

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 101**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08015570 .8**
96 Fecha de presentación: **13.05.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **2009025**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS OSTEOCLASTOS.**

30 Prioridad:
14.05.1998 US 85487 P
03.12.1998 US 110836 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.11.2011

73 Titular/es:
IMMUNEX CORPORATION
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320, US

72 Inventor/es:
Anderson, Dirk M. y
Galibert, Laurent J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 101 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para inhibición de la actividad de los osteoclastos

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere general al campo de los receptores de las citocinas, y de manera más específica, a las parejas receptor/ligando de citocinas que tienen actividad reguladora de los osteoclastos. La invención pertenece a la actividad de un anticuerpo que se une a un polipéptido rankl y antagoniza la reacción de rank y rankl.

Antecedentes de la invención

- 10 RANK (Activador del receptor de NF- κ B) y su ligando (RANKL) son una pareja receptor/ligando recientemente descrita que juega un importante papel en una respuesta inmune. En los documentos US 6017729 y US 6242213 se describe la clonación de RANK y RANKL respectivamente. Se ha encontrado recientemente que RANKL contiene una proteína denominada como osteoprotegerina (OPG), un miembro de la familia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR). Yasuda y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. 95:3597; 1998) por ejemplo clonaron la expresión de un ligando de OPG, que se denominó como factor inhibidor de la osteoclastogénesis. Lacey y col. (Cell 93:165; 1998) repitieron su trabajo. En ambos casos, el ligando que clonaron resultó ser idéntico a RANKL.

- 15 El documento de Simonet y col., Cell, vol.89, pp.309-319 describe la clonación y la caracterización de la osteoprotegerina (OPG).

El documento de Anderson y col., Nature, vol.390, pp.175-179 describe el uso de una fusión entre una IgFc y el dominio extracelular de RANK para identificar el Ligando de RANK (RANKL).

- 20 El documento de Read R, J. Antimicrob. Chemother., vol. 41, Suppl. A, pp.65-69 descubre TNFR y anticuerpos contra TNF solubles como antagonistas de TNF.

- 25 En la osteoclastogénesis, la interacción de un osteoblasto o célula estromal con un precursor osteoclástico conduce a la diferenciación del precursor en un osteoclasto. Se sabe que la OPG inhibe esta diferenciación. Se ha propuesto un modelo en el que RANKL en el osteoblasto o en la superficie de la célula estromal interactúa con un receptor específico sobre una superficie del osteoclasto progenitor, señalizando un episodio de diferenciación. OPG bloquea eficazmente la interacción de RANKL con un receptor sobre los osteoclastos progenitores *in vitro*, y se ha demostrado que mejora los efectos de la ovariectomía sobre la pérdida ósea en ratones. Sin embargo. Se sabe también que la OPG se une a otros ligandos de la familia TNF, lo que puede tener un efecto perjudicial sobre las actividades de dichos ligandos *in vivo*. Además, la presencia de otros ligandos que se unen a la OPG *in vivo* puede requerir elevadas dosificaciones de la OPG que se va a administrar con el fin de tener suficiente OPG soluble disponible para inhibir la osteoclastogénesis.

- 30 De acuerdo con esto, existe una necesidad en la técnica de identificar factores solubles que se unan específicamente a RANKL e inhiban la capacidad de RANKL para inducir la osteoclastogénesis sin reaccionar con otros ligandos.

Resumen de la invención

La invención en su sentido más amplio es tal como se define en las reivindicaciones independientes.

Las formas de realización preferidas son como se enumeran en las reivindicaciones dependientes.

- 35 **Descripción detallada de la invención**

- La presente divulgación proporciona procedimientos asociados con el uso de un receptor novedoso, denominado como RANK (por activador del receptor de NF- κ B), que es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. RANK es una proteína transmembrana de Tipo I que tiene 616 restos de aminoácidos, que comprende un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio citoplásmico. RANK interactúa con diversos Factores Asociados al Receptor de TNF (TRAF); que estimulan los resultados de RANK en la regulación en exceso del factor de transcripción NF- κ B, un factor de transcripción ubicuo que se utiliza lo más extensamente en células del sistema inmune.

- 40 Se pueden preparar formas solubles del receptor y usarse para interferir con la transducción de la señal a través de RANK unido a membrana. La inhibición de la transducción de la señal medida por RANKL será útil para mejorar los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica en estados de enfermedad en los que existen demasiadas roturas de huesos. Entre los ejemplos de dichas dolencias se incluyen osteoporosis, enfermedad de Paget, cánceres que pueden metastatizar el hueso e inducir roturas de huesos (es decir, mieloma múltiple, cáncer de mama, algunos melanomas, véase también Mundy, C. Cancer Suppl. 80: 1546; 1997), y cánceres que no metastatizan necesariamente el hueso, pero dan como resultado una hipercalcemia y la pérdida de hueso (por ejemplo, carcinoma de células escamosas).

Las formas solubles de RANK comprenden el dominio extracelular de RANK o uno de sus fragmentos que se une a

RANKL. Se pueden preparar proteínas de fusión de RANK para facilitar la preparación de RANK soluble. Entre los ejemplos de dichas proteínas de fusión se incluyen una proteína de fusión RANK/Fc, una proteína de fusión de un resto en cremallera (es decir, una cremallera de leucina), y diversas etiquetas que son conocidas en la materia. Se dan a conocer también en la invención otros antagonistas de la interacción de RANK y RANKL (es decir, anticuerpos dirigidos contra RANKL, moléculas pequeñas), tal como se define en las reivindicaciones. Estos y otros aspectos de la presente invención llegarán a ser evidentes tras referencia a la siguiente descripción detallada de la invención.

Se identificó una inserción de ADNc parcial novedosa con un marco de lectura abierto previsto que tiene alguna similitud con CD40 y se usó para hibridar las manchas de colonias generadas a partir de una biblioteca de ADNc de una célula dendrítica (CD) que contenía los ADNc de longitud completa. La SEQ ID NO: 1 muestra los nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de una proteína de longitud completa prevista.

RANK es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF; se asemeja mucho a CD40 en la región extracelular. RANK se expresa en las células epiteliales, algunas líneas de linfocitos B, y en linfocitos T activados. Sin embargo, su expresión en linfocitos T activados es tardía, aproximadamente cuatro días después de la activación. Este curso temporal de la expresión coincide con la expresión de Fas, un conocido agente de la apoptosis. RANK puede actuar como una señal antiapoptótica, rescatando células que expresan RANK de la apoptosis tal como se sabe que hace CD40. Alternativamente, RANK puede confirmar una señal apoptótica en las circunstancias apropiadas, de nuevo, de manera similar a CD40. Es probable que RANK y su ligando jueguen un papel integral en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Se describe el aislamiento de un ADN que codifica RANK en el documento US 6017729. El documento US 6017729 describe algunas formas de RANK.

RANK soluble comprende el péptido señal y el dominio extracelular (restos 1 a 213 de la SEQ ID NO: 2) o uno de sus fragmentos. Alternativamente se puede sustituir un péptido señal diferente por el líder nativo, comenzando con el resto 1 y continuando a través de un resto seleccionado entre el grupo constituido por los aminoácidos 24 a 33 (inclusive) de la SEQ ID NO: 2. Además, los fragmentos del dominio extracelular proporcionarán también formas solubles de RANK.

Se pueden preparar los fragmentos usando técnicas conocidas para aislar una porción deseada de la región extracelular, y se pueden preparar, por ejemplo, comparando la región extracelular con las de otros miembros de la familia de TNFR (de la cual RANK es un miembro) y seleccionando las formas similares a las preparadas para otros miembros de la familia. Alternativamente, se pueden usar sitios de restricción únicos o técnicas de la PCR que se conocen en la materia para preparar numerosas formas truncadas que se pueden expresar y analizar para la actividad.

Otros derivados de las proteínas RANK incluyen conjugados covalentes o agregativos de las proteínas o de sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tales como mediante síntesis en cultivo recombinante como fusiones N terminales o C terminales. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser una secuencia polipeptídica señal (o líder) en la región N terminal de la proteína que dirige de manera traduccionalmente simultánea o después de la traducción la transferencia de la proteína desde su sitio de síntesis a su sitio de función en el interior o en el exterior de la membrana o de la pared celular (por ejemplo, el factor α líder de levadura).

Las proteínas de fusión pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o la identificación de las proteínas RANK y los homólogos (por ejemplo, poli-His). Se puede unir también la secuencia de aminoácidos de la proteína a un péptido de identificación tal como el descrito por Hopp y col., *BioTechnology* 6: 1204 (1988; FLAG™). Dicho péptido muy antigénico proporciona un epítipo unido de manera reversible mediante un anticuerpo monoclonal específico, permitiendo una rápida prueba y una fácil purificación de la proteína recombinante expresada. La secuencia de Hopp y col. se escinde también específicamente mediante la enterocinasa mucosal bovina, facilitando la eliminación del péptido procedente de la proteína purificada.

Las proteínas de fusión comprenden además la secuencia de aminoácidos de RANK unida a una región Fc de la inmunoglobulina. Una región Fc a modo de ejemplo es una IgG humana, que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. Se pueden usar también fragmentos de una región Fc, como pueden ser las metéinas de Fc. Por ejemplo, algunos restos en el interior de la región bisagra de una región Fc son críticos para disponer de una elevada afinidad de unión con Fc γ RI. Canfield y Morrison (*J. Exp. Med.* 173: 1483; 1991) informaron que Leu₍₂₃₄₎ y Leu₍₂₃₅₎ fueron críticos para la elevada afinidad de unión de IgG₃ con Fc γ RI presente en células U937. Lund y col. (*J. Immunol.* 147: 2657, 1991; *Molecular Immunol.* 29: 53, 1991) obtuvieron similares resultados. Se pueden realizar dichas mutaciones, solas o en combinación en una región Fc de IgG, para disminuir la afinidad de IgG₁ por FcR. Dependiendo de la porción de la región Fc usada, se puede expresar una proteína de fusión como un dímero, mediante la formación de enlaces disulfuro intercadena. Si se preparan las proteínas de fusión con las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, es posible formar un oligómero de proteína con como mucho cuatro regiones RANK.

En otro aspecto, las proteínas RANK comprenden además un péptido de oligomerización tal como un dominio en cremallera. Se identificaron originalmente cremalleras de leucina en algunas proteínas de unión al ADN (Landschulz y col., Science 240: 1759, 1988). El dominio en cremallera es un término usado para referirse a un dominio peptídico conservado presente en estas proteínas (y en otras), que es responsable de la multimerización de las proteínas. El dominio en cremallera comprende una repetición en héptada repetitiva, con cuatro o cinco restos de leucina, isoleucina o valina intercalados con otros aminoácidos. Los ejemplos de dominios en cremallera son los que se encuentran en el factor GCN4 de transcripción de levadura y en una proteína de unión al ADN térmicamente estable que se encuentra en el hígado de rata (C/EBP; Landschulz y col., Science 243: 1681, 1989). Dos proteínas transformantes nucleares *fos* y *jun*, presentan también dominios en cremallera, como lo hace el producto génico del protooncogen de murino, *c-myc* (Landschulz y col., Science 240: 1759, 1988). Los productos de los oncogenes nucleares *fos* y *jun* comprenden dominios en cremallera que forman preferentemente un heterodímero (O'Shea y col., Science 245: 646, 1989; Turner y Tjian, Science 243: 1689, 1989). Un resto en cremallera preferido es el de SEQ ID NO: 6 o uno de sus fragmentos. Se dan a conocer este y otros restos en cremallera en la Patente de los Estados Unidos 5.716.805.

Otras proteínas útiles incluyen los polipéptidos RANK codificados por ADN capaces de hibridarse con el ADN de SEQ ID NO: 1 en condiciones moderadamente rigurosas (disolución de prelavado de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y en condiciones de hibridación de 50°C, 5 X SSC, durante la noche) con las secuencias de ADN que codifican RANK, o más preferiblemente en condiciones rigurosas (por ejemplo, hibridación en 6 X SSC a 63°C durante la noche; lavado en 3 X SSC a 55°C) y otras secuencias que están degeneradas con las que codifican RANK. En un aspecto los polipéptidos RANK son al menos aproximadamente un 70% idénticos en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de la proteína RANK natural tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 para RANK humano y en la NO: 6 para RANK de murino. En otro aspecto, los polipéptidos RANK son al menos aproximadamente un 80% idénticos en la secuencia de aminoácidos a la forma natural de RANK; los polipéptidos más preferidos son los que son al menos aproximadamente un 90% idénticos a RANK natural.

Se puede determinar el porcentaje de identidad usando un programa informático, por ejemplo, el programa informático GAP descrito por Devereux y col. (Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984) y disponible del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGGC). Para los fragmentos derivados de la proteína RANK, se calculó la identidad basándose en la porción de la proteína RANK que está presente en el fragmento.

Se puede determinar la actividad biológica de los análogos o de las muteínas de RANK probando la capacidad de los análogos o de las muteínas de unirse a RANKL, por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos en el presente documento. Las pruebas adecuadas incluyen por ejemplo, una inmunopueba enzimática o una inmunotransferencia, y pruebas que emplean células que expresan RANKL. Las pruebas adecuadas incluyen también, por ejemplo, pruebas de inhibición, en las que se usa RANK soluble para inhibir la interacción de RANKL con RANK asociado a fase sólida o unido a membrana (es decir, pruebas de transducción de la señal). Dichos procedimientos son bien conocidos en la materia.

RANKL y RANK son importantes factores en la osteoclastogénesis. RANK se expresa en osteoclastos e interactúa con el ligando de RANK (RANKL) para mediar en la formación de células multinucleadas de tipo osteoclasto (OCL). Se demostró esto tratando preparaciones de médula ósea de ratón con M-CSF (CSF-1) y RANKL soluble durante 7 días en cultivo. No fueron necesarias hormonas o factores osteoclastogénicos para la generación de células multinucleadas. Ni M-CSF ni RANK solos condujeron a la formación de OCL. Las células multinucleadas expresaron fosfatasa ácida resistente a tartrato y fueron positivas a la unión de la [¹²⁵I]- calcitonina. La tirosina cinasa c-src se expresó mucho en OCL multinucleadas y un subconjunto de células mononucleares tal como se demostró mediante microscopio de inmunofluorescencia (Véase el Ejemplo 2).

Purificación de RANK recombinante

Se prepararon RANK purificado, y sus homólogos o análogos cultivando sistemas hospedador/vector adecuados para expresar los productos de traducción recombinantes de los ADN, que se purificaron a continuación de los medios de cultivo o de los extractos celulares. Por ejemplo, se pueden concentrar en primer lugar los sobrenadantes de sistemas que segregan proteínas recombinantes en los medios de cultivo usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

Tras la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender una proteína de contraestructura o lectina o molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos dietilaminoetil (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo. La cromatografía de filtración en gel proporciona también un medio de purificación de las proteínas.

La cromatografía de afinidad es un procedimiento particularmente preferido para purificar RANK y sus homólogos. Por

ejemplo, se puede purificar RANK expresada como una proteína de fusión que comprende una región Fc de inmunoglobulina usando la cromatografía de afinidad de la Proteína A o de la Proteína G. Además, se puede purificar una proteína RANK que comprende un dominio en cremallera oligomerizante sobre una resina que comprende un anticuerpo específico del dominio en cremallera oligomerizante. Pueden ser útiles también anticuerpos monoclonales contra la proteína RANK en la purificación mediante cromatografía de afinidad, utilizando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Se puede usar también un ligando para preparar una matriz de afinidad para la purificación por afinidad de RANK.

Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) empleando medios RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene metilos colgantes u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una composición d RANK. Los procedimientos adecuados incluyen los análogos al procedimiento dado a conocer por Urdal y col. (J. Chromatog. 296: 171, 1984). Se pueden emplear alguna o todas las anteriores etapas de purificación, en diferentes combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en un cultivo bacteriano se aísla normalmente mediante la extracción inicial de los aglomerados celulares, seguida de una o varias etapas de concentración y desalinización mediante cromatografía de intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión molecular. Finalmente se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas finales de la purificación. Se pueden perturbar las células microbianas empleadas en la expresión de la proteína recombinante mediante cualquier procedimiento conveniente, incluyendo un ciclo de congelación descongelación, sonicación, perturbación mecánica, o uso de agentes de lisado celular. La fermentación de levaduras que expresa n la proteína como una proteína secretada simplifica mucho la purificación.

La proteína sintetizada en el cultivo recombinante se caracteriza por la presencia de componentes celulares, que incluyen proteínas, en cantidades y de un carácter que depende de las etapas de purificación adoptadas para recuperar la proteína del cultivo. Estos componentes serán ordinariamente de levaduras, de origen procariota o eucariota superior no humano, y están presentes preferiblemente en cantidades contaminantes inocuas, del orden de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso. Además, el cultivo celular recombinantes permite la producción de las proteínas exentas de otras proteínas que se pueden asociar normalmente con las proteínas ya que se encuentran en la naturaleza en las especies de origen.

Usos y administración de composiciones de RANK o de una composición que comprende un anticuerpo que se une a un polipéptido rankl y antagoniza la interacción de rank y rankl.

[0031] La presente invención es tal como se detalla en las reivindicaciones. Las composiciones terapéuticas comprenden una proteína y un diluyente y vehículo adecuados.

Normalmente, el individuo está afectado de un exceso de resorción ósea y padece de los efectos de hipercalcemia, tiene los síntomas de la hipercalcemia, o está padeciendo una enfermedad que implica una excesiva resorción ósea. Además, para regular la actividad osteoclástica, el uso o el anticuerpo para el uso tal como se enumera en las reivindicaciones aplicables para inhibir la actividad osteoclástica, que regula la generación de osteoclastos e inhibe la generación de osteoclastos en individuos afligidos con exceso de resorción ósea, tal como se enumera en las reivindicaciones. Se describe el uso de RANK junto con receptores de citocinas o citocinas solubles u otras moléculas reguladoras de osteoclastos/osteoblastos.

Se sabe que el ligando de RANK (RANKL) en osteoblastos o células estromales interactúa con RANK en las superficies de los osteoclastos progenitores señalizando un episodio que conduce a la diferenciación de osteoclastos precursores en osteoclastos. (Véase el Ejemplo 2 a continuación) De esta manera, RANK, y en particular las formas solubles de RANK, es útil para la inhibición de la transducción de la señal medida por RANKL, que conduce a la diferenciación de los osteoclastos precursores en osteoclastos. Las formas solubles de RANK son también útiles para la regulación e inhibición de la actividad osteoclástica, por ejemplo, de la resorción ósea. Interfiriendo con la diferenciación osteoclástica, las formas solubles de RANK son útiles en la mejora de los efectos de la osteoclastogénesis en los estados de enfermedad en los que existe un exceso de rotura del hueso. Dichos estados de enfermedad incluyen la enfermedad de Paget, osteoporosis y cáncer. Muchos cánceres metastatizan el hueso e induce la rotura del mismo perturbando localmente la remodelación normal del hueso. Dichos cánceres pueden estar asociados con el aumento en el número de osteoclastos y con el aumento en la cantidad de resorción del hueso osteoclástico que da como resultado hipercalcemia. Estos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, mieloma múltiple, melanomas, cáncer de pulmón, de próstata, hematológico, de cabeza y de cuello, y renal (véase Guise y col. Endocrine Reviews, 19(1): 18-54, 1998.) Se pueden administrar formas solubles de RANK a dichos pacientes con cáncer para interrumpir la ruta de la diferenciación osteoclástica y dar como resultado un número pequeño de osteoclastos, menor resorción ósea, y el alivio de los efectos negativos de la hipercalcemia.

Otros cánceres no metastatizan el hueso, pero se sabe que actúan sistemáticamente en el hueso para interrumpir la remodelación ósea y dar como resultado hipercalcemia (Véase Guise y col. Endocrine Reviews, 19(1): 18-54, 1998.). Se ha encontrado que RANKL, en la superficie de algunas células escamosas, no metastatiza al hueso, pero está asociado con hipercalcemia. (Véase el Ejemplo 3 a continuación). Las células escamosas que se asocian con hipercalcemia

expresan también M-CSF (CSF-1), una citocina que, junto con RANKL, estimula la proliferación y la diferenciación de osteoclastos precursores en osteoclastos. Se ha descubierto que M-CSF regula en exceso directamente RANK en las superficies de los osteoclastos precursores. Cuando las células escamosas liberan cantidades excesivas de CSF-1, se produce una creciente expresión de RANK en las superficies de los osteoclastos precursores. De esta manera, existe una probabilidad muy elevada de que RANK interactúe con RANKL en los osteoblastos o en las células estromales para producir un creciente número de osteoclastos, dando como resultado un aumento en la cantidad de roturas del hueso e hipercalcemia.

Además de mejorar los efectos de los cánceres que metastatizan el hueso, la presente divulgación describe procedimientos para mejorar los efectos sistémicos, por ejemplo, la hipercalcemia, de los cánceres que están asociados con un exceso en la actividad osteoclástica (por ejemplo, carcinomas de células escamosas). Dichos procedimientos incluyen administrar formas solubles de RANK en cantidades suficientes para interferir con la transducción de la señal RANK/RANKL que conduce a la diferenciación de los osteoclastos precursores en osteoclastos. Muy pocos osteoclastos conducen a reducir la resorción ósea y al alivio de los efectos negativos de la hipercalcemia.

Para uso terapéutico, se formula la proteína purificada para la administración a un individuo, preferiblemente a un ser humano, para el tratamiento de una manera apropiada a la indicación de esta manera, por ejemplo, se pueden formular composiciones de proteína RANK formuladas para la administración para regular la función de los osteoclastos para administración mediante inyección de bolo, infusión continua, liberación continua a partir de implantes, u otra técnica adecuada normalmente, se puede formular un agente terapéutico para la administración en la forma de una composición que comprende RANK purificada, junto con vehículos, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Dichos vehículos no serán tóxicos a los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

De manera ordinaria, la preparación de dichas composiciones de proteínas implica combinar la proteína con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos) proteínas, aminoácidos, carbohidratos, incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero de la misma especie son diluyentes apropiados a modo de ejemplo. Preferiblemente el producto se formula como un liofilizado usando disoluciones de excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Se pueden determinar las dosificaciones apropiadas en los ensayos. La cantidad y frecuencia de administración dependerán, por supuesto, de dichos factores como la naturaleza y la gravedad de la indicación que se está tratando, la respuesta deseada, la dolencia del paciente, y así sucesivamente.

Se pueden formular formas solubles de RANK y otros antagonistas de RANK tales como anticuerpos monoclonales antagonistas para la administración con el objetivo de inhibir la osteoclastogénesis inducida por RANK. Es deseable inhibir la osteoclastogénesis en diversos estados de enfermedad en los que se produce una pérdida ósea en exceso. Los ejemplos incluyen osteoporosis, enfermedad de Paget, y diversos cánceres. Se conocen en la técnica algunos modelos animales de estas enfermedades; de acuerdo con esto, es una materia de experimentación rutinaria determinar las dosificaciones y rutas de administración óptimas de RANK soluble, primero en un modelo animal y a continuación en ensayos clínicos en seres humanos.

Se ofrecen los siguientes ejemplos como medio de ilustración, y no como medio de limitación. Los expertos en la materia reconocerán que se pueden realizar variaciones de la invención incorporadas en los ejemplos, especialmente a la luz de las diversas referencias citadas en el presente documentos.

Ejemplo 1

Este ensayo describe un ensayo de unión a placa útil para comparar la capacidad de algunos ligandos de unirse a receptores. Se llevó a cabo este ensayo esencialmente tal como se describe en Smith y col., Virology 236: 316 (1997). De manera breve, se revistieron placas de microvaloración de 96 pocillos con un anticuerpo de una Fc humana (es decir, un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra Fc humana). Se añadieron a continuación proteínas de fusión receptor/Fc, y tras incubación, se lavaron las placas. A continuación se añadieron diluciones en serie. Los ligandos se pueden marcar directamente (es decir, con ¹²⁵I), o se puede usar un reactivo de detección que está marcado radioactivamente. Tras la incubación, se lavaron las placas, se liberaron específicamente los ligandos unidos, y se cuantificó la cantidad de ligando unido.

Usando este procedimiento, RANK/Fc y OPG/Fc se unieron a placas de 96 pocillos. En un procedimiento indirecto, se detectó una fusión RANKL/resto en cremallera usando un anticuerpo marcado con el resto en cremallera. Se encontró que OPG/Fc se unía a mRANKL a 0,05 nM, y que RANK/Fc se unía a mRANKL a 0,1 nM. Estos valores indican similares afinidades de unión de OPG y RANK para RANKL, confirmando la utilidad de RANK como un inhibidor de la actividad osteoclástica de una manera similar a OPG.

Ejemplo 2 (Ejemplo comparativo)

Lo siguiente describe la formación de células similares a osteoclastos procedentes de médula ósea (MO) de murino en presencia de CSF-1. Estos osteoclastos se formaron mediante la fusión de células de tipo macrófagos y se caracterizaron por su positividad a TRAP (fosfatasa ácida resistente a tartrato). No se observaron células TRAP⁺ en cultivos que

5

contenían CSF-1 solo o en cultivos que contenían CSF-1 y TRAIL LZ (un control para el RANKL LZ soluble). Incluso aunque la médula ósea de seres humanos y monos contiene más fibroblastos contaminantes que la médula ósea de murino, se generaron osteoclastos a partir de la médula ósea de murino y de mono con la combinación de CSF-1 y RANKL LZ soluble. En un estudio de respuesta a la dosis usando médula ósea de murino y cantidades subóptimas de CSF-1 (40 ng/ml), los efectos de RANKL LZ soluble se interrumpieron a aproximadamente 100 ng/ml.

10

Se estudió el efecto de RANKL LZ soluble sobre la proliferación de las células en los mismos cultivos usando Azul Alamar. Después de 5 días, la respuesta proliferativa fue inferior en los cultivos que contenían CSF-1 y RANKL LZ que en los que contenían solo CSF-1. Esto apoya la observación de RANKL LZ soluble está induciendo la diferenciación de los osteoclastos. Cuando CSF-1 y RANKL LZ se eliminaron mediante lavado de los cultivos de MO de murino en los días 7 u 8, las células no sobreviven si se vuelven a cultivar n medio o solo en RANKL LZ. E contraste, las células sobreviven si se vuelven a cultivar en CSF-1. Cuando se añadió RANKL LZ a estos cultivos, no se añadieron beneficios. De esta manera, se requiere la combinación de CSF-1 y RANKL para la generación de osteoclastos. Adicionalmente, una vez formado, CSF-1 es suficiente para mantener su supervivencia en el cultivo.

15

Finalmente, usando médula ósea humana, se compararon mAb soluble dirigido contra RANK humano y mAb inmovilizado dirigido contra RANK humano con RANKL LZ, para la generación de osteoclastos en presencia de CSF-1. Se encontró que M331 inmovilizado y RANKL LZ eran igualmente eficaces para la generación de osteoclastos mientras que M331 soluble fue superior al anticuerpo inmovilizado y a RANKL LZ, esto confirma que la actividad en la diferenciación de los osteoclastos de RANKL está medida a través de RANK más bien que mediante un receptor alternativo.

20

Debido a que no se pueden cosechar fácilmente los osteoclastos y analizarse mediante citometría de flujo, se utilizaron ensayos de unión a calcitonina marcada con ¹²⁵I para identificar los osteoclastos (se considero que el receptor de la calcitonina era un marcador específico de osteoclastos). Los osteoclastos generados de la MO de murino cultivada con CSF-1 y RANKL LZ durante 9 días mostraron la unión de la calcitonina radiomarcada confirmando su identidad osteoclástica

25

Ejemplo 3 (Ejemplo comparativo)

Con el fin de determinar la expresión de RANKL en dos carcinomas de células escamosas diferentes, se llevaron a cabo la transferencia Western y los estudios de RT-PCR en células MH-85 y OKK. Unas de estas células de carcinoma, las células MH-85 se asocian con hipercalcemia.

30

Los resultados confirmaron que las células escamosas MH-85 y OKK expresan RANKL. Las células MH-85, además de estar relacionadas con la hipercalcemia en pacientes que padecen este carcinoma, también expresan M-CSF (CSF-1). Se determinó también que CSF-1 regula en exceso la expresión de RANK en osteoclastos precursores. El aumento en la cantidad de CSF-1 en pacientes con cáncer de células escamosas de tipo MH-85 puede conducir a la regulación en exceso de RANK y a un aumento en la interacción de RANK con RANKL. Las señales transducidas por la interacción de RANK y RANKL dan como resultado números crecientes de osteoclastos maduros y rotura de huesos. Debido a que las formas solubles de RANK pueden inhibir la interacción RANK/RANKL, la administración de una forma soluble de RANK (por ejemplo, la región extracelular de RANK fusionada a una FC) a un paciente con cáncer de células escamosas proporciona el alivio de los efectos adversos de este cáncer, incluyendo la hipercalcemia.

35

40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Immunex Corporation

Anderson, Dirk M.

Galibert, Laurent

45

<120> TÍTULO DE LA INVENCION: PROCEDIMIENTO PARA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS OSTEOCLASTOS

<130> 2874-WO

<140> PCT/US99/10588 <141> 13-05-1999

<160> 6

<170> PatentIn Ver.2.0

<210> 1

<211> 3136

<212> ADN

5 <213> Ser humano

<220>

<221> CDS

<222> 39..1886

<400> 1

10	CCGCTGAGGC CGCGGCGCCC GCCAGCCTGT CCCGCGCC ATG GCC CCG CGC GCC	53
	Met Ala Pro Arg Ala	
	1 5	
	CGG CGG CGC CGC CCG CTG TTC GCG CTG CTG CTG CTC TGC GCG CTG CTC	101
	Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu	
	10 15 20	
15	GCC CGG CTG CAG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT ACC AGT GAG	149
	Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu	
	25 30 35	
	AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC AAA TGT GAA CCA GGA	197
	Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly	
	40 45 50	
	AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT GAC AGT GTA TGT CTG	245
	Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu	
	55 60 65	
20	CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG AAT GAA GAA GAT AAA	293
	Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys	
	70 75 80 85	
	TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG GCC CTG GTG GCC GTG	341
	Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val	
	90 95 100	
25	GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC GCG TGC ACG GCT GGG	389
	Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly	
	105 110 115	
	TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC CGC AAC ACC GAG TGC	437

		Tyr	His	Trp	Ser	Gln	Asp	Cys	Glu	Cys	Cys	Arg	Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	
				120					125					130				
		GCG	CCG	GGC	CTG	GGC	GCC	CAG	CAC	CCG	TTG	CAG	CTC	AAC	AAG	GAC	ACA	485
		Ala	Pro	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Leu	Gln	Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	
				135				140					145					
		GTG	TGC	AAA	CCT	TGC	CTT	GCA	GGC	TAC	TTC	TCT	GAT	GCC	TTT	TCC	TCC	533
		Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Leu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Ser	Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	
				150			155					160					165	
5		ACG	GAC	AAA	TGC	AGA	CCC	TGG	ACC	AAC	TGT	ACC	TTC	CTT	GGA	AAG	AGA	581
		Thr	Asp	Lys	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Thr	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	
						170					175					180		
		GTA	GAA	CAT	CAT	GGG	ACA	GAG	AAA	TCC	GAT	GCG	GTT	TGC	AGT	TCT	TCT	629
		Val	Glu	His	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	
						185				190					195			
10		CTG	CCA	GCT	AGA	AAA	CCA	CCA	AAT	GAA	CCC	CAT	GTT	TAC	TTG	CCC	GGT	677
		Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	
				200					205					210				
		TTA	ATA	ATT	CTG	CTT	CTC	TTC	GCG	TCT	GTG	GCC	CTG	GTG	GCT	GCC	ATC	725
		Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	
								220					225					
		ATC	TTT	GGC	GTT	TGC	TAT	AGG	AAA	AAA	GGG	AAA	GCA	CTC	ACA	GCT	AAT	773
		Ile	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	
							235					240					245	
15		TTG	TGG	CAC	TGG	ATC	AAT	GAG	GCT	TGT	GGC	CGC	CTA	AGT	GGA	GAT	AAG	821
		Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	
						250					255					260		
		GAG	TCC	TCA	GGT	GAC	AGT	TGT	GTC	AGT	ACA	CAC	ACG	GCA	AAC	TTT	GGT	869
		Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	
					265					270					275			
		CAG	CAG	GGA	GCA	TGT	GAA	GGT	GTC	TTA	CTG	CTG	ACT	CTG	GAG	GAG	AAG	917
		Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	
				280					285					290				
20		ACA	TTT	CCA	GAA	GAT	ATG	TGC	TAC	CCA	GAT	CAA	GGT	GGT	GTC	TGT	CAG	965
		Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	
								300					305					
		GGC	ACG	TGT	GTA	GGA	GGT	GGT	CCC	TAC	GCA	CAA	GGC	GAA	GAT	GCC	AGG	1013
		Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	
						315						320					325	
		ATG	CTC	TCA	TTG	GTC	AGC	AAG	ACC	GAG	ATA	GAG	GAA	GAC	AGC	TTC	AGA	1061
		Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	
						330					335					340		
25		CAG	ATG	CCC	ACA	GAA	GAT	GAA	TAC	ATG	GAC	AGG	CCC	TCC	CAG	CCC	ACA	1109
		Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	
					345					350					355			
		GAC	CAG	TTA	CTG	TTC	CTC	ACT	GAG	CCT	GGA	AGC	AAA	TCC	ACA	CCT	CCT	1157
		Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	
				360					365					370				
30		TTC	TCT	GAA	CCC	CTG	GAG	GTG	GGG	GAG	AAT	GAC	AGT	TTA	AGC	CAG	TGC	1205
		Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	
				375				380					385					

ES 2 368 101 T3

		TTC	ACG	GGG	ACA	CAG	AGC	ACA	GTG	GGT	TCA	GAA	AGC	TGC	AAC	TGC	ACT	1253
		Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	
		390					395					400					405	
		GAG	CCC	CTG	TGC	AGG	ACT	GAT	TGG	ACT	CCC	ATG	TCC	TCT	GAA	AAC	TAC	1301
		Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	
						410					415					420		
5		TTG	CAA	AAA	GAG	GTG	GAC	AGT	GGC	CAT	TGC	CCG	CAC	TGG	GCA	GCC	AGC	1349
		Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Ser	
					425					430					435			
		CCC	AGC	CCC	AAC	TGG	GCA	GAT	GTC	TGC	ACA	GGC	TGC	CGG	AAC	CCT	CCT	1397
		Pro	Ser	Pro	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	Cys	Arg	Asn	Pro	Pro	
				440					445					450				
		GGG	GAG	GAC	TGT	GAA	CCC	CTC	GTG	GGT	TCC	CCA	AAA	CGT	GGA	CCC	TTG	1445
		Gly	Glu	Asp	Cys	Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Ser	Pro	Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	
			455					460					465					
10		CCC	CAG	TGC	GCC	TAT	GGC	ATG	GGC	CTT	CCC	CCT	GAA	GAA	GAA	GCC	AGC	1493
		Pro	Gln	Cys	Ala	Tyr	Gly	Met	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Ser	
		470					475					480					485	
		AGG	ACG	GAG	GCC	AGA	GAC	CAG	CCC	GAG	GAT	GGG	GCT	GAT	GGG	AGG	CTC	1541
		Arg	Thr	Glu	Ala	Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	
						490					495					500		
		CCA	AGC	TCA	GCG	AGG	GCA	GGT	GCC	GGG	TCT	GGA	AGC	TCC	CCT	GGT	GGC	1589
		Pro	Ser	Ser	Ala	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	
					505					510					515			
15		CAG	TCC	CCT	GCA	TCT	GGA	AAT	GTG	ACT	GGA	AAC	AGT	AAC	TCC	ACG	TTC	1637
		Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Gly	Asn	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	
				520					525					530				
		ATC	TCC	AGC	GGG	CAG	GTG	ATG	AAC	TTC	AAG	GGC	GAC	ATC	ATC	GTG	GTC	1685
		Ile	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Met	Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Val	
			535					540					545					
		TAC	GTC	AGC	CAG	ACC	TCG	CAG	GAG	GGC	GCG	GCG	GCG	GCT	GCG	GAG	CCC	1733
		Tyr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	
20		550					555					560					565	
		ATG	GGC	CGC	CCG	GTG	CAG	GAG	GAG	ACC	CTG	GCG	CGC	CGA	GAC	TCC	TTC	1781
		Met	Gly	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Asp	Ser	Phe	
						570					575					580		
		GCG	GGG	AAC	GGC	CCG	CGC	TTC	CCG	GAC	CCG	TGC	GGC	GGC	CCC	GAG	GGG	1829
		Ala	Gly	Asn	Gly	Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Pro	Cys	Gly	Gly	Pro	Glu	Gly	
					585					590					595			
25		CTG	CGG	GAG	CCG	GAG	AAG	GCC	TCG	AGG	CCG	GTG	CAG	GAG	CAA	GGC	GGG	1877
		Leu	Arg	Glu	Pro	Glu	Lys	Ala	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Gln	Gly	Gly	
				600					605						610			
		GCC	AAG	GCT	TGAGCGCCCC	CCATGGCTGG	GAGCCCGAAG	CTCGGAGCCA										1926
		Ala	Lys	Ala														
				615														
		GGGCTCGCGA	GGGCAGCACC	GCAGCCTCTG	CCCCAGCCCC	GGCCACCCAG	GGATCGATCG											1986
		GTACAGTCGA	GGAAGACCAC	CCGGCATTCT	CTGCCCACTT	TGCCTTCCAG	GAAATGGGCT											2046
30		TTTCAGGAAG	TGAATTGATG	AGGACTGTCC	CCATGCCAC	GGATGCTCAG	CAGCCCCCGG											2106
		CACTGGGGCA	GATGTCTCCC	CTGCCACTCC	TCAAACCTCGC	AGCAGTAATT	TGTGGCACTA											2166

5 TGACAGCTAT TTTTATGACT ATCCTGTTCT GTGGGGGGGG GGTCTATGTT TTCCCCCAT 2226
 ATTTGTATTC CTTTTCATAA CTTTCTTGA TATCTTTCCT CCTCTTTTTT TAATGTAAAG 2286
 GTTTTCTCAA AAATTCCTT AAAGGTGAGG GTCTCTTCT TTTCTCTTTT CCTTTTTTTT 2346
 TTCTTTTTTT GGCAACCTGG CTCTGGCCCA GGCTAGAGTG CAGTGGTGGC ATTATAGCCC 2406
 GGTGCAGCCT CTAACCTCTG GGCTCAAGCA ATCCAAGTGA TCCTCCCACC TCAACCTTCG 2466
 GAGTAGCTGG GATCACAGCT GCAGGCCACG CCCAGCTTCC TCCCCCGAC TCCCCCCCC 2526
 CAGAGACACG GTCCACCAT GTTACCCAGC CTGGTCTCAA ACTCCCCAGC TAAAGCAGTC 2586
 CTCCAGCCTC GGCCTCCCAA AGTACTGGGA TTACAGGCGT GAGCCCCCAC GCTGGCCTGC 2646
 TTTACGTATT TTCTTTTGTG CCCCTGCTCA CAGTGTTTTA GAGATGGCTT TCCCAGTGTG 2706
 TGTTCATTGT AAACACTTTT GGGAAAGGGC TAAACATGTG AGGCCTGGAG ATAGTTGCTA 2766
 10 AGTTGCTAGG AACATGTGGT GGGACTTTCA TATTCTGAAA AATGTTCTAT ATTCTCATTT 2826
 TTCTAAAAGA AAGAAAAAAG GAAACCCGAT TTATTTCTCC TGAATCTTTT TAAGTTTGTG 2886
 TCGTTCCTTA AGCAGAACTA AGCTCAGTAT GTGACCTTAC CCGCTAGGTG GTTAATTTAT 2946
 CCATGCTGGC AGAGGCACTC AGGTACTTGG TAAGCAAATT TCTAAACTC CAAGTTGCTG 3006
 CAGCTTGGCA TTCTTCTTAT TCTAGAGGTC TCTCTGAAA AGATGGAGAA AATGAACAGG 3066
 ACATGGGGCT CCTGGAAAGA AAGGGCCCGG GAAGTTCAAG GAAGAATAAA GTTGAAATTT 3126
 15 TAAAAAATAA 3136

<210> 2

<211> 616

<212> PRT

20 <213> Ser humano

<400> 2:

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Cys Ala Leu Leu Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro
 20 25 30
 25 Pro Cys Thr Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn
 35 40 45
 Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp
 65 70 75 80
 30 Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys
 85 90 95
 Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys
 100 105 110
 Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg

					115					120						125	
	Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	Ala	Pro	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Leu	Gln	
		130					135					140					
	Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Leu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Ser	
		145				150					155					160	
	Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Lys	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Thr	
					165					170					175		
5	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Val	Glu	His	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala	
				180					185					190			
	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	
			195					200					205				
	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	
		210					215					220					
10	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	
		225				230					235					240	
	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	
					245					250					255		
	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	
				260					265					270			
	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	
				275				280					285				
15	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	
		290					295					300					
	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	
		305				310					315					320	
	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	
					325					330					335		
20	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	
				340					345					350			
	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	
			355					360					365				
	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	
		370					375					380					
25	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	
		385				390					395					400	
	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	
					405					410					415		
	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	
				420					425					430			
	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	
			435					440					445				
30	Cys	Arg	Asn	Pro	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys	Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Ser	Pro	
		450				455						460					
	Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	Pro	Gln	Cys	Ala	Tyr	Gly	Met	Gly	Leu	Pro	Pro	
		465				470					475					480	

Glu Glu Glu Ala Ser Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly
 485 490 495
 Ala Asp Gly Arg Leu Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly
 500 505 510
 Ser Ser Pro Gly Gly Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn
 515 520 525
 Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly
 530 535 540
 Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala
 545 550 555 560
 Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala
 565 570 575
 Arg Arg Asp Ser Phe Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys
 580 585 590
 Gly Gly Pro Glu Gly Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val
 595 600 605
 Gln Glu Gln Gly Gly Ala Lys Ala
 610 615

<210> 3

<211> 232

<212> PRT

<213> Ser humano

<400> 3

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

	Lys	Thr	Thr	Pro 180	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 185	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 190	Leu	Tyr	
	Ser	Lys	Leu 195	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 200	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 205	Asn	Val	Phe	
	Ser	Cys 210	Ser	Val	Met	His	Glu 215	Ala	Leu	His	Asn	His 220	Tyr	Thr	Gln	Lys	
5	Ser 225	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 230	Gly	Lys									
<210>	4																
<211>	1878																
<212>	ADN																
10 <213>	Murino																
<220>																	
<221>	CDS																
<222>	1.1875																
<400>	4																
15	ATG	GCC	CCG	CGC	GCC	CGG	CGG	CGC	CGC	CAG	CTG	CCC	GCG	CCG	CTG	CTG	48
	Met	Ala	Pro	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Gln	Leu	Pro	Ala	Pro	Leu	Leu	
	1				5					10					15		
	GCG	CTC	TGC	GTG	CTG	CTC	GTT	CCA	CTG	CAG	GTG	ACT	CTC	CAG	GTC	ACT	96
	Ala	Leu	Cys	Val	Leu	Leu	Val	Pro	Leu	Gln	Val	Thr	Leu	Gln	Val	Thr	
				20					25					30			
	CCT	CCA	TGC	ACC	CAG	GAG	AGG	CAT	TAT	GAG	CAT	CTC	GGA	CGG	TGT	TGC	144
	Pro	Pro	Cys	Thr	Gln	Glu	Arg	His	Tyr	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Cys	Cys	
			35					40					45				
20	AGC	AGA	TGC	GAA	CCA	GGA	AAG	TAC	CTG	TCC	TCT	AAG	TGC	ACT	CCT	ACC	192
	Ser	Arg	Cys	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Cys	Thr	Pro	Thr	
		50					55					60					
	TCC	GAC	AGT	GTG	TGT	CTG	CCC	TGT	GGC	CCC	GAT	GAG	TAC	TTG	GAC	ACC	240
	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Pro	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Thr	
	65					70					75					80	
	TGG	AAT	GAA	GAA	GAT	AAA	TGC	TTG	CTG	CAT	AAA	GTC	TGT	GAT	GCA	GGC	288
	Trp	Asn	Glu	Glu	Asp	Lys	Cys	Leu	Leu	His	Lys	Val	Cys	Asp	Ala	Gly	
					85					90					95		
	AAG	GCC	CTG	GTG	GCG	GTG	GAT	CCT	GGC	AAC	CAC	ACG	GCC	CCG	CGT	CGC	336
	Lys	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Asp	Pro	Gly	Asn	His	Thr	Ala	Pro	Arg	Arg	
				100					105					110			
	TGT	GCT	TGC	ACG	GCT	GGC	TAC	CAC	TGG	AAC	TCA	GAC	TGC	GAG	TGC	TGC	384
	Cys	Ala	Cys	Thr	Ala	Gly	Tyr	His	Trp	Asn	Ser	Asp	Cys	Glu	Cys	Cys	
			115					120					125				
30	CGC	AGG	AAC	ACG	GAG	TGT	GCA	CCT	GGC	TTC	GGA	GCT	CAG	CAT	CCC	TTG	432
	Arg	Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	Ala	Pro	Gly	Phe	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Leu	
		130					135					140					
	CAG	CTC	AAC														

5	TCA	GAT	GTC	TTT	TCG	TCC	ACA	GAC	AAA	TGC	AAA	CCT	TGG	ACC	AAC	TGC	528
	Ser	Asp	Val	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Lys	Cys	Lys	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	
					165					170					175		
	ACC	CTC	CTT	GGA	AAG	CTA	GAA	GCA	CAC	CAG	GGG	ACA	ACG	GAA	TCA	GAT	576
	Thr	Leu	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	His	Gln	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Asp	
10				180					185					190			
	GTG	GTC	TGC	AGC	TCT	TCC	ATG	ACA	CTG	AGG	AGA	CCA	CCC	AAG	GAG	GCC	624
	Val	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Met	Thr	Leu	Arg	Arg	Pro	Pro	Lys	Glu	Ala	
			195					200					205				
	CAG	GCT	TAC	CTG	CCC	AGT	CTC	ATC	GTT	CTG	CTC	CTC	TTC	ATC	TCT	GTG	672
15	Gln	Ala	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Val	
		210					215					220					
	GTA	GTA	GTG	GCT	GCC	ATC	ATC	TTC	GGC	GTT	TAC	TAC	AGG	AAG	GGA	GGG	720
	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Gly	Gly	
						230					235					240	
20	AAA	GCG	CTG	ACA	GCT	AAT	TTG	TGG	AAT	TGG	GTC	AAT	GAT	GCT	TGC	AGT	768
	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	Asn	Trp	Val	Asn	Asp	Ala	Cys	Ser	
					245					250				255			
	AGT	CTA	AGT	GGA	AAT	AAG	GAG	TCC	TCA	GGG	GAC	CGT	TGT	GCT	GGT	TCC	816
	Ser	Leu	Ser	Gly	Asn	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Arg	Cys	Ala	Gly	Ser	
25				260				265					270				
	CAC	TCG	GCA	ACC	TCC	AGT	CAG	CAA	GAA	GTG	TGT	GAA	GGT	ATC	TTA	CTA	864
	His	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Gln	Gln	Glu	Val	Cys	Glu	Gly	Ile	Leu	Leu	
			275				280					285					
	ATG	ACT	CGG	GAG	GAG	AAG	ATG	GTT	CCA	GAA	GAC	GGT	GCT	GGA	GTC	TGT	912
30	Met	Thr	Arg	Glu	Glu	Lys	Met	Val	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Gly	Val	Cys	
			290				295					300					
	GGG	CCT	GTG	TGT	GCG	GCA	GGT	GGG	CCC	TGG	GCA	GAA	GTC	AGA	GAT	TCT	960
	Gly	Pro	Val	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Trp	Ala	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	
					310						315					320	
35	AGG	ACG	TTC	ACA	CTG	GTC	AGC	GAG	GTT	GAG	ACG	CAA	GGA	GAC	CTC	TCG	1008
	Arg	Thr	Phe	Thr	Leu	Val	Ser	Glu	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Asp	Leu	Ser	
					325					330					335		
	AGG	AAG	ATT	CCC	ACA	GAG	GAT	GAG	TAC	ACG	GAC	CGG	CCC	TCG	CAG	CCT	1056
	Arg	Lys	Ile	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	
40				340				345					350				
	TCG	ACT	GGT	TCA	CTG	CTC	CTA	ATC	CAG	CAG	GGA	AGC	AAA	TCT	ATA	CCC	1104
	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Gln	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Pro	
			355					360					365				
	CCA	TTC	CAG	GAG	CCC	CTG	GAA	GTG	GGG	GAG	AAC	GAC	AGT	TTA	AGC	CAG	1152
45	Pro	Phe	Gln	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	
							375					380					
	TGT	TTC	ACC	GGG	ACT	GAA	AGC	ACG	GTG	GAT	TCT	GAG	GGC	TGT	GAC	TTC	1200
	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Glu	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Asp	Phe	
					390					395						400	
50	ACT	GAG	CCT	CCG	AGC	AGA	ACT	GAC	TCT	ATG	CCC	GTG	TCC	CCT	GAA	AAG	1248
	Thr	Glu	Pro	Pro	Ser	Arg	Thr	Asp	Ser	Met	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Lys	
					405					410					415		
	CAC	CTG	ACA	AAA	GAA	ATA	GAA	GGT	GAC	AGT	TGC	CTC	CCC	TGG	GTG	GTC	1296
	His	Leu	Thr	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Val	Val	

				420					425					430						
				AGC	TCC	AAC	TCA	ACA	GAT	GGC	TAC	ACA	GGC	AGT	GGG	AAC	ACT	CCT	GGG	1344
				Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Asp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Pro	Gly	
						435					440					445				
5				GAG	GAC	CAT	GAA	CCC	TTT	CCA	GGG	TCC	CTG	AAA	TGT	GGA	CCA	TTG	CCC	1392
				Glu	Asp	His	Glu	Pro	Phe	Pro	Gly	Ser	Leu	Lys	Cys	Gly	Pro	Leu	Pro	
						450				455					460					
				CAG	TGT	GCC	TAC	AGC	ATG	GGC	TTT	CCC	AGT	GAA	GCA	GCA	GCC	AGC	ATG	1440
				Gln	Cys	Ala	Tyr	Ser	Met	Gly	Phe	Pro	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	
									470					475					480	
				GCA	GAG	GCG	GGA	GTA	CGG	CCC	CAG	GAC	AGG	GCT	GAT	GAG	AGG	GGA	GCC	1488
				Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Ala	Asp	Glu	Arg	Gly	Ala	
								485					490					495		
10				TCA	GGG	TCC	GGG	AGC	TCC	CCC	AGT	GAC	CAG	CCA	CCT	GCC	TCT	GGG	AAC	1536
				Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Asp	Gln	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Asn	
							500					505					510			
				GTG	ACT	GGA	AAC	AGT	AAC	TCC	ACG	TTC	ATC	TCT	AGC	GGG	CAG	GTG	ATG	1584
				Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Met	
						515					520					525				
15				AAC	TTC	AAG	GGT	GAC	ATC	ATC	GTG	GTG	TAT	GTC	AGC	CAG	ACC	TCG	CAG	1632
				Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	
						530				535					540					
				GAG	GGC	CCG	GGT	TCC	GCA	GAG	CCC	GAG	TCG	GAG	CCC	GTG	GGC	CGC	CCT	1680
				Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Arg	Pro	
									550					555					560	
				GTG	CAG	GAG	GAG	ACG	CTG	GCA	CAC	AGA	GAC	TCC	TTT	GCG	GGC	ACC	GCG	1728
				Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	His	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Thr	Ala	
								565					570					575		
20				CCG	CGC	TTC	CCC	GAC	GTC	TGT	GCC	ACC	GGG	GCT	GGG	CTG	CAG	GAG	CAG	1776
				Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Val	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	Glu	Gln	
							580					585					590			
				GGG	GCA	CCC	CGG	CAG	AAG	GAC	GGG	ACA	TCG	CGG	CCG	GTG	CAG	GAG	CAG	1824
				Gly	Ala	Pro	Arg	Gln	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Gln	
						595				600					605					
25				GGT	GGG	GCG	CAG	ACT	TCA	CTC	CAT	ACC	CAG	GGG	TCC	GGA	CAA	TGT	GCA	1872
				Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Ser	Leu	His	Thr	Gln	Gly	Ser	Gly	Gln	Cys	Ala	
						610				615					620					
				GAA	TGA															1878
				Glu																
						625														

<210> 5

<211> 625

30 <212> PRT

<213> Murino

<400> 5

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu
1 5 10 15
Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr

ES 2 368 101 T3

	20					25					30					
	Pro	Pro	Cys	Thr	Gln	Glu	Arg	His	Tyr	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Cys	Cys
			35					40					45			
	Ser	Arg	Cys	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Cys	Thr	Pro	Thr
		50					55					60				
5	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Pro	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Thr
		65					70				75				80	
	Trp	Asn	Glu	Glu	Asp	Lys	Cys	Leu	Leu	His	Lys	Val	Cys	Asp	Ala	Gly
					85						90				95	
	Lys	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Asp	Pro	Gly	Asn	His	Thr	Ala	Pro	Arg	Arg
				100					105					110		
10	Cys	Ala	Cys	Thr	Ala	Gly	Tyr	His	Trp	Asn	Ser	Asp	Cys	Glu	Cys	Cys
			115					120					125			
	Arg	Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	Ala	Pro	Gly	Phe	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Leu
		130					135					140				
	Gln	Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Cys	Thr	Pro	Cys	Leu	Leu	Gly	Phe	Phe
		145					150				155					160
	Ser	Asp	Val	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Lys	Cys	Lys	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys
				165							170				175	
15	Thr	Leu	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	His	Gln	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Asp
				180					185					190		
	Val	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Met	Thr	Leu	Arg	Arg	Pro	Pro	Lys	Glu	Ala
			195					200					205			
	Gln	Ala	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Val
		210					215					220				
20	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Gly	Gly
						230					235					240
	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	Asn	Trp	Val	Asn	Asp	Ala	Cys	Ser
					245					250					255	
	Ser	Leu	Ser	Gly	Asn	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Arg	Cys	Ala	Gly	Ser
				260					265					270		
25	His	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Gln	Gln	Glu	Val	Cys	Glu	Gly	Ile	Leu	Leu
			275					280					285			
	Met	Thr	Arg	Glu	Glu	Lys	Met	Val	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Gly	Val	Cys
							295					300				
	Gly	Pro	Val	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Trp	Ala	Glu	Val	Arg	Asp	Ser
						310					315					320
	Arg	Thr	Phe	Thr	Leu	Val	Ser	Glu	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Asp	Leu	Ser
					325						330				335	
30	Arg	Lys	Ile	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro
				340					345					350		
	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Gln	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Pro
			355					360					365			
	Pro	Phe	Gln	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln
							375					380				

Cys Phe Thr Gly Thr Glu Ser Thr Val Asp Ser Glu Gly Cys Asp Phe
 385 390 395 400
 Thr Glu Pro Pro Ser Arg Thr Asp Ser Met Pro Val Ser Pro Glu Lys
 405 410 415
 His Leu Thr Lys Glu Ile Glu Gly Asp Ser Cys Leu Pro Trp Val Val
 420 425 430
 Ser Ser Asn Ser Thr Asp Gly Tyr Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Gly
 435 440 445
 Glu Asp His Glu Pro Phe Pro Gly Ser Leu Lys Cys Gly Pro Leu Pro
 450 455 460
 Gln Cys Ala Tyr Ser Met Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ala Ala Ser Met
 465 470 475 480
 Ala Glu Ala Gly Val Arg Pro Gln Asp Arg Ala Asp Glu Arg Gly Ala
 485 490 495
 Ser Gly Ser Gly Ser Ser Pro Ser Asp Gln Pro Pro Ala Ser Gly Asn
 500 505 510
 Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met
 515 520 525
 Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln
 530 535 540
 Glu Gly Pro Gly Ser Ala Glu Pro Glu Ser Glu Pro Val Gly Arg Pro
 545 550 555 560
 Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala His Arg Asp Ser Phe Ala Gly Thr Ala
 565 570 575
 Pro Arg Phe Pro Asp Val Cys Ala Thr Gly Ala Gly Leu Gln Glu Gln
 580 585 590
 Gly Ala Pro Arg Gln Lys Asp Gly Thr Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln
 595 600 605
 Gly Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Thr Gln Gly Ser Gly Gln Cys Ala
 610 615 620
 Glu
 625

25 <210> 6
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 6

30 Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
 1 5 10 15
 Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
 20 25 30
 Arg

REIVINDICACIONES

- 1.** Un anticuerpo que se une a un polipéptido RANKL y antagoniza la interacción de RANK y RANKL para uso en la mejora de los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica en un paciente con mieloma múltiple.
- 2.** El anticuerpo para el uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 5** **3.** El anticuerpo para el uso tal como se reivindica en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el que la mejora en los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica disminuye la resorción ósea en exceso.
- 4.** Uso de un anticuerpo que se une a un polipéptido RANKL y antagoniza la interacción de RANK y RANKL en la fabricación de un medicamento para mejorar los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica en un paciente con mieloma múltiple.
- 10** **5.** Uso, tal como se reivindica en la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 6.** Uso, tal como se reivindica en la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la mejora en los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica disminuye la resorción ósea en exceso.