95

25 Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Xaa
 1 5 10 15
 Tyr

30

 <210> 96

 <211> 17

35 <212> PRT

 <213> Sintético

 <220>

40 <221> rasgo misc

 <223> X es cualquier diferencia de aminoácido desde el aminoácido normalmente residente en esa posición

 <400> 96

45 Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

50 Xaa

 <210> 97

 <211> 9

55 <212> PRT

 <213> Sintético

 <220>

60 <221> rasgo misc

 <223> La primera vez que aparece X de izquierda a derecha representa un radical aminoácido distinto a arginina, la segunda, tercera y cuarta vez que aparece X representa cualquiera radical aminoácido.

65

ES 2 307 594 T3

<400> 97

5 Gln His Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Ala
1 5

<210> 98

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Sintético

15 <220>

<221> rasgo misc

<223> X es cualquier radical de aminoácido distinto a arginina.

20 <400> 98

25 Gln His Thr Xaa Ala Ala Ala Arg Ala
1 5

<210> 99

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Sintético

35 <400> 99

40 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu
1 5 10

<210> 100

<211> 23

45 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 100

50 cctctcatat ggactacaag gac
23

55 <210> 101

<211> 30

<212> ADN

60 <213> Sintético

<400> 101

65 agtagccagg tctcccgatg tttcatgatg
30

ES 2 307 594 T3

<210> 102
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Sintético

 <400> 102

 10 ctggctactg aatatcttca gctgatgggtg
 30

 15 <210> 103
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Sintético
 20
 <400> 103

 25 cctctcctcg agttagtcta tgtcc
 25

 <210> 104
 30 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintético
 35 <400> 104

 Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 40 1 5 10 15
 Tyr

 45 <210> 105
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Sintético
 50
 <400> 105

 55 agagattcct caaatatggg tcggggaatt attatagcg
 39

 <210> 106
 60 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Sintético
 65

ES 2 307 594 T3

<400> 106

5 gtagtcaaaa tagtacgcta taataattcc ccgaac
36

<210> 107

10 <211> 33

<212> ADN

<213> Sintético

15 <400> 107

20 gtgtattact gtgcgagaga ttcctcaa atg
33

<210> 108

<211> 36

25 <212> ADN

<213> Sintético

30 <400> 108

caggggtgccc tggccccagt agtcaaaata gtacgc
36

35

<210> 109

<211> 39

40 <212> ADN

<213> Sintético

<400> 109

45 gtgtattact gtgcgagagc ttcctcaa atgggttcgg
39

50

<210> 110

<211> 39

<212> ADN

55 <213> Sintético

<400> 110

60 gtgtattact gtgcgagaga tgcctcaa atgggttcgg
39

65 <210> 111

<211> 42

<212> ADN

ES 2 307 594 T3

<213> Sintético

<400> 111

5 aataattccc cgaaccatat ttgcggaatc tctcgcacag ta
 56

10 <210> 112
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Sintético

15 <400> 112

20 aataattccc cgaaccatag ctgaggaatc tctcgcac
 39

25 <210> 113
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Sintético

30 <400> 113

35 aataattccc cgaacggcat ttgaggaatc tctcgc
 36

40 <210> 114
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Sintético

45 <400> 114

50 gattcctcaa atatggctcg ggggaattatt atagcg
 36

55 <210> 115
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Sintético

60 <400> 115

65 gattcctcaa atatggttgc cggaattatt atagcgta
 38

70 <210> 116
 <211> 45

ES 2 307 594 T3

<212> ADN

<213> Sintético

5 <400> 116

gtagtcaaaa tagtacgcta taataattgc ccgaaccata tttga

10 45

<210> 117

<211> 42

15 <212> ADN

<213> Sintético

<400> 117

20

gtagtcaaaa tagtacgcta taatggctcc ccgaaccata tt

42

25

<210> 118

<211> 39

<212> ADN

30 <213> Sintético

<400> 118

35

gtagtcaaaa tagtacgcta tggcaattcc ccgaaccat

39

40

<210> 119

<211> 36

<212> ADN

45 <213> Sintético

<400> 119

50

gtagtcaaaa tagtacgctg caataattcc ccgaac

36

<210> 120

55

<211> 45

<212> ADN

<213> Sintético

60

<400> 120

ggcgccctgg cccagtagt caaaataggc cgctataata attcc

65

45

<210> 121

ES 2 307 594 T3

<211> 45
 <212> ADN
 <213> Sintético
 5 <400> 121

 10 ggtgccctgg cccagtagt caaaagcgta cgctataata attcc
 45

 <210> 12
 15 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Sintético
 20 <400> 122

 cagggtgccc tggccccagt agtcagcata gtacgtata at
 25 42 58

 <210> 123
 <211> 39
 30 <212> ADN
 <213> Sintético
 35 <400> 123

 cagggtgccc tggccccagt aggcaaaata gtacgtat
 40 39

 <210> 124
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Sintético
 <400> 124
 50
 cagggtgccc tggccccagg cgtcaaaata gtacgtat
 39
 55
 <210> 115
 <211> 42
 <212> ADN
 60 <213> Sintético
 <400> 125

 65 agtctgagat ctgaagacac ggctgtgtat tactgtgcga ga
 42

ES 2 307 594 T3

<210> 126
<211> 33
<212> ADN
5 <213> Sintético

<400> 126

10 gtgtattact gtgcgagaga ttcctcaa atg
 33

15 <210> 127
<211> 39
<212> ADN
20 <213> Sintético

<400> 127

25 agagattcct caaatatggt tcggggaatt attatagcg
 39

30 <210> 128
<211> 32
<212> ADN
<213> Sintético
35
<400> 128

 cttgagacgg tgaccagggt gccctggccc ca
40 32

 <210> 129
45 <211> 36
<212> ADN
<213> Sintético

50 <400> 129

 cagggtgccc tggccccagt agtcaaaata gtacgc
55 36

 <210> 130
60 <211> 36
<212> ADN
<213> Sintético

65

ES 2 307 594 T3

<400> 130

gtagtcaaaa tagtacgcta taataattcc ccgaac

5 36

<210> 131

10 <211> 46

<212> ADN

<213> Sintético

15 <400> 131

aataattccc cgaaccatat ttgagatacg tatctctcgc acagta

20 46

<210> 132

<211> 46

25 <212> ADN

<213> Sintético

<400> 132

30 aataattccc cgaaccatat ttgagcgacg tatctctcgc acagta

46

35 <210> 133

<211> 44

<212> ADN

40 <213> Sintético

<400> 133

45 aataattccc cgaaccatat ttgactcgta tctctcgcac agta

60

50 <210> 134

<211> 44

<212> ADN

55 <213> Sintético

<400> 134

60 aataattccc cgaaccatat ttgacacata tctctcgcac agta

44

65 <210> 135

<211> 46

<212> ADN

ES 2 307 594 T3

<213> Sintético

<400> 135

5

aataattccc cgaaccatat tgatacgtgg aatctctcgc acagta

46

10

<210> 136

<211> 46

<212> ADN

15

<213> Sintético

<400> 136

20

aataattccc cgaaccatat tgcgacgtgg aatctctcgc acagta

46

25

<210> 137

<211> 44

<212> ADN

<213> Sintético

30

<400> 137

35

aataattccc cgaaccatat tctcgtggaa tctctcgcac agta

44

<210> 138

40

<211> 44

<212> ADN

<213> Sintético

45

<400> 138

aataattccc cgaaccatat tcacatggaa tctctcgcac agta

50

44

<210> 139

55

<211> 43

<212> ADN

<213> Sintético

60

<400> 139

aataattccc cgaaccatga tacgttgagg aatctctcgc aca

65

43

<210> 140

ES 2 307 594 T3

<211> 43
<212> ADN
<213> Sintético

5
<400> 140

10
aataattccc cgaaccatgc gacgttgagg aatctctcgc aca
43

<210> 141
15 <211> 41
<212> ADN
<213> Sintético

20 <400> 141

aataattccc cgaaccatct cgttgaggaa tctctcgca a

25 41

<210> 142
30 <211> 41
<212> ADN
<213> Sintético

35 <400> 142

aataattccc cgaaccatca cattgaggaa tctctcgcac a

40 41

<210> 143
45 <211> 42
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 143

50 agtctgagat ctgaagacac ggctgtgtat tactgtgcga ga
42

55 <210> 144
<211> 52
<212> ADN

60 <213> Sintético

<400> 144

65 cagcagaagc ttagaccacc atggacatga gggccccgc tcagctcctg gg

ES 2 307 594 T3

<210> 145
 <211> 36
 <212> ADN
 5 <213> Sintético

 <400> 145

 10 cacagccgtg tcttcagatc tcagactgcg cagctc
 36

 15 <210> 146
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sintético
 20
 <400> 146

 gtggaggcac tagagacggt gaccagggtg
 25 30

 <210> 147
 30 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Sintético

 35 <400> 147

 gtgtattact gtgcgagaga tgccgcaa atggttcggg gaattatt
 40 48

 <210> 148
 <211> 53
 45 <212> ADN
 <213> Sintético

 <400> 148
 50
 gtgtattact gtgcgagaga tgcctcagct atggttcggg gaattattat agc
 53

 55 <210> 149
 <211> 53
 <212> ADN
 60 <213> Sintético

 <400> 149

 65 gtgtattact gtgcgagaga ttccgcagct atggttcggg gaattattat agc
 53

ES 2 307 594 T3

<210> 150
 <211> 53
 <212> ADN
 5 <213> Sintético

 <400> 150

 10 gtgtattact gtgcgagaga tgccgcagct atgggtcggg gaattattat agc
 53

 15 <210> 151
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Sintético
 20
 <400> 151

 25 gtggttgaga ggtgccagat gtcaggtcca gctggtgcag
 40

 30 <210> 152
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Sintético
 35
 <400> 152

 ccgctcagct cctgggggtc ctgctattgt ggttgagagg tgccagat
 40 48

 45 <210> 153
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Sintético
 50
 <400> 153

 ccggtcaaca cactacgtac gtgtgcggcg gcgcgggcgt tcggccaagg g
 51
 55
 <210> 154
 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> Sintético

 <400> 154

 65 ccgggcgcgc cttattaaca ctc
 23