

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 456**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05815463 .4**  
96 Fecha de presentación: **13.12.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1824882**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54 Título: **Proteínas variantes de osteoprotegerina**

30 Prioridad:  
**13.12.2004 US 635722 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.04.2012**

73 Titular/es:  
**Cephalon Australia (VIC) Pty Ltd**  
**Level 2 37 Epping Road**  
**Macquarie Park NSW 2113, AU**

72 Inventor/es:  
**ROBERTS, Anthony;**  
**KOPSIDAS, George;**  
**COIA, Gregory;**  
**SLEIGH, Marilyn y**  
**BATORI, Vincent**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 378 456 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

Proteínas variantes de osteoprotegerina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere proteínas evolucionadas que son útiles en la regulación de efectos biológicos mediados a través de la interacción de RANK y RANKL. Más particularmente, la invención se refiere a proteínas variantes de osteoprotegerina (OVP) novedosas que tienen especificidades de unión alteradas en comparación con la osteoprotegerina de tipo natural. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican para estas OVP. También se engloban vectores recombinantes y células huésped que expresan estas OVP, así como métodos de producción de OVP recombinantes. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden estas OVP, y a métodos de tratamiento de enfermedades asociadas con el efecto biológico mediado a través de la interacción de RANK y RANKL.

Antecedentes de la invención

15 El eje bioquímico de ligando de Rank (RANKL)/OPG/RANK se ha dirigido satisfactoriamente para tratar la osteoporosis, la artritis reumatoide, la destrucción ósea inducida por cáncer, la metástasis, la hipercalcemia y el dolor (Hofbauer *et al.*, Cancer 92 (3): págs. 460-470 (2001). También están en desarrollo terapias que utilizan OPG (Honore *et al.*, Nature Medicine 6(5):521-528 (2000)), un anticuerpo dirigido frente a RANKL, o la proteína soluble RANK-Fc (Oyajobi *et al.*, Cancer Res 61(6): págs. 2572-8 (2001)). Constructos proteicos de RANK-Fc soluble y OPG se unen a RANKL, disminuyendo de ese modo la cantidad de RANKL que está disponible para la activación del receptor RANK.

20 Además de ser importante en la biología ósea, RANKL desempeña un papel en el sistema inmunitario regulando las respuestas de células T específicas de antígeno (Anderson *et al.*, Nature 390(6656):175-9 (1997)). RANKL se expresa altamente en células T activadas, mientras que el receptor RANK se expresa en altos niveles en células dendríticas (DC) maduras. La interacción entre RANKL y RANK actúa como una señal coestimuladora, que potencia la supervivencia de DC y la proliferación de las células T induciendo la diferenciación de DC, la producción de citocinas y la reducción de la apoptosis en ambos tipos de células. Puede lograrse inmunoterapia para producir tolerancia a tejidos y/u órganos trasplantados mediante el bloqueo de la señal coestimuladora usando antagonistas de RANK. El bloqueo de la coestimulación evita la activación de las células T por las DC y hace que las células T alorreactivas se conviertan en anérgicas y/o experimenten apoptosis (Adler *et al.*, Current Opinion in Immunology 14:660-665 (2002)). Mediante un mecanismo de acción similar, antagonizar la señalización de RANK podría ser un tratamiento para trastornos inflamatorios autoinmunitarios y mediados por el sistema inmunitario tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante.

La osteoprotegerina (OPG) es una proteína de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y se describió por primera vez por Simonet *et al.* (Cell, 89, 309-319 (1997)).

35 La OPG parece ser un elemento crucial en la regulación de los procesos naturales de la producción y el recambio óseos. Se han observado cambios en el equilibrio entre OPG y su receptor diana RANKL en varios estados asociados con metabolismo óseo anómalo.

40 La OPG se ha sometido a pruebas preclínicas y clínicas con posibilidades de aplicación en diversos estados asociados con un aumento del recambio óseo y la pérdida ósea, incluyendo osteoporosis, artritis reumatoide, enfermedad de Paget, enfermedad periodontal, enfermedad vascular y cánceres que se ubican en o han metastatizado el hueso (Para revisión, véase Lorenz *et al.*, J. Amer Med Assoc 292: 490-5(2004) y referencias en el mismo). Se notifican en la bibliografía pruebas exhaustivas en animales de OPG, que indican un rendimiento igual o superior en comparación con otras terapias usadas actualmente para reducir la pérdida ósea (Simonet *et al.*, Cell, 89, 309-319 (1997); Bolon *et al.*, Cell Mol Life Sci 59, 1569-76 (2002)). También se ha demostrado que OPG reduce el dolor asociado a cánceres de huesos (Luger *et al.*, Cancer Research 61, 4038-4047 (2001)).

La OPG se describe en detalle en los documentos US 6.015.938, US 6.284.740, US 6.284.728, US 6.613.544, US 6.316.408, US 6.288.032 y US 6.369.027. En el documento US 6.087.555 se describen ratones transgénicos que carecen de expresión de OPG.

50 La OPG se ha sometido a ensayos de fase I tanto en pacientes con mieloma múltiple como en pacientes con osteoporosis para determinar la reducción del recambio óseo. En estudios preliminares de fase I/II en mujeres posmenopáusicas que padecen osteoporosis, se encontró que una única inyección de OPG suprime los marcadores del recambio óseo en un 30-80% durante varios días (Bekker *et al.*, J. Bone Miner Res 16, 348-360 (2001)). Se trataron pacientes con mieloma múltiple con una variedad de dosis de OPG, y se demostró una disminución de

hasta el 50% en la resorción ósea durante 30 o más días (Body *et al.*, Cancer 97, 887-892 (2003)). Por tanto, hay una evidencia muy fuerte, tanto a partir de estudios preclínicos como de estudios clínicos, de que es probable que OPG sea un tratamiento altamente eficaz en una variedad de estados caracterizados por metabolismo óseo anómalo.

5 La familia de citocinas del factor de necrosis tumoral (TNF) y sus receptores correspondientes contiene un número de miembros considerable y existe una reactividad cruzada sustancial entre los miembros en las interacciones ligando-receptor (para revisión, véase Igney, F.H. y Krammer, P.H Nature Reviews Cancer 2, 277-288 (2002)). Los  
10 receptores del TNF generalmente desencadenan uno de dos tipos de respuesta, o bien una respuesta apoptótica (muerte celular programada) o bien un efecto sobre rutas metabólicas celulares a través de la activación del factor de transcripción NFκB. La familia de receptores también contiene miembros que actúan como señuelos para reducir la eficacia de la interacción entre otros pares ligando-receptor de la familia. La OPG parece encontrarse en esta clase de receptores.

En comparación con muchos miembros de la familia de receptores del TNF, la OPG está relativamente limitada en su especificidad de diana. Según el conocimiento actual, la OPG se une sólo a dos ligandos de tipo TNF:

15 1. RANKL (ligando del receptor activador de NFκB), una molécula de la superficie celular de tipo TNF que normalmente interacciona con un miembro de la familia de receptores del TNF, RANK, que se expresa en  
20 precursores de osteoclastos, células dendríticas, células T y precursores hematopoyéticos (Kong *et al.*, Nature 397:315-323 (1999)). RANKL interacciona con RANK en las superficies celulares para estimular la producción y la actividad de los osteoclastos, las principales células implicadas en el recambio óseo (Hsu, H *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 96, 3540-3545 (1999)). RANKL se expresa en células estromales/osteoblastos (Kong *et al.*, Nature 397:315-323 (1999)). La interacción de OPG con RANKL inhibe la capacidad de RANKL para unirse a RANK y estimular a los osteoclastos y es esta actividad de OPG la que confiere su capacidad para reducir la pérdida ósea (Lacey *et al.*, Amer J Pathol 157, 435-448 (2000); Simonet *et al.*, Cell, 89, 309-319 (1997)). Se ha notificado que la constante de unión de OPG dimérica que se une a RANKL es de 6,7 nM (Willard *et al.*, Protein Expr. Purif 20, 48-57 (2000)) situando otros informes la constante de unión entre 2 y 10 nM.

2. TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF), una molécula de la superficie celular de tipo TNF implicada en la inducción de la apoptosis en células cancerosas. Se considera que la OPG es uno de un número  
30 pequeño de receptores señuelo para TRAIL, que actúa para modular su capacidad para dirigirse a células cancerosas (Revisado en Igney y Krammer (2002) tal como se mencionó anteriormente). Por tanto, se esperaría que la OPG potenciara la supervivencia de las células cancerosas si está presente en un sitio relevante en cantidades suficientes, y se ha documentado su capacidad para aumentar la supervivencia de células tumorales (por ejemplo, Neville-Webbe *et al.*, Breast Cancer Res Treat. 86, 271-82 (2004); Holen I *et al.*, Cancer Res 62, 1619-1623 (2002)). Se ha notificado que la afinidad de OPG por TRAIL es de 3 nM (Emery *et al.*, J. Biol Chem. 273, 14363-7 (1998)) aunque esto puede variar con la temperatura (Truneh *et al.*, J. Biol Chem. 275, 23319-25 (2000)).

35 La capacidad de la OPG para inhibir la actividad de TRAIL, dando como resultado un posible aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer, se ha notificado en la bibliografía médica como un probable elemento disuasorio para el uso de este agente como agente terapéutico. Entre las áreas de aplicación para los agentes que inhiben la pérdida ósea están estados tales como la osteoporosis y la enfermedad de Paget, que no son por sí mismas potencialmente  
40 mortales, pero que requieren terapia a largo plazo. Además, uno de los posibles usos más importantes de la OPG es en el tratamiento complementario de pacientes con cáncer con metástasis óseas. En todas estas posibles áreas de aplicación, cualquier indicación de aumento del crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas asociado con el tratamiento sería un elemento disuasorio para su uso. Por tanto, existe la necesidad de generar una variante de OPG novedosa que carezca sustancialmente de capacidades de unión a TRAIL. Una variante de este tipo carecería de capacidad para interferir de manera significativa con los mecanismos contra el cáncer naturales,  
45 mientras que conservaría su capacidad para interferir con la interacción RANK/RANKL que estimula la formación y actividad de osteoclastos, y la pérdida ósea consiguiente.

Un mutante de OPG con baja afinidad de unión por TRAIL se describe en Yonou Hiroyuki *et al.*, Cancer Research 63 (9): págs. 2096-2102 (2003), aunque no se dan a conocer las modificaciones en la OPG. El documento WO02/064782 da a conocer un mutante de OPG que comprende una modificación en los residuos 28-163 de OPG.

50 Sumario de la invención

Los presentes inventores han generado ahora proteínas variantes de OPG (OVP) novedosas que demuestran afinidad de unión reducida por TRAIL y capacidad reducida para inhibir los efectos biológicos normales que resultan de la interacción de TRAIL con su receptor.

55 El análisis de las OVP de la presente invención ha revelado una concentración de mutaciones puntuales en regiones específicas de la secuencia proteica de OPG de tipo natural. En particular, las mutaciones se agrupan en la región

englobada por los residuos de OPG 102-130. Estudios de modelización realizados en las OVP de la presente invención apoyan la idea de que esta región de OPG/OVP forma una superficie de contacto con ambas proteínas TRAIL y RANKL durante la unión. Por tanto, es sorprendente la identificación de mutaciones dentro de esta región que pueden alterar sustancialmente la afinidad de unión por TRAIL sin afectar a la unión a RANKL.

5 Es importante que las OVP de la presente invención conserven la capacidad para unirse a RANKL, y reducir o inhibir la interacción RANK-RANKL y los efectos biológicos consiguientes de esta interacción. Se prevé que las OVP preferidas de la presente invención conserven la capacidad de la OPG de tipo natural para modular el metabolismo óseo, sin tener el efecto no deseado de potenciar la supervivencia de las células cancerosas a través de la inhibición de la acción de TRAIL.

10 Por consiguiente, la presente invención proporciona una variante de OPG de tipo natural en la que la secuencia de la variante comprende al menos una sustitución de aminoácido dentro de la región englobada por los aminoácidos 102-130 en comparación con la secuencia de OPG de tipo natural tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, conservando la variante afinidad de unión por RANKL pero mostrando afinidad de unión reducida por TRAIL en comparación con la OPG de tipo natural.

15 Por ejemplo, la proteína variante de OPG puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en la posición 102, 111, 115, 122, 128 ó 130.

La presente invención también proporciona una proteína OVP que se ha modificado para inducir dimerización, o para mantener o mejorar su estabilidad, expresión o semivida biológica. Tales modificaciones pueden incluir adición de un resto de albúmina, una región Fc o sustitución con polietilenglicol, o adición de extensiones que sirven para mantener la OVP en una forma dimérica.

20 La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica para una proteína variante de OPG de la presente invención. Preferiblemente, el polinucleótido es una variante de SEQ ID NO: 1, en la que la variante comprende cambios de ácido nucleico de manera que codifique para la proteína variante de OPG deseada de la invención. Los métodos de producción de tales cambios de ácido nucleico se conocen en la técnica y también se describen en el presente documento.

También se proporcionan variaciones en esta secuencia en las que la proteína codificada mantiene el mismo espectro de actividades biológicas. La secuencia de nucleótido puede alterarse para mejorar la expresión de la proteína codificada en uno o más sistemas de expresión, para mejorar la estabilidad del ARN, o eventualmente, para contener cambios que no disminuyen la función biológica del ácido nucleico o su proteína codificada.

30 La presente invención también proporciona un vector que comprende un polinucleótido según la invención. Preferiblemente, el vector es adecuado para la replicación y/o expresión de un polinucleótido. Los vectores pueden ser, por ejemplo, un vector de plásmido, virus o fago dotado de un origen de replicación, y preferiblemente un promotor para la expresión del polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. El vector puede contener uno o más marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a neomicina para un vector de expresión en mamíferos. El vector puede usarse *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o puede usarse para transfectar o transformar una célula huésped.

35 La presente invención también proporciona una célula huésped que comprende un vector según la invención, o que contiene el gen que codifica para una de las proteínas de la invención en condiciones que permiten la expresión y producción de la proteína objeto.

40 La presente invención también proporciona un método para reducir la afinidad de unión de OPG por TRAIL, comprendiendo el método modificar al menos un aminoácido seleccionado de los residuos 102, 111, 115, 122, 128, 130 de OPG de tipo natural para producir una variante de OPG de tipo natural o fragmento de la misma para producir una proteína variante de OPG, y someter a prueba la proteína variante de OPG para determinar la afinidad de unión por TRAIL.

45 Se apreciará que una OVP de la presente invención puede usarse para reducir o inhibir la unión de RANK a RANKL *in vivo*, y reducir o inhibir la interacción entre RANK y RANKL y los efectos biológicos mediados a través de esta interacción.

50 Por consiguiente, la presente invención también proporciona una composición para inhibir o reducir la unión de RANK a RANKL, comprendiendo la composición una proteína variante de OPG según la invención, y uno o más vehículos aceptables.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína variante de OPG según la invención y uno o más de un vehículo,

solubilizante, estabilizador y antioxidante farmacéuticamente aceptables.

Por "sujeto" en el presente documento quiere decirse tanto seres humanos como otros animales, en particular mamíferos tal como se explica resumidamente en el presente documento, prefiriéndose los seres humanos.

5 La presente invención también proporciona el uso de una variante de OPG de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir o reducir un efecto biológico mediado a través de la interacción de RANK y RANKL en una célula.

La presente invención también proporciona una variante de OPG de la invención para su uso en terapia.

10 La presente invención también proporciona el uso de una variante de OPG de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario.

La presente invención también proporciona el uso de una variante de OPG de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad cardiovascular.

15 A través de toda esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

20 Las diversas características y realizaciones de la presente invención, a las que se hace referencia en secciones individuales en el presente documento, también se aplican según sea apropiado a otras secciones. En consecuencia, las características especificadas en relación con una realización de la invención pueden combinarse con las características especificadas en relación con otras realizaciones, según sea apropiado.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: A. Estructura del gen de OPG. CRD: dominio rico en cisteína; DD: dominio de muerte; HBD: dominio de unión a heparina. B. Casete de mutagénesis y presentación pEGX254.

25 Figura 2: ELISA que compara la unión de OPG y OVP purificadas a RANKL y TRAIL. Las curvas de unión se marcan según el número de variantes sometidas a prueba. WT se refiere a la OPG no mutada. Los marcadores de la curva que terminan en R se refieren a la unión a RANKL; los marcadores de la curva que terminan en T se refieren a la unión a TRAIL. Estos estudios se llevaron a cabo usando OPG 22-194 monomérica expresada en *E. coli*.

Figura 3: ELISA que compara la unión de OPG y OVP purificadas a RANKL y TRAIL. Las condiciones y los marcadores de la curva son iguales que para la figura 3.

30 Figura 4: ELISA de OVP expresada en mamíferos purificada que se une a RANKL (A) y TRAIL (B). Estos estudios se llevaron a cabo usando OVP 22-194 u OPG unida a Fc dimérica.

Figura 5: (A) Inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL en células HCT116 por proteínas OPG de tipo natural. (B) Inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL en células HCT116 por OVP.

35 Figura 6: (A) Inhibición por OPG de tipo natural de la activación osteoclástica mediada por RANKL de células RAW264.7. (B) Inhibición por OPG de la activación osteoclástica mediada por RANKL de células RAW264.7.

Figura 7: Inhibición por OPG de la resorción mediada por osteoclastos inducida por RANKL. Todas las OVP se usaron a 1 nM. UT: no tratado con OVP.

Figura 8: Alineaciones de secuencias de aminoácidos de OVP preferida y OPG de tipo natural humanas.

40 Figura 9: Modelo estructural de OPG unida a RANKL de ratón (archivo de pdb 1JTZ). El trímero de RANKL se visualiza como el diagrama de cintas de color gris claro superior, OPG como un diagrama de cintas de color gris oscuro. Los residuos de OPG con al menos un átomo dentro de 5 Angstrom de RANKL se destacan como esferas con espacio relleno. Las esferas claras representan el posible contacto de los residuos de OPG con RANKL en el dominio N-terminal del receptor (residuos 42 a 91 de OPG, puntuándose los residuos de contacto específicos como 42, 43, 49, 50, 52, 53, 69, 71-82, 85-91), las esferas oscuras muestran el dominio C-terminal del receptor (residuos de OPG 105 a 130, puntuándose los residuos de contacto específicos como 105, 106, 107, 108, 110-130).

45

Figura 10: Vista parcial de OPG modelada en contacto con TRAIL que se concentra en el segundo dominio del receptor de TNF. En la mitad superior, TRAIL se muestra como un diagrama de cintas. OPG se representa como trazas de carbono alfa en gris claro. En negro, una variante de OPG está alineada con OPG, representando la mutación de Ile 115 a Glu. Las cadenas laterales para los residuos 115 y 122 se muestran como una representación de líneas. La modelización de la OVP sugiere que la mutación del residuo 115 da como resultado una conformación alterada del bucle 107-118, con contactos realineados en la superficie de contacto. El cambio conformacional puede alterar contactos adicionales, tal como se destaca mediante el cambio de la cadena lateral del residuo 122, que suprime posiblemente los contactos en la región de los residuos 120-130. Estos contactos parecen más cruciales para la unión de TRAIL que para la de RANKL. Esto concordaría con la supresión casi completa de la unión de TRAIL observada para este mutante en los ensayos.

Figura 11: Modelo que predice la asociación entre OPG (parte inferior) y TRAIL (parte superior como diagrama de cintas). Los residuos 102-130 se muestran en forma de espacio relleno. Según este modelo, el bucle que contiene el residuo 115 de OPG (flecha larga), y los residuos C-terminales para ésta (a la derecha del bucle de 115) realizan múltiples contactos con TRAIL (flecha corta). El bucle 195-202 que sobresale de TRAIL (flecha corta) parece permitir contactos adicionales o más amplios con OPG de lo que es posible para RANKL en particular con los residuos de OPG 120-130 (compárese con la figura 12). Esto confirma la región como una zona en la que es probable que las mutaciones alteren la unión de TRAIL con la posibilidad de una unión no alterada de RANKL.

Figura 12: Modelo que predice la asociación entre OPG (parte inferior) y RANKL (parte superior como diagrama de cintas), usando la estructura de RANKL de ratón, alineada al complejo OPG-TRAIL modelado. Los residuos 102-130 de OPG se muestran en forma de espacio relleno. El bucle que contiene el residuo 115 (flecha larga) señala hacia y entra en contacto con RANKL, pero los residuos C-terminales para esta zona (a la derecha de este bucle) parecen tener pocos contactos con RANKL (flecha corta: residuos 225-233 de RANKL, que corresponde al bucle 195-202 que sobresale en TRAIL de la figura 11). Esto distingue el contacto de OPG con RANKL del de TRAIL mostrado en el diagrama anterior.

Clave para la lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 – Gen de osteoprotegerina de tipo natural humana;

SEQ ID NO: 2 - Osteoprotegerina de tipo natural humana;

SEQ ID NO: 3 - Osteoprotegerina de tipo natural de rata;

SEQ ID NO: 4 - Osteoprotegerina de tipo natural de ratón; y

SEQ ID NOs: 5 a 47 - Proteínas variantes de osteoprotegerina (OVP) humanas; y

SEQ ID NOs: 48 y 49 – Cebadores usados para aislar el gen de OPG.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

#### Técnicas generales

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación, química y bioquímica).

A menos que se indique de otra manera, las técnicas de ADN recombinante utilizadas en la presente invención son procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y explican en la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel *et al.* (Editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).

#### Osteoprotegerina (OPG)

La OPG es un miembro de la superfamilia de receptores del TNF, que tiene una actividad asociada con el metabolismo óseo y en particular que tiene la actividad de inhibir la resorción ósea, aumentando de ese modo la densidad ósea. En particular, la interacción de OPG con RANKL inhibe la capacidad de RANKL para estimular la

formación y la actividad de los osteoclastos a través de su interacción con RANK, y es esta actividad de OPG la que confiere su capacidad para reducir la pérdida ósea.

5 Las actividades biológicas de OPG también incluyen la actividad asociada con la unión a TRAIL. TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) es una molécula de la superficie celular de tipo TNF implicada en la inducción de apoptosis en células cancerosas. Se considera que la OPG es uno de un número pequeño de receptores señuelo para TRAIL, que actúa para modular su capacidad para dirigirse a células cancerosas. Por tanto, se espera que la OPG tenga un efecto no deseado de potenciación de la supervivencia de las células cancerosas si está presente en un sitio relevante en cantidades suficientes.

10 Se han descrito diversos fragmentos activos de OPG. Yamaguchi *et al.* (J. Biol Chem. 273, 5117-5123 (1998)) demostraron que variantes truncadas y delecionadas de OPG conservaban una actividad similar a la de OPG, mientras que la OPG tanto en forma de monómero como de dímero conservaba la actividad biológica (Tomoyasu, A *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 245, 382-387 (1998)). Schneeweis *et al.*, (J. Biol. Chem. Oct 7 2005 (epub)) examinaron la unión, el estado y la afinidad de OPG por RANKL. Notificaron que se requiere la dimerización de OPG, o bien en forma de longitud completa en la que la dimerización está mediada por interacciones no covalentes dentro de las regiones del dominio de muerte, o bien en forma truncada en la que la dimerización puede estar mediada por la unión a Fc, para la unión de alta afinidad de OPG a RANKL.

Las secuencias de aminoácidos de la osteoprotegerina de tipo natural de ser humano, rata y ratón se muestran en las SEQ ID NOs 2 a 4, respectivamente.

20 Las secuencias de la OPG de tipo natural también engloban las que tienen la secuencia líder amino terminal de 21 aminoácidos eliminada y/o en las que se han eliminado aminoácidos del extremo C-terminal hasta e incluyendo el aminoácido 185.

#### Proteínas variantes de OPG

25 Por "proteína" en el presente documento quiere decirse al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. La proteína puede estar constituida por aminoácidos que se producen de manera natural y enlaces peptídicos, o por estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, "análogos" tales como peptoides (véase Simon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (20:9367-71 (1992))), dependiendo generalmente del método de síntesis. Por ejemplo, homo-fenilamina, citrulina y norleucina se consideran aminoácidos para los fines de la invención. "Aminoácido" también incluye residuos de iminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina. Pueden utilizarse tanto aminoácidos D como L.

30 Los presentes inventores han generado ahora proteínas variantes de OPG (OVP) novedosas que demuestran afinidad de unión reducida por TRAIL. Es importante que las OVP de la presente invención conserven la capacidad para unirse a RANKL. Por consiguiente, se prevé que las OVP de la presente invención conservarán la capacidad de las OPG de tipo natural para modular el metabolismo óseo, sin tener las características asociadas a TRAIL no deseadas de potenciar la supervivencia de las células cancerosas.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona una variante de OPG de tipo natural en la que la secuencia de la variante comprende al menos una sustitución de aminoácido dentro de la región englobada por los aminoácidos 102-130 en comparación con la secuencia de OPG de tipo natural tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, conservando la variante afinidad de unión por RANKL pero mostrando afinidad de unión reducida por TRAIL en comparación con la OPG de tipo natural.

40 Por "conserva la afinidad de unión por RANKL" quiere decirse que la proteína variante de OPG muestra al menos un 20% de la afinidad de unión por RANKL en comparación con la OPG de tipo natural.

La OPG de tipo natural puede derivarse de cualquier especie, preferiblemente de una especie de mamífero. En una realización preferida, la OPG de tipo natural es una proteína OPG humana prevalente. Más preferiblemente, la OPG de tipo natural es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2.

45 Las proteínas variantes de OPG de la presente invención muestran preferiblemente al menos una actividad biológica de la OPG de tipo natural.

50 En un ejemplo, la actividad biológica de la OPG de tipo natural se refiere al metabolismo óseo, y en particular a la capacidad para inhibir o reducir la estimulación y/o la actividad de los osteoclastos inducidas por RANKL. Preferiblemente, las proteínas variantes de OPG de la presente invención conservan la capacidad para evitar enfermedades relacionadas con disminuciones en la densidad ósea o con un recambio óseo anómalo.

En otro ejemplo, la actividad biológica de la OPG de tipo natural se refiere a la actividad de las células T, y en

particular a la capacidad para reducir o inhibir la activación de las células T. Preferiblemente, las proteínas variantes de OPG de la presente invención son tratamientos útiles para trastornos autoinmunitarios tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante.

- 5 En ejemplos adicionales, las proteínas variantes de OPG de la presente invención son útiles para tratar una enfermedad cardiovascular, para prevenir o reducir la calcificación de válvulas y vasos sanguíneos, o para potenciar el crecimiento de vasos sanguíneos.

Por ejemplo, la proteína variante de OPG puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en la posición 102, 111, 115, 122, 128 ó 130.

- 10 En una realización preferida, la proteína variante de OPG comprende al menos una modificación dentro de la estructura de bucle que comprende los residuos 107-118. En una realización particularmente preferida, la modificación en esta región implica la sustitución de Ile en la posición 115. Ile en la posición 115 puede sustituirse por aminoácidos que son más polares o que tienen cadenas laterales más cortas. Preferiblemente, Ile en la posición 115 se sustituye por Thr, Met, Val, Asp, Gly, Ser o Arg. Por tanto, las modificaciones preferidas incluyen I115T, I115M, I115V, I115D, I115G, I115S e I115R.

En una realización preferida la proteína variante de OPG comprende al menos una modificación en la región englobada por los residuos de aminoácidos 120-130. En otra realización preferida, la modificación implica la sustitución de Arg en la posición 122. Preferiblemente, la Arg en la posición 122 se sustituye por Gly, Gln, Ser, Asn o Glu. Por tanto, las modificaciones preferidas incluyen R122G, R122Q, R122S, R122N y R122E.

- 20 En aún una realización particularmente preferida, la modificación implica la sustitución de Phe en la posición 128. Preferiblemente, Phe en la posición 128 se sustituye por Val, Ala, Leu, He o Ser. Por tanto, las modificaciones preferidas incluyen F128V, F128A, F128L, F128I y F128S.

En todavía una realización preferida adicional, la modificación implica la sustitución de Val en la posición 130. Preferiblemente, Val en la posición 130 se sustituye por Glu o Ala.

- 25 En una realización preferida adicional, la proteína variante de OPG comprende al menos dos sustituciones en la región englobada por los residuos 102-130. Por ejemplo, las al menos dos modificaciones pueden implicar sustituciones en las posiciones 115 y 122. Ejemplos de modificaciones dobles adecuadas dentro de esta región son R122N y I115M; R122N y I115M; F128S y I115M; F128I y I115M; y F128L y I115M.

- 30 Alternativamente, las al menos dos modificaciones pueden implicar una o más modificaciones dentro de la región englobada por los aminoácidos 102-130 y una o más modificaciones fuera de esta región.

La modificación fuera de esta región puede producirse en, por ejemplo, uno cualquiera o más de los residuos 31, 40, 51, 100, 155, 167 ó 168. En una realización preferida, la modificación se produce en el residuo 40. Preferiblemente, la modificación implica la sustitución de Leu en la posición 40 por Ser.

- 35 En otra realización, la proteína variante de OPG de la presente invención comprende una o más modificaciones dentro de la región englobada por los aminoácidos 102-130 y una modificación para uno cualquiera o más de los siguientes residuos de aminoácidos: Gln21, Glu22, Thr23, Phe24, Pro25, Pro26, Lys27, Tyr28, Leu29, His30, Tyr31, Asp32, Glu33, Glu34, Thr35, Ser36, His37, Gln38, Asp42, Lys43, Pro45, Pro46, Thr48, Lys51, Gln52, His53, Cys54, Thr55, Ala56, Lys57, Trp58, Lys59, Thr60, Val61, Ala63, Pro64, Pro66, Asp67, His68, Tyr69, Asp72, Ser73, Trp74, Thr76, Ser77, Asp78, Glu79, Leu81, Tyr82, Ser84, Pro85, Val86, Lys88, Glu89, Leu90, Tyr92, Val93, Lys94, Gln95, Glu96, Asn98, Arg99, Thr100, His100, Val131, Gln132, Ala133, Gly134, Thr135, Pro136, Glu137, Arg138, Val141, Lys143, Arg144, Cys145, Pro146, Asp147, Gly148, Phe149, Phe150, Ser151, Asn152, Glu153, Thr154, Ser155, Ser156, Lys157, Ala158, Pro159, Cys160, Arg161, Lys162, His163, Thr164, Asn165, Cys166, Ser167, Val168, Phe169, Gly170, Leu171, Leu172, Leu173, Thr174, Gln175, Lys176, Gly177, Asn178, Ala179, Thr180, His181, Asp182, Asn183, Ile184, Cys185, Ser186, Gly187, Asn188, Ser189, Glu190, Ser191, Thr192, Gln193, Lys194, Cys195, Gly196, Ile197, Asp198, Val199, Thr200 y Leu201.

Una proteína variante de OPG de la presente invención puede implicar una cualquiera o más de las modificaciones mostradas en la tabla 1.

En una realización preferida adicional, la proteína variante de OPG comprende una secuencia tal como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID Nos: 5 a 47.

- 50 En una realización preferida adicional de la presente invención, la OVP muestra una afinidad de unión por RANKL que es al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, más

preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90% y más preferiblemente al menos un 95% de la de la OPG de tipo natural.

En una realización, la OVP muestra una afinidad de unión por RANKL aumentada en comparación con la OPG de tipo natural.

5 En una realización preferida adicional, la OVP tiene una CE50 (nM) para la unión a RANKL de menos de 5 nM, más preferiblemente de menos de 1 nM en condiciones de ensayo tal como se describen en el ejemplo 8.

En una realización preferida adicional de la presente invención, la OVP muestra una afinidad de unión por TRAIL que es de menos del 50%, más preferiblemente de menos del 40%, más preferiblemente de menos del 30%, más preferiblemente de menos del 20%, más preferiblemente de menos del 10% y más preferiblemente de menos del 5% que la de la OPG de tipo natural.

10

En una realización preferida adicional, la OVP tiene una CE50 (nM) para la unión a TRAIL de más de 5 nM, más preferiblemente de más de 10 nM, más preferiblemente de más de 25 nM, más preferiblemente de más de 50 nM en condiciones de ensayo tal como se describen en el ejemplo 8.

También se engloban proteínas variantes de OPG que tienen deleciones o truncamientos en el extremo carboxilo terminal de parte o todos los residuos de aminoácidos 195-401 ó 198-401 de OPG; uno o más cambios de aminoácido en los residuos 195-401 ó 198-401; deleción de parte o la totalidad de un dominio rico en cisteína de la OPG, en particular deleción del dominio rico en cisteína distal (extremo carboxilo terminal); y uno o más cambios de aminoácido en un dominio rico en cisteína, en particular en el dominio rico en cisteína distal (extremo carboxilo terminal).

15

20 Las deleciones preferidas en la secuencia de aminoácidos generalmente oscilan entre aproximadamente 1 y 30 residuos, más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 10 residuos y normalmente entre aproximadamente 1 y 5 residuos contiguos.

Se entenderá que la numeración de aminoácidos usada en el presente documento para hacer referencia a los sitios para la mutagénesis se refiere a una numeración de la secuencia de la OPG humana mostrada en las SEQ ID NOs: 1 y 2. Sitios correspondientes en homólogos, derivados y variantes alélicas también se engloban por la presente invención.

25

La expresión "correspondiente a" se usa en el contexto de la presente invención para hacer referencia a residuos de aminoácidos de polipéptidos de OPG relacionados con las SEQ ID NOs 1 y 2 (por ejemplo idénticos en más del 70%, idénticos en más del 80%, idénticos en más del 90% o idénticos en más del 95% a las SEQ ID NOs 1 y 2), sin embargo, la numeración de residuos relativa del polipéptido relacionado puede ser diferente de la de las SEQ ID NOs 1 y 2.

30

También se engloban proteínas variantes de OPG descritas en el presente documento que comprende sustituciones conservativas adicionales por toda la secuencia. Tales sustituciones conservativas son las siguientes:

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala (A)	Val; Leu; Ile; Gly
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His;
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn; His
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val; Ala
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu; Phe;
Phe (F)	Leu; Val; Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe, Ala

Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos que no se producen de manera natural o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en el polipéptido de la presente invención. Tales aminoácidos incluyen, pero sin limitarse a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cistéico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina,  $\beta$ -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos diseñados tales como  $\beta$ -metil-aminoácidos,  $C\alpha$ -metil-aminoácidos,  $N\alpha$ -metil-aminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

La invención también proporciona derivados modificados químicamente de proteínas variantes de OPG que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como aumento de la estabilidad y el tiempo de circulación del polipéptido, o disminución de la inmunogenicidad (véase la patente estadounidense n.º 4,179,337). Los restos químicos para la derivatización pueden seleccionarse de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) y similares. También se incluyen OVP de la presente invención que se modifican de manera diferente durante o tras la síntesis, por ejemplo, mediante biotilación, bencilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, etc. Los polipéptidos pueden modificarse en posiciones aleatorias dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos. Estas modificaciones pueden servir para aumentar la estabilidad y/o bioactividad del polipéptido de la invención.

Modificaciones adicionales de las proteínas variantes de OPG englobadas por la invención incluyen modificaciones postraduccionales (por ejemplo, cadenas de hidratos de carbono unidas en N o unidas en O, procesamiento de extremos N-terminal o C-terminal), modificaciones químicas de cadenas de hidratos de carbono unidas en N o unidas en O, y adición de un residuo de metionina N-terminal como resultado de la expresión de la célula huésped procarionta. Las OVP también pueden modificarse con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad para permitir la detección y aislamiento de la proteína.

Modificaciones adicionales de las proteínas variantes de OPG incluyen proteínas quiméricas en la que la proteína variante de OPG se fusiona a una secuencia de aminoácidos heteróloga. La secuencia heteróloga puede ser cualquier secuencia que permita que la proteína de fusión resultante conserve al menos la actividad de la proteína variante de OPG. Las secuencias heterólogas incluyen por ejemplo, fusión a inmunoglobulinas, tales como fusiones a Fc, o fusiones a otros ligandos celulares que pueden aumentar la estabilidad o ayudar en la purificación de la proteína.

En una realización, las proteínas variantes de OPG de la invención pueden producirse como moléculas monocatenarias diméricas o incluso oligoméricas, con dos, tres o posiblemente más monómeros.

Los monómeros pueden unirse mediante un enlace peptídico o un ligador peptídico, o por ejemplo, por medio de una molécula de PEG.

La dimerización también puede lograrse produciendo el compuesto como una proteína de fusión con la parte Fc de la Ig gamma 1 (n.º de registro de GenPept M87789.1). Las moléculas pueden expresarse como proteínas de fusión con una parte Fc en el extremo C-terminal o con una parte Fc en el extremo N-terminal.

La dimerización también puede lograrse fusionando el producto candidato con una cremallera de leucina de GCN4, que se ha notificado que induce la dimerización de las proteínas de fusión (Donate, *et al.*, *Biochemistry*, 39 11467-76 (2000)).

Alternativamente, las moléculas diméricas pueden producirse mutagenizando uno de los cinco últimos, o alternativamente uno de los cinco primeros residuos de aminoácidos en un residuo de cisteína. Entonces puede unirse un residuo de cisteína sin aparear del compuesto purificado a un grupo de PEG "di-activo" mediante el uso de grupos de unión reactivos de tiol. Alternativamente, pueden producirse moléculas diméricas insertando dos moléculas candidatas (idénticas o incluso diferentes) en marco con un ligador polipeptídico flexible adecuado en un vector de expresión adecuado.

Modificaciones todavía adicionales de las proteínas variantes de OPG incluyen formas diméricas o multiméricas en las que las unidades monoméricas de la proteína variante de OPG pueden unirse entre sí de manera química o genética mediante moléculas de ligador apropiadas que pueden incluir ligadores peptídicos o químicos, o puentes disulfuro entre residuos de cisteína. Adicionalmente, pueden lograrse formas diméricas o multiméricas de las proteínas objeto mediante enlaces entre las proteínas a las que se fusiona la proteína OPG, tales como regiones Fc.

Las proteínas variantes de OPG de la invención preferiblemente se aíslan y purifican a partir de otros polipéptidos presentes en tejidos, líneas celulares y células huésped transformadas que expresan la OVP, o se purifican a partir

de componentes en cultivos celulares que contienen la proteína secretada. En una realización, la OVP está libre de asociación con otras proteínas, tales como el producto de expresión de una célula huésped bacteriana.

Las proteínas variantes de OPG de la presente invención pueden prepararse usando cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, el polinucleótido proporcionado como SEQ ID NO: 1 puede someterse a mutagénesis *in vitro*. Tales técnicas de mutagénesis *in vitro* incluyen subclonar el polinucleótido en un vector adecuado, transformar el vector en una cepa "mutadora" tal como la E. coli XL-1 red (Stratagene) y propagar las bacterias transformadas durante un número adecuado de generaciones. En otro ejemplo, los polinucleótidos de la invención se someten a técnicas de intercambio de ADN tal como se describe ampliamente por Harayama (1998). Los productos proteicos derivados del ADN mutado/alterado pueden clasificarse fácilmente usando las técnicas descritas en el presente documento para determinar si tienen especificidad de sustrato potenciada y/o alterada.

También pueden prepararse mutantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en una secuencia de ácido nucleico, o mediante la síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Tales mutantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. Puede realizarse una combinación de deleción, inserción y sustitución para alcanzar el constructo final, siempre que el producto proteico final tenga las características deseadas.

Los mutantes por sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la secuencia de OPG de tipo natural eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen los sitios facilitados a modo de ejemplo en el presente documento. Los sitios para la mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, (1) sustituyendo en primer lugar por elecciones de aminoácido conservativo y luego por selecciones más radicales dependiendo de los resultados logrados, (2) delecionando el residuo diana, o (3) insertando otros residuos adyacentes al sitio localizado.

Alternativamente, las proteínas variantes de OPG pueden generarse usando un sistema de mutagénesis por evolución *in vitro* libre de células. En un ejemplo de evolución *in vitro* libre de células, se utiliza un sistema similar al descrito en los documentos WO 99/58661 o WO 2004/039995.

Un método de evolución *in vitro* libre de células comprende exponer moléculas de ARN de OPG mutante, producidas directa o indirectamente por la acción de una polimerasa en presencia de un mutágeno (tal como replicasa QB o ribavirina, o un derivado/análogo de los mismos) a un sistema de traducción en condiciones que dan como resultado la producción de una población de proteínas mutantes. Estas proteínas OPG mutantes se unen al ARN a partir del que se traducen formando una población de complejos de proteína mutante/ARN. Esta población de complejos de proteína OPG mutante/ARN se clasifica para determinar una actividad biológica deseada tal como unión a RANKL sin unión a TRAIL. Puede aislarse un complejo de proteína mutante/ARN con la actividad deseada y puede caracterizarse la secuencia de la proteína codificada por el ARN mediante técnicas convencionales.

La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una proteína variante de OPG de la invención, comprendiendo el procedimiento hacer crecer en cultivo una célula huésped de la invención en condiciones que permiten la producción de la proteína variante de OPG, y recuperar la proteína variante de OPG. Tales células pueden usarse para la producción de cantidades útiles comercialmente de la proteína variante de OPG codificada.

Las proteínas variantes de OPG de la presente invención pueden producirse de una variedad de formas, incluyendo la producción y recuperación de proteínas naturales, producción y recuperación de proteínas recombinantes, y síntesis química de las proteínas. En una realización, una proteína variante de OPG de la presente invención se produce haciendo crecer en cultivo una célula que puede expresar la proteína variante de OPG en condiciones eficaces para producir la proteína variante de OPG, y recuperando la proteína variante de OPG. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero sin limitarse a, condiciones de medios, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno eficaces que permitan la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se hace crecer en cultivo una célula para producir un polipéptido de la presente invención. Un medio de este tipo comprende normalmente un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las células de la presente invención pueden hacerse crecer en cultivo en biorreactores de fermentación, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas Petri convencionales. El cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura, pH y contenido en oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto habitual en la técnica.

También se incluye un método para la purificación de proteínas variantes de OPG a partir de células huésped transfectadas. El procedimiento de purificación puede emplear una o más etapas de purificación de proteínas convencionales, tales como cromatografía, en un orden apropiado para obtener la proteína purificada. Las etapas cromatográficas pueden incluir intercambio de iones, filtración en gel, interacción hidrófoba, fase inversa, cromatoenfoco, cromatografía de afinidad que emplea un anticuerpo anti-OPG o un complejo de afinidad de biotina-estreptavidina y similares.

La presente invención también proporciona un método para reducir la afinidad de unión de OPG por TRAIL, comprendiendo el método modificar al menos un aminoácido seleccionado de los residuos 102, 111, 115, 122, 128, 130 de OPG de tipo natural para producir una variante de OPG de tipo natural o fragmento de la misma para producir una proteína variante de OPG, y someter a prueba la proteína variante de OPG para determinar la afinidad de unión por TRAIL.

Los métodos para someter a prueba la proteína variante de OPG para determinar la afinidad de unión por TRAIL se conocerán por los expertos en la técnica. Ensayos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, comparaciones cuantitativas que comparan las constantes de unión de equilibrio y cinética. La tasa de asociación (Kon) y la tasa de disociación (Koff) cinéticas, y las constantes de unión de equilibrio (Kd) pueden determinarse usando resonancia de plasmón superficial en un instrumento BIAcore siguiendo el procedimiento convencional en la bibliografía (Pearce *et al*, Biochemistry 38:81-89 (1999)). También pueden usarse varios métodos alternativos para determinar la cinética y la afinidad de unión, cuyos ejemplos se describen en la sección de ejemplos en el presente documento.

#### Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que codifica para una proteína variante de OPG de la presente invención. Ejemplos de polinucleótidos de la invención incluyen ADNc, ADN genómico, ADN sintético y ARN.

Preferiblemente, el polinucleótido es una variante de SEQ ID NO: 1, comprendiendo la variante cambios de ácido nucleico de manera que codifique para la proteína variante de OPG deseada de la invención. Los métodos de producción de tales cambios de ácido nucleico se conocen en la técnica y también se describen en el presente documento.

La presente invención también proporciona un vector que comprende un polinucleótido según la invención. Preferiblemente, el vector es adecuado para la replicación y/o la expresión de un polinucleótido. Los vectores pueden ser, por ejemplo, un vector de plásmido, virus o fago dotado de un origen de replicación, y preferiblemente un promotor para la expresión del polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. El vector puede contener uno o más marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a neomicina para un vector de expresión en mamíferos. El vector puede usarse *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o puede usarse para transfectar o transformar una célula huésped

La presente invención también proporciona una célula huésped que comprende un vector según la invención, o que contiene el gen que codifica para una de las proteínas de la invención en condiciones que permiten la expresión y la producción de la proteína objeto.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden construirse usando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio o evolutiva disponibles para el experto. El material de partida puede ser, por ejemplo, ADNc o ADN genómico que codifica para OPG de tipo natural. El ADNc puede obtenerse a partir de bibliotecas preparadas a partir de ARNm aislado de diversos tejidos que expresan osteoprotegerina. En seres humanos, las fuentes tisulares para la osteoprotegerina incluyen riñón, hígado, placenta y corazón. El ADN genómico que codifica para osteoprotegerina se obtiene a partir de bibliotecas genómicas que están disponibles comercialmente a partir de una variedad de especies.

Alternativamente, los ácidos nucleicos de la invención pueden ser ácidos nucleicos sintéticos. El ADN sintético, por ejemplo, se obtiene mediante síntesis química de fragmentos de oligonucleótidos solapantes seguido por la unión de los fragmentos para reconstituir parte o toda la región codificante y las secuencias flanqueantes (véase la patente estadounidense n.º 4.695.623 que describe la síntesis química de los genes de interferón). El ARN se obtiene lo más fácilmente mediante vectores de expresión procariotas o mediante constructos *in vitro* que dirigen la síntesis de alto nivel del ARNm, tales como vectores que usan ARN polimerasa y promotores de T7.

La invención también proporciona vectores de expresión que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican para OVP, células huésped transformadas con dichos vectores y métodos para la producción de OVP. Una perspectiva general de la expresión de proteínas recombinantes se encuentra en Methods of Enzymology Vol. 185 (Goeddel, D. V. ed.) Academic Press (1990).

Las células huésped para la producción de OVP incluyen células huésped procariotas, tales como células huésped de *E. coli*, levaduras, plantas, hongos, insectos y mamíferos. Las cepas de *E. coli* tales como HB101 o JM101 son adecuadas para la expresión. Las células huésped de mamífero preferidas incluyen células COS, CHOd-, 293, CV-1, 3T3, de riñón de hámster recién nacido (BHK) y otras. Se prefieren las células huésped de mamífero cuando las postraduccionales, tales como glicosilación y procesamiento polipeptídico, son importantes para la actividad de OVP. La expresión en mamíferos permite la producción de polipéptidos secretados que pueden recuperarse del medio de crecimiento.

- Los vectores para la expresión de las OVP contienen preferiblemente como mínimo secuencias requeridas para la propagación del vector y para la expresión del inserto clonado. Estas secuencias incluyen un origen de replicación, un marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosomas, secuencias potenciadoras, sitios de corte y empalme de ARN y un sitio de terminación de la transcripción. Los vectores adecuados para su expresión en las células huésped mencionadas anteriormente están fácilmente disponibles y los ácidos nucleicos de la invención se insertan en los vectores usando técnicas de ADN recombinante convencionales. También se incluyen vectores para la expresión específica de tejido de osteoprotegerina. Tales vectores incluyen promotores que funcionan específicamente en hígado, riñón u otros órganos para la producción en ratones, y vectores virales para la expresión de osteoprotegerina en células humanas seleccionadas como diana.
- Usando un sistema huésped-vector apropiado, puede producirse una OVP de manera recombinante haciendo crecer en cultivo una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene secuencias de ácido nucleico que codifican para la OVP en condiciones tales que se produzca la OVP, y aislando el producto de expresión. La OVP puede producirse en el sobrenadante de células de mamífero transfectadas o en cuerpos de inclusión de células huésped bacterianas transformadas. La OVP así producida puede purificarse mediante procedimientos conocidos por un experto en la técnica, tal como se describe más adelante. La expresión de OVP en *E. coli* se describe en el ejemplo 2. Sin embargo, los plásmidos y células huésped específicos descritos en este ejemplo son únicamente para fines ilustrativos, y se apreciará que también podrían usarse otros plásmidos y células huésped disponibles para expresar las OVP de la invención.

#### Composiciones farmacéuticas

- La presente invención proporciona una composición para inhibir o reducir la unión de RANK a RANKL, comprendiendo la composición una proteína variante de OPG según la invención, y uno o más vehículos aceptables.
- La presente invención también proporciona una composición para inhibir o reducir un efecto biológico mediado a través de la interacción de RANK y RANKL, comprendiendo la composición una proteína variante de OPG según la invención, y uno o más vehículos aceptables.
- La presente invención también proporciona una composición para inhibir o reducir la estimulación de los osteoclastos inducida por RANKL, comprendiendo la composición una proteína variante de OPG según la invención, y uno o más vehículos aceptables.
- La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína variante de OPG según la invención y uno o más de un vehículo, solubilizante, estabilizador y antioxidante farmacéuticamente aceptables.
- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad que proporciona un efecto terapéutico para un estado y vía de administración especificados. La composición puede estar en forma líquida o liofilizada y comprende un diluyente (tampones Tris, acetato o fosfato) que tiene diversos valores de pH y fuerza iónica, un solubilizante tal como Tween o polisorbato, vehículos tales como albúmina sérica humana o gelatina, conservantes tales como timerosal o alcohol bencílico, y antioxidantes tales como ácido ascórbico o metabisulfito de sodio. También se engloba una composición que comprende una OVP modificada con polímeros solubles en agua para aumentar la solubilidad o la estabilidad. Las composiciones también pueden comprender la incorporación de OPV en liposomas, microemulsiones, micelas o vesículas para la administración controlada durante un periodo de tiempo prolongado. La selección de una composición particular dependerá de varios factores, incluyendo el estado que está tratándose, la vía de administración y los parámetros farmacocinéticos deseados. Un estudio más amplio de componentes adecuados para las composiciones farmacéuticas se encuentra en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. A. R. Gennaro, ed. Mack, Easton, Pa. (1980).
- Las composiciones de la invención pueden administrarse mediante inyección, ya sea subcutánea, intravenosa o intramuscular, o mediante administración por vía oral, nasal, pulmonar o rectal. La vía de administración elegida finalmente dependerá de varios factores y puede establecerse por un experto en la técnica.
- La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de los ácidos nucleicos de la invención junto con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de ácido nucleico serán adecuadas para la administración de parte o toda la OVP a células y tejidos como parte de un régimen de terapia génica.
- Por "terapia génica" en el presente documento quiere decirse la administración de una vez o repetida de un ADN, ARNm u otro ácido nucleico terapéuticamente eficaz. En una realización, los genes se introducen en las células con el fin de lograr la síntesis *in vivo* de un producto génico terapéuticamente eficaz.

#### Métodos de tratamiento

- La OPG se ha sometido a pruebas preclínicas y clínicas con posibilidades de aplicación en diversos estados asociados con un aumento del recambio óseo y la pérdida ósea, incluyendo osteoporosis, artritis reumatoide,

enfermedad de Paget, enfermedad periodontal, enfermedad vascular y cánceres que se ubican en o han metastatizado el hueso (Para revisión, véase Lorenz *et al.*, J. Amer Med Assoc 292: 490-5(2004) y referencias en el mismo).

5 También se conoce que antagonizar la señalización de RANK podría ser un tratamiento para trastornos autoinmunitarios tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante.

10 Informes recientes también indican que la OPG también puede usarse en el tratamiento o la prevención de enfermedad cardiovascular, para prevenir o reducir la calcificación de válvulas y vasos sanguíneos (Kaden *et al.*, J. Mol. Cardiol. 36: 17-19 (2004) y para estimular el crecimiento de vasos sanguíneos (Cross *et al.*; Int J Cancer 14 de noviembre de 2005 (epub)). Los polimorfismos en el gen de OPG se han asociado con la aparición de la enfermedad de Paget juvenil (Daroszevska *et al.*, J. Bone Miner. Res 19: 1506-11 (2004)) y con el alto riesgo de que las personas de raza blanca desarrollen arteriopatía coronaria (Soufi *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 89: 3764-8 (2004)).

15 Por tanto, está claro que las proteínas variantes de OPG de la presente invención tendrán una variedad de usos terapéuticos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de una variante de OPG de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir o reducir un efecto biológico mediado a través de la interacción de RANK y RANKL en una célula.

La presente invención también proporciona una variante de OPG de la invención para su uso en terapia.

20 La presente invención también proporciona el uso de una variante de OPG de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario.

La presente invención también proporciona el uso de una variante de OPG de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad cardiovascular.

25 También se da a conocer un método para inhibir o reducir la unión de RANK a RANKL, comprendiendo el método exponer una molécula de RANKL a una proteína variante de OPG según la presente invención.

También se da a conocer un método para inhibir o reducir un efecto biológico mediado a través de la interacción de RANK y RANKL en una célula, comprendiendo el método exponer la célula a una proteína variante de OPG según la presente invención.

30 También se da a conocer un método para inhibir o reducir un efecto biológico mediado a través de la interacción de RANK y RANKL en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto una proteína variante de OPG según la invención. También se da a conocer un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto una proteína variante de OPG según la invención.

35 También se da a conocer un método para el tratamiento o la prevención de la enfermedad cardiovascular en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto una proteína variante de OPG según la invención.

También se da a conocer un método para inhibir o reducir la diferenciación, activación y/o supervivencia de los osteoclastos inducidas por RANKL, comprendiendo el método exponer tejido que contiene osteoclastos o precursores de osteoclastos a una proteína variante de OPG según la invención.

40 También se da a conocer un método para inhibir o reducir la diferenciación, activación y/o supervivencia de los osteoclastos inducidas por RANKL en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto una proteína variante de OPG según la invención.

Por "sujeto" en el presente documento quiere decirse tanto seres humanos como otros animales, en particular mamíferos tal como se explica resumidamente en el presente documento, prefiriéndose los seres humanos.

45 También se da a conocer un método para prevenir o tratar un trastorno óseo que comprende administrar a un paciente la composición farmacéutica de la presente invención.

Los términos "tratar" y "tratamiento" en el presente documento pretenden incluir el tratamiento terapéutico, así como

medidas profilácticas o supresoras para la enfermedad o el trastorno. Por tanto, por ejemplo, la administración satisfactoria de una proteína variante de OPG antes del comienzo de la enfermedad puede dar como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración satisfactoria de una proteína variante de OPG tras la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el "tratamiento" de la enfermedad. "Tratamiento" también engloba la administración de una proteína variante de OPG tras la aparición de la enfermedad con el fin de erradicar la enfermedad. La administración satisfactoria de un agente tras el comienzo y una vez desarrollados los síntomas clínicos, con posible alivio de los síntomas clínicos y quizá con la mejora de la enfermedad, también comprende el "tratamiento" de la enfermedad.

Los estados que pueden tratarse con las OVP de la presente invención incluyen los siguientes:

- 10 • Osteoporosis, tal como osteoporosis primaria, osteoporosis endocrina (hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing y acromegalia), formas hereditarias y congénitas de osteoporosis (osteogénesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Menkes y síndrome de Riley-Day) y osteoporosis debida a inmovilización de las extremidades.
- Enfermedad de Paget del hueso (osteítis deformante) en adultos y jóvenes.
- 15 • Osteomielitis, o una lesión infecciosa en el hueso, que conduce a pérdida ósea.
- Hipercalcemia que resulta de tumores sólidos (mama, pulmón y riñón) y tumores malignos hematológicos (mieloma múltiple, linfoma y leucemia); hipercalcemia idiopática, e hipercalcemia asociada con hipertiroidismo y trastornos de la función renal.
- 20 • Osteopenia tras cirugía, inducida por la administración de esteroides y asociada con trastornos del intestino delgado y grueso y con enfermedades hepáticas y renales crónicas.
- Osteonecrosis, o muerte de células óseas, asociada con lesión traumática o necrosis no traumática asociada con la enfermedad de Gaucher, anemia drepanocítica, lupus eritematoso sistémico y otros estados.
- Pérdida ósea debida a artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y otros trastornos inflamatorios mediados por el sistema inmunitario.
- 25 • Calcificación del sistema vascular.
- Pérdida ósea periodontal.
- Cánceres que afectan al hueso incluyendo mieloma múltiple, cáncer primario de huesos y metástasis osteolíticas tales como el cáncer de próstata y mama metastatizados.
- Enfermedad cardiovascular.
- 30 • Arteriopatía coronaria.
- Trastornos autoinmunitarios tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante.

Se apreciará que una OVP de la invención puede usarse sola o conjuntamente con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, una OVP de la presente invención puede usarse conjuntamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo activador de TRAIL o un anticuerpo anti-TNF.

La proteína variante de OPG de la presente invención puede usarse para tratar un trastorno óseo que está asociado con pérdida o recambio óseos excesivos. El trastorno óseo puede incluir, pero sin limitarse a, osteoporosis, enfermedad de Paget del hueso, hipercalcemia, hiperparatiroidismo, osteopenia inducida por esteroides, artritis reumatoide, osteomielitis, mieloma múltiple, cáncer de huesos, calcificación vascular, metástasis osteolítica y pérdida ósea periodontal.

Se entiende que la OVP de la invención puede usarse sola o conjuntamente con otros factores para el tratamiento de los trastornos óseos.

La OVP puede usarse conjuntamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un factor que estimula la formación ósea. Tales factores incluyen pero sin limitarse a los factores morfogénicos óseos denominados de BMP-1

a BMP-12, que transforman el factor de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y los miembros de la familia de TGF- $\beta$ , inhibidores de la interleucina-1, inhibidores del TNF $\alpha$ , hormona paratiroidea y análogos de la misma, proteína relaciona con la hormona paratiroidea y análogos de la misma, serie de vitamina E, prostaglandinas, bifosfonatos (tales como alendronato y otros), y minerales de potenciación ósea tales como flúor y calcio.

5 Ahora se describirá la invención en más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

**Ejemplo 1: Clonación del gen de OPG humana**

Se aisló el gen para la OPG a partir de una biblioteca de ADNc de riñón fetal humano (Spring Bioscience, Fremont, CA). Se diseñaron cebadores para los extremos 5' y 3' de la secuencia de OPG y se usó PCR convencional para amplificar el gen. Los cebadores usados para aislar el gen de OPG fueron:

**Directo: 5'TATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGAACAAGTTGCTGTGCTGCG**  
**CGCTCG 3' (SEQ ID NO:48)**  
**Inverso: 5'CATCTTTATAATCTGCGGCCGCTAAGCAGCTTATTTTTACTGATTG**  
**GACC 3' (SEQ ID NO:49).**

Sobresaliendo por encima en los cebadores se incorporan sitios de restricción que permiten la clonación en vectores adecuados para la propagación en *E. coli*, tales como pGC (Coia *et al.*, (1996), J. Immunol. Meth. 192:13-23) con clonación satisfactoria confirmada mediante secuenciación de ADN. Además de los 1203 nucleótidos que codifican para la proteína OPG de 401 aa de longitud completa, se amplificó la secuencia de OPG excluyendo su péptido señal (aa 1-21) (OPG 22-401). También se amplificó la mitad N-terminal de la proteína hasta el aa 194, que comprende los 4 dominios ricos en Cys, con y sin péptido señal. En la figura 1A se muestra una representación esquemática de la estructura génica de OPG.

Se expresó el fragmento OPG 22-194, que engloba la parte de la proteína responsable de la unión a RANK y TRAIL (Simonet *et al.*, (1997); Yamaguchi *et al.*, (1998) tal como se mencionó anteriormente) en 2 l de 2 x YT/100  $\mu$ g/ml de ampicilina con inducción por IPTG del vector pGC. Esto produce la proteína con una fusión del marcador peptídico FLAG doble en el extremo C-terminal para la detección y purificación por afinidad de extractos periplásmicos de *E. coli*. Se llevó a cabo la inducción durante 3-4 h a 20-22°C. El material purificado por afinidad se purificó en picos adicionales mediante cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200. Se recogieron los picos correspondientes en tamaño a un monómero de OPG. También se purificó un pico más pequeño, correspondiente en tamaño a un dímero de OPG. Los picos purificados pudieron detectarse mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-FLAG que migraba a aproximadamente el tamaño esperado. Se detectó la proteína monomérica purificada mediante anticuerpos específicos suministrados con un kit de detección de OPG (R&D systems, Minneapolis, MN). Se confirmó la identidad de esta proteína mediante secuenciación de los aminoácidos del extremo N-terminal de sus primeros 19 residuos que se correlacionan con la secuencia publicada.

**Ejemplo 2: Generación de proteínas variantes de OPG (OVP)**

Para crear una biblioteca de variantes de OPG, se clonó la secuencia de ADN de OPG(22-194) en el vector de mutagénesis y presentación pEGX (figura 1B) con confirmación mediante secuenciación de ADN. Se linearizó el plásmido que contenía OPG (~ 0,5-1,0  $\mu$ g) mediante digestión con *Sma*I y se usaron 100-200 ng de esto directamente como molde para la transcripción mediante la ARN polimerasa de T7 a 37°C durante 16-24 h. Se verificó el éxito de la transcripción mediante electroforesis en gel de agarosa cargando 1  $\mu$ l de la reacción de 20  $\mu$ l. Cuando fue posible, todas las manipulaciones que implicaban ARN, incluyendo la presentación en ribosomas, usaron tubos, reactivos y tampones tratados con DEPC para minimizar la degradación del ARN.

El transcrito de ARN se usa directamente como molde para una reacción de replicación mediante Q $\beta$  replicasa a 37°C durante 16-24 h:

	volumen ( $\mu$ l)
Transcrito de ARN de T7	0,5
rNTP 25 mM	1
5 X tampón polimerasa de T7	4
DTT 100 mM	2
MgSO <sub>4</sub> 100 Mm	0 – 1,6
Q $\beta$ replicasa	1
H <sub>2</sub> O	10,5 – 8,9

Se evaluó el éxito de la replicación mediante electroforesis en gel de agarosa cargando 1 µl de la reacción. Este procedimiento genera una biblioteca de ARN bicatenario que codifica para variantes de OPG. Se ajustaron las condiciones de la mutación para obtener 1-3 mutaciones aleatorias por copia génica. En esta fase, 1 µg de la biblioteca de ARN de OPG que se estaba preparando para la presentación es equivalente a aproximadamente 7 x 10<sup>11</sup> moléculas. Entonces se estima la concentración de la muestra mediante espectrofotometría.

Entonces se usó la biblioteca de ARN de OPG para la presentación en ribosomas. En primer lugar se tradujo la biblioteca durante 30 min. a 30°C usando un sistema de traducción de lisado de reticulocitos de conejo (Promega):

	volumen (µl)
Lisado de reticulocitos	33
Mezcla de aminoácidos menos Leu	0,5
Mezcla de aminoácidos menos Met	0,5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0,5
RNasin	0,5
KCI	1.5
ARN de OPG	1-2 µg
H <sub>2</sub> O	hasta 50 µl

La ausencia de un codón de terminación en el extremo del dominio espaciador C<sub>L</sub> paraliza al ribosoma al final de la traducción lo que conduce a un complejo de ARN/ribosoma/proteína. A la finalización de la traducción, estos complejos se estabilizaron manteniéndolos fríos (en hielo) y con la adición de acetato de magnesio (MgOAc). La traducción se diluyó hasta 300 µl con la adición de 60 µl de PBS helado/MgOAc 50 mM/leche desnatada al 10% (libre de biotina) y 190 µl de PBS/MgOAc 50 mM/Tween al 0,05%/ heparina 2,5 mg/ml. Entonces se dividió esta mezcla en 3 alícuotas de 100 µl.

### 15 Ejemplo 3: Cribado de OVP

Se cribaron los complejos generados en el ejemplo 2 frente a RANKL (Roche) y TRAIL (Peprotech) en disolución. Se prepararon versiones biotiniladas de RANKL y TRAIL usando Sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce) para permitir la captura de los complejos seleccionados en disolución usando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dyna).

Se llevó a cabo una reacción de cribado en cada una de las tres alícuotas de la mezcla de traducción. Se emplearon dos estrategias diferentes para crear una presión de selección que favoreciera el aislamiento de secuencias de OVP que tienen cambios de aminoácido en los residuos que reducen la afinidad de unión a TRAIL, mientras que conservan la afinidad de unión a RANKL. Una estrategia usada fue cribar en primer lugar frente a RANKL soluble y luego se hicieron competir aglutinantes de TRAIL con un exceso de proteína TRAIL libre. En una alícuota de traducción, se añadió biotini-RANKL a una concentración que era aproximadamente equimolar a la cantidad de ARN de entrada. Entonces se centrifugó esta mezcla durante 40-60 min. a 4°C. Se lavaron las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dyna) y se resuspendieron en PBS/MgOAc 50 mM/Tween al 0,05%. Tras el cribado frente a RANKL, se añadieron 10 µl de estas perlas a la mezcla durante 10 min. a 4°C. Entonces se lavaron las perlas que capturaron biotini-RANKL en complejo con OPG presentada en ribosomas usando un imán, dos veces con PBS/MgOAc 50 mM/ Tween al 0,05%, dos veces con PBS/MgOAc 50 mM, luego se resuspendieron en 100 µl de este tampón. Se añadió un exceso de TRAIL soluble a esta mezcla a 2 o más veces la concentración molar de RANKL añadido para competir con los aglutinantes de TRAIL y esto se centrifugó a 4°C durante 30 min. Entonces se eliminó por lavado cualquier complejo eluido de las perlas durante este procedimiento como anteriormente y se resuspendieron las perlas con complejos de unión a RANKL unidos en 20 µl de H<sub>2</sub>O. Esta estrategia de cribado se denominó "RANKL-1<sup>o</sup>".

La otra estrategia usada fue cribar en primer lugar frente a TRAIL soluble para eliminar los aglutinantes de TRAIL más fuertes, y luego cribar la mezcla frente a RANKL para aislar los aglutinantes de RANKL restantes. A una segunda alícuota de traducción, se añadió biotini-TRAIL a aproximadamente de ½ a ¼ de la cantidad molar de ARN de entrada. Esta mezcla se centrifugó durante 40-60 min. a 4°C, luego se añadieron 10 µl de perlas con estreptavidina durante 10 min. Se eliminaron las perlas que capturaron biotini-TRAIL en complejo con OVP presentadas en ribosomas usando un imán, quitando de ese modo de la mezcla los mejores aglutinantes de TRAIL. Entonces, se añadió biotini-RANKL a la mezcla a aproximadamente ½ la cantidad molar del ARN de entrada y esto se centrifugó a 4°C durante 30-40 min. para la selección de las variantes de OPG que conservan la afinidad de unión a RANKL. Entonces, se lavaron las perlas como anteriormente y se resuspendieron en H<sub>2</sub>O. Esta estrategia de cribado se denominó "TRAIL-1<sup>o</sup>". Se llevó a cabo un cribado de control en una tercera alícuota de traducción tal como se realizó en el cribado RANKL-1<sup>o</sup> pero se usó biotini-IGF-I (Groppe) en lugar de biotini-RANKL. También se realizó una variación de las estrategias de selección RANKL-1<sup>o</sup> y TRAIL-1<sup>o</sup> descritas anteriormente en la que los antígenos usados se acoplaron a perlas magnéticas con epoxi (Dyna) en lugar de usar los antígenos en forma biotinilada soluble.

**Ejemplo 4: Clonación de OVP seleccionadas**

Se convirtió el ARN seleccionado con los complejos en ADNc utilizando RT-PCR mediante métodos convencionales usando 5 µl de la suspensión de perlas como molde. Se aislaron los productos de la RT-PCR mediante electroforesis en agarosa. Al igual que las bandas para los cribados de TRAIL-1<sup>o</sup> y RANKL-1<sup>o</sup>, pudo observarse una banda débil generada a partir del cribado frente a IGF-I, lo que sugiere que hay cierta selección no específica inherente dentro de este procedimiento de selección. Entonces se purificó el conjunto de ADN seleccionados a partir del gel se digirió mediante restricción y se ligó en el vector de expresión pGC de modo que pudo continuarse con la clasificación para determinar las propiedades de unión deseadas. Se sometieron los ligamientos a electroporación en una cepa de *E. coli* apropiada para producir colonias transformantes.

**Ejemplo 5: Clasificación de clones de OVP**

Se clasificaron aproximadamente 100 clones de cada experimento de presentación y selección. Se hicieron crecer los clones que portaban los genes para OVP como cultivos de partida 200 µl de 2 x YT complementado con ampicilina y glucosa en pocillos de placas de microtitulación y se incubaron durante la noche a 37°C. Estos cultivos se usaron como inóculo para cultivos de expresión en 200 µl de 2 x YT complementado con ampicilina. Cuando las densidades ópticas a 600 nm de los cultivos alcanzaron aproximadamente 1,0, se indujo la expresión de variantes a partir de pGC con la adición de IPTG a 0,5-1 mM y la incubación durante 16 h a 20-22°C. Entonces se recogieron los sobrenadantes del cultivo para unión en ELISA a RANKL y TRAIL recubiertos durante la noche en superficies de pocillo de placas de microtitulación. Se bloquearon las superficies con caseína al 0,5% durante 2 h. Se filtraron los sobrenadantes usando placas de microtitulación fijadas con membranas con 100 kD de punto de corte de peso molecular (MWCO) para eliminar las especies y los agregados de peso molecular superior lo que ayuda a reducir la señal de fondo en el ELISA. Se aplican estos sobrenadantes filtrados a los pocillos bloqueados y recubiertos con antígeno. Se logra la detección de OVP unidas usando anticuerpo de ratón anti-FLAG, luego anticuerpo de cabra anti-conjugado de peroxidasa-ratón (BioRad). Se usa TMB (KPL) como sustrato de peroxidasa midiéndose la señal de unión mediante la lectura de la absorbancia a 450 nm. Se realizaron lavados entremedias de las etapas 3 veces con PBS/Tween al 0,05%, luego 3 veces con PBS y se realizaron diluciones en caseína al 0,25%. Se evaluó esta primera clasificación en bruto, seleccionándose los clones más prometedores (basándose en la señal de unión a RANKL que se conserva a o próxima al nivel de OPG de tipo natural y la señal de unión a TRAIL que se reduce sustancialmente) para una clasificación secundaria.

La clasificación secundaria implica expresar los clones seleccionados en cultivos de 10 ml con un periodo de inducción de 3 h a 20-22°C. Se recogieron los extractos periplasmáticos de estas células, se filtraron como anteriormente y se sometieron a prueba a un intervalo de diluciones (generalmente desde 1:2 hasta 1:32) mediante ELISA tal como anteriormente. Se eligió la mejor de estas proteínas para la expresión y purificación a gran escala (0,5-2 L) tal como se describió anteriormente para OPG de tipo natural. Se cuantificaron las proteínas purificadas mediante la determinación de los coeficientes de extinción debido a los residuos de Trp y Tyr a A<sub>280 nm</sub>. Entonces, se sometieron a prueba las OVP a concentraciones equivalentes en comparación con la proteína OPG de tipo natural mediante ELISA tal como se describió anteriormente. Se sometieron a prueba las proteínas para determinar la unión en una serie de diluciones dobles partiendo generalmente de una concentración de 0,5 µM a 0,031 µM. La mayoría de las proteínas que están en formato monomérico muestran conservación de capacidad de unión a RANKL a o próxima a la de OPG de tipo natural, y reducción sustancial en la señal de unión a TRAIL. En la figura 2 se muestra un ejemplo de los resultados de un ELISA de este tipo. Se produjeron variantes con el perfil requerido de propiedades de unión a partir de todas las estrategias de selección.

**Ejemplo 6: Procedimientos de presentación en ribosomas y selección de repetición**

Se llevaron a cabo rondas posteriores de presentación en ribosomas y selección para mejorar adicionalmente algunas de las OVP mejores candidatas. Para lograr esto, se clonaron genes para estas OVP en el vector pEGX y se llevaron a cabo mutagénesis y presentación tal como se describió anteriormente, alterándose las cantidades molares de los antígenos solubles usados en la selección para forzar la presión de selección hacia una reducción adicional de unión a TRAIL y el mantenimiento de la unión a RANKL. La clasificación para obtener las mejores variantes se realizó tal como se describió anteriormente, aislándose mutantes adicionales con mejoras evidentes en las propiedades deseadas. En la figura 3 se muestran las secuencias de las mejores OVP seleccionadas mediante presentación en ribosomas de todas las rondas de selección. Se observaron mutaciones en el aa 115 dentro del bucle de Cys107-Cys118 en muchas de las variantes seleccionadas, ya que había varias mutaciones en los aminoácidos cerca de la zona que engloba a los aa 102-130. Esto sugiere que esta región, y el aa 115 en particular, es importante para la unión a TRAIL y que pueden tolerarse algunos cambios en este caso sin pérdida de la unión a RANKL.

**Ejemplo 7: Mutagénesis dirigida al sitio**

Se investigaron adicionalmente las ubicaciones de las mutaciones establecidas de manera precisa mediante

selección mediante presentación en ribosomas que demostraron ser beneficiosas para alterar la especificidad de OPG empleando mutagénesis dirigida al sitio en estas posiciones. Se tomaron muestras de cambios de aminoácidos adicionales en los residuos 115, 122 y 128 y se combinó la mutación L40S con algunas de las mutaciones en estas posiciones. Se diseñaron cebadores directos e inversos que codificaban para el residuo mutante particular, lo que permitió la amplificación por PCR de fragmentos anteriores y posteriores del gen de OVP mutante con regiones que sobresalientes complementarias. Se usó PCR para unir los dos segmentos de ADN entre sí mediante cebado durante 10 ciclos iniciales sin cebadores y luego 30 ciclos con cebadores en 5' y 3' flanqueantes para la amplificación del gen mutante completo con sitios de restricción para clonación.

Se empleó un sistema de expresión en mamíferos para permitir la producción de niveles superiores de la forma dimerica estable más relevante biológicamente de las proteínas para ensayos adicionales basados en células y de ELISA. Se clonaron los mutantes dirigidos al sitio y los genes (1-194) de la OVP mejor candidata seleccionada mediante presentación en ribosomas (los residuos 1-21 constituyen el péptido señal) en el vector de expresión en mamíferos pAPEX-3.Fc. Esto permite la expresión de las OVP como fusiones con un dominio de Fc humano para formar dímeros estables. También se añadió un marcador FLAG en el extremo C-terminal. Para la expresión se usan células HEK 293 EBNA. Se realizaron pases de estas células adherentes en medio DMEM complementado con Glutamax 2 mM (Invitrogen), suero bovino fetal al 10% y genecitina 200 µg/ml y se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Para la transfección transitoria usando lipofectamina (Invitrogen), se recogieron las células próximas a la confluencia y se usaron 5 x 10<sup>6</sup> células para sembrar una placa de cultivo tisular de 10 cm hasta un volumen de 10 ml. Se dejó que las células se adhieran y crecieran durante 24 h. Se mezclaron 24 mg de ADN del plásmido pAPEX-3.Fc que alberga la OVP de interés con 1,5 ml de DMEM. Se diluyeron 60 µl de lipofectamina en 1,5 ml de DMEM y se incubaron durante 5 min. a temperatura ambiente. Se mezclaron la lipofectamina y el ADN diluidos, se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente, y luego se añadieron gota a gota a la placa de cultivo. Tras el crecimiento durante la noche, se recogieron las células totales de una placa y se usaron para sembrar en una placa T175 en 25-30 ml. Una vez que las células estaban próximas a la confluencia (1-2 días), se sustituyó el medio DMEM que contenía suero por 25-30 ml de Ex-cell 293T (JRH Biosciences) complementado con Glutamax 4 mM. Tras 3-4 días, se recogieron los medios, se centrifugaron y se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm.

Para la purificación de las proteínas secretadas en los medios, se aplicaron los sobrenadantes a 1 ml de resina de afinidad a proteína A (Sigma) equilibrada con PBS. Se eluyeron las proteínas unidas a la proteína A a través de su parte Fc con Gly 0,1 M, pH 3 y esto se monitorizó a A<sub>280nm</sub>. Se neutraliza el eluato mediante diálisis inmediata frente a PBS. La proteína dializada se concentra hasta 0,5 ml y se somete a cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex 200. Se recoge el pico dominante que corresponde al dímero OVP-Fc y se confirma la identidad mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo anti-FLAG y secuenciación del extremo N-terminal que revela la OPG con el péptido señal que se ha procesado. La cromatografía de intercambio iónico de la OVP purificada mediante filtración en gel eluye un pico de proteína, lo que sugiere homogeneidad.

#### **Ejemplo 8: Clasificación de mutantes de OVP dirigidos al sitio**

Se sometieron a prueba proteínas OVP expresadas en mamíferos, purificadas, para determinar la unión a RANKL y TRAIL mediante ELISA. Se recubrieron pocillos con RANKL a 5 µg/ml o TRAIL a 10 µg/ml en PBS O/N a 4°C, se enjuagaron con PBS, se bloquearon con caseína al 0,5% en PBS a temperatura ambiente durante 2 h, luego se enjuagaron de nuevo con PBS. Se normalizaron las concentraciones de OVP que iban a someterse a prueba a aproximadamente 10 nM y luego se aplicaron 50 µl a los pocillos recubiertos con antígeno en diluciones dobles en serie sobre 6-7 pocillos durante 1 h. Todas las diluciones se realizaron en caseína al 0,25%. Todos los lavados entremedias de las incubaciones de unión son 3 veces en PBS/Tween al 0,05%, luego 3 veces con PBS. Se logra la detección de las OVP unidas con incubación de 50 µl de anticuerpo anti-FLAG a 1,2 mg/ml durante 20 min., luego con 50 µl de anticuerpo de cabra anti-conjugado de peroxidasa-ratón (BioRad) a 1:1500 durante 20 min. Se usa TMB como sustrato enzimático y luego se mide la señal de unión a A<sub>450nm</sub>. Se sometieron a prueba todas las OVP u OPG de tipo natural en el formato unido a Fc en el extremo C-terminal. En las figuras 4A y 4B se muestra un ejemplo de los resultados de un ELISA de este tipo comparando la unión de varias OVP a OPG(22-194) de tipo natural. Los datos muestran que OPG(22-194) de tipo natural se une tanto a RANKL como a TRAIL y que la mayor parte de las OVP mantienen la unión a RANKL a o próxima al nivel de la proteína de tipo natural. Todas las OVP sometidas a prueba en este caso muestran al menos cierta reducción de la unión a TRAIL en comparación con el tipo natural, mostrando 1R17 (I115M) seleccionando mediante presentación en ribosomas y los mutantes dirigidos al sitio en la posición 115 - 115D, 115G y 115R niveles muy bajos de unión a TRAIL. Para permitir comparaciones aproximadas de unión relativa de las OVP en ELISA, en la tabla 1 se resumen los valores de CE<sub>50</sub> de los datos. Se estimaron los valores de CE<sub>50</sub> representando gráficamente las respuestas de unión frente a la dosis de OVP en una escala logarítmica, realizándose extrapolaciones cuando los datos no alcanzan el intervalo de CE<sub>50</sub>. Algunas OVP mostraron un ligero aumento en la unión a RANKL, mientras que en algunas la unión a RANKL se redujo en hasta 3 veces.

#### **Ejemplo 9: Pruebas biológicas de OVP en un ensayo de apoptosis inducida por TRAIL de células HCT116.**

Se sometió a prueba adicionalmente la reducción de la actividad de unión a TRAIL de las OVP observada en ELISA

en un ensayo de apoptosis inducida por TRAIL de células HCT116 en presencia de estas OVP. Se hicieron crecer en cultivo estas células en medio DMEM que contenía suero bovino fetal (FCS) al 10% y penicilina-estreptomina al 1% a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron en placa células HCT116 en placas de 12 pocillos a 7,5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo en 1 ml de DMEM + FCS y se dejó que se unieran y crecieran durante 24 horas. Entonces se eliminó el medio de crecimiento y se sustituyó por 500 µl de medio reciente durante 1 hora a 37°C. Se añadieron OVP o OPG.Fc humana recombinante (RBcD Systems) a 0,56, 1,69, 5,6 y 11,2 nM y se incubaron las células durante 15 minutos adicionales a 37°C antes de la adición de TRAIL humana recombinante (R&D Systems) a 10 ng/ml (0,53 nM). Entonces, se incubaron las células durante 16 horas a 37°C antes de recogerse para puntuar el porcentaje de células apoptóticas en cada pocillo. Se sometió a prueba la dosis máxima de OVP en ausencia de TRAIL para determinar la toxicidad para las células. Se recogieron todas las células (unidas y flotantes) y se resuspendieron en 20 µl de yoduro de propidio (PI) 1 mg/ml, Triton X-100 al 0,1%, acetato de sodio al 0,1% en PBS. Se puntuó la apoptosis evaluando la morfología nuclear mediante microscopía de fluorescencia tras tinción de PI, puntuándose una célula como apoptótica si presenta uno o más de lo siguiente: marginación nuclear, condensación de cromatina o formación de cuerpos apoptóticos. Para evitar el sesgo, se puntuaron las muestras sin conocer el tratamiento administrado a la muestra. En las figuras 5A y 5B se muestran ejemplos de un ensayo de este tipo. En la figura 5A se muestra el efecto de las proteínas OPG de tipo natural donde se reduce la proporción de células que muestran apoptosis inducida por TRAIL desde más de aproximadamente el 70% hasta menos del 10% a una dosis de OPG de 5,6 nM. OPG(22-194).Fc parece ser eficaz de manera similar a la molécula de OPG.Fc de longitud completa (R&D systems), mientras que una versión unida a Fc en el extremo N-terminal de la proteína de tipo natural es algo menos eficaz. Todas las OVP mostradas en la figura 5B tienen poca o ninguna capacidad para inhibir la apoptosis inducida por TRAIL. Incluso a una dosis cuatro veces superior que la mostrada en este caso parece haber actividad de bloqueo de TRAIL insignificante con estas OVP seleccionadas.

#### **Ejemplo 10: Pruebas biológicas de OVP en un ensayo de diferenciación mediada por RANKL de células RAW264.7**

La línea celular RAW264.7 de monocitos tumorales inducida por el virus de la leucemia murina se diferencia en osteoclastos con la estimulación de RANKL. Para someter a prueba adicionalmente la capacidad de las OVP para unirse a RANKL y bloquear sus efectos biológicos mediados a través de la unión a RANK, se sometió a ensayo la diferenciación mediada por RANKL de las células RAW264.7 en presencia de OVP. Se hicieron crecer en cultivo células RAW264.7 en medio DMEM que contenía FCS al 5% y penicilina-estreptomina al 1% a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron células RAW264.7 (3 x 10<sup>3</sup> células/pocillo) en placas de 96 pocillos, en 100 µl de medio DMEM y FCS al 5%, y se dejaron crecer durante 24 horas. Se añadieron a cada pocillo 100 µl adicionales de medio que contenía RANKL humano 15 ng/ml (0,75 nM) (Roche) y OVP desde 0 hasta 0,5 nM y se incubaron las células 3 días adicionales. Se evaluó la formación de osteoclastos midiendo la actividad fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Las células se fijaron, se secaron y se añadieron 100 µl de tampón citrato 50 mM pH 4,6, tartrato 10 mM, p-nitrofenilfosfato 1 mg/ml para medir la actividad TRAP. Tras la incubación durante 30 min., se detuvieron las reacciones y se midió la absorbancia a 405 nm. En la figura 6A se muestra un ensayo de este tipo. A una dosis de 0,4 nM, todas las OVP mostraron que podían bloquear totalmente la diferenciación osteoclastica de las células RAW264.7 inducida por RANKL 0,75 nM. La figura 6B también muestra un ensayo de este tipo que implica OVP generadas mediante mutagénesis dirigida al sitio en aa 115. En este estrecho intervalo de dosis bajas puede observarse una discriminación de las actividades de unión a RANKL pese a que estas proteínas muestran todas ellas una pérdida sustancial de la capacidad para inhibir la apoptosis inducida por TRAIL (figura 5B). Debe observarse que algunas variantes mostraron actividad en este ensayo equivalente a o mejor que la de OPG. Por otra parte, algunas variantes que mostraron una reducción relativamente modesta en la unión a RANKL (tabla 1) mostraron una capacidad disminuida de manera significativa para bloquear la activación de osteoclastos mediada por RANKL.

#### **Ejemplo 11: Pruebas biológicas de OVP en un ensayo de resorción osteoclastica en tumor de células gigantes**

También se usó un ensayo de resorción osteoclastica en tumor de células gigantes como medio de medición del efecto biológico de las OVP que se unen a RANKL. Se trata de un ensayo (Atkins *et al.*, Bone 28:370-37 (2001)) para la osteoclastogénesis mediada por RANKL mediante la medición del nivel de formación de fosas de resorción en cortes de dentina. El ensayo puede usarse para demostrar la inhibición mediada por OPG de este efecto. Pueden cuantificarse tanto el número de fosas de resorción como el área de resorción. En la figura 7 se muestra un ejemplo de este ensayo que se somete a prueba varias OVP. Todos los constructos mostraron inhibición, mostrando la OPG de tipo natural una inhibición de aproximadamente el 55% y la mejor OVP, R23 (I115M, L40S) una inhibición del 75%.

#### **Ejemplo 12: Conclusiones de las pruebas biológicas de las OVP**

En la figura 8 se muestran las secuencias de OVP seleccionadas aisladas mediante selección de presentación en ribosomas. En la tabla 1 se muestran los resultados de los estudios de unión realizados en estas OVP y OVP adicionales mediante mutagénesis dirigida al sitio.

A partir de los datos mostrados en la tabla 1 está claro que las sustituciones en la posición de residuo 115 tienen un impacto principal sobre la capacidad de la OVP para unirse a TRAIL. En particular, la sustitución de residuos tales como Met, Gly, Asn, Asp y Glu en esta posición conduce a una reducción sustancial en la unión a TRAIL sin afectar significativamente a la unión a RANKL. Además, ninguna de las OVP generada con estas sustituciones mostró ninguna actividad en un ensayo de apoptosis inducida por TRAIL de células tumorales.

Las mutaciones en el residuo 122 también tienen un impacto sobre la capacidad de las OVP para unirse a TRAIL. Por ejemplo, los mutantes dobles 11115M, R122N y 1115M, R122E mostraron una afinidad de unión sustancialmente reducida por TRAIL.

Las mutaciones en el residuo 128 también tienen un impacto sobre la capacidad de las OVP para unirse a TRAIL. Por ejemplo, los mutantes dobles 11115M, F128L y 1115M, F128I mostraron una afinidad de unión sustancialmente reducida por TRAIL.

El mutante doble 1115M, L40S dio como resultado una inhibición del 75% de la osteoclastogénesis mediada por RANKL lo que destaca la importancia de las mutaciones en el residuo 40.

En la tabla 2 se proporciona un resumen de la actividad biológica de las OVP seleccionadas en los ensayos basados en células.

### Ejemplo 13: Modelización de la estructura tridimensional de OPG/OPV

OPG se clasifica como un miembro de la superfamilia de proteínas receptoras del TNF. Los miembros presentan de la manera más notable múltiples repeticiones de dominios ricos en cisteína de aproximadamente 40 aminoácidos, que están implicados en la unión al ligando. Los ligandos conocidos incluyen las proteínas TRAIL y RANKL estructuralmente homólogos.

No se ha publicado ninguna estructura tridimensional para OPG sola o en combinación con cualquiera de sus ligandos RANKL o TRAIL. Por tanto, se estableció un modelo estructural de los dos dominios ricos en cisteína en el fragmento amino terminal de OPG, en un intento por examinar el efecto probable de las mutaciones contenidas en las OVP preferidas.

A partir de una búsqueda mediante BLAST de la base de datos de estructuras proteicas de Brookhaven (PDB), se seleccionaron tres homólogos próximos de proteínas relacionadas con el receptor de TNF para los que se han determinado las estructuras tridimensionales, concretamente polipéptidos en archivos de pdb 1SG1 (complejo receptor-ligando entre el factor de crecimiento nervioso y el receptor de neurotrofina común p75), y 5 estructuras de receptor de muerte de los archivos 1D4V y 1DU3. Además, se añadió una estructura del archivo 1D0G. El miembro DR5 de la superfamilia de receptores de TNF (una proteína receptora de TRAIL) está representado en esta estructura complejada a un trímero de TRAIL, lo que se aprovechó para el diseño de modelos para el complejo OPG-ligando. La modelización se realizó usando el módulo Modeller dentro del paquete de software InsightII (Molecular Simulations Inc.). La estructura de la cadena de 1SG1 X se dividió además en un dominio N-terminal y uno C-terminal y los dos dominios se alinearon por separado con los moldes restantes, puesto que ambos dominios habían mostrado homología con OPG. En comparación con los otros tres moldes, parecían tener una región bisagra en la proteína que permitía que el dominio C-terminal esté desplazado. Se generaron cincuenta modelos para el fragmento de OPG de tipo natural usado como punto de partida para los experimentos de selección, así como para varias de las secuencias seleccionadas de OVP. Los modelos se clasificaron según puntuaciones de Modeller, y los modelos clasificados como 10 superiores se alinearon con DR5 en la estructura de 1D0G. Las regiones de contacto con el receptor del componente de TRAIL de esta estructura se usaron a su vez para modelizar una posible estructura de contacto de los receptores en RANKL, usando la estructura determinada de RANKL de ratón (archivo de pdb 1JTZ). Este procedimiento permitió una comparación de la OPG modelizada cuando se une a estructuras de TRAIL y RANKL. Se examinaron los modelos resultantes del complejo de OPG, en su estructura modelizada, con TRAIL o RANKL respectivamente, para determinar conflictos estéricos y posibles interacciones de unión.

Los modelos de la proteína OPG sugerían que la unión tanto de RANKL como de TRAIL podría producirse con la amplia superficie de contacto encontrada en las interacciones similares ligando – receptor de TNF (Hymowitz *et al.*, Mol. Cell 4:563-571 (1999); He *et al.*, Science 304: 870-875 (2004). Tal como se predijo a partir de la modelización, dos dominios de OPG de tipo receptor de TNF parecían estar implicados en la unión tanto a RANKL como a TRAIL (véanse las figuras 9 a 12), teniendo el dominio N-terminal contactos dentro de la región de los residuos 42 a 92 y el dominio C-terminal dentro de la región de los residuos 107 a 154. Se detectaron dos subregiones que parecían ser particularmente significativas - 107-118 y 120-142. Los contactos del dominio N-terminal con OPG parecían similares entre RANKL y TRAIL, por lo que sería más probable que las mutaciones en esta región dieran como resultado efectos en ambas interacciones de unión. Esto concuerda con los resultados de los experimentos de selección notificados en el presente documento, ya que esta región no era una en la que se encontró la mutación frecuente en OVP seleccionadas por la unión reducida a TRAIL pero no a RANKL.

5 Parece que hay una bisagra alrededor del puente disulfuro entre los residuos 124 a 142, lo que permite que el dominio C-terminal o bien se curve alejándose del ligando, limitando de ese modo las interacciones, o bien se curve hacia el ligando para formar más interacciones. Existen además diferencias en la conformación entre los dos ligandos examinados, TRAIL y RANKL. Los residuos Glu195 a Asn202 en TRAIL, en particular Asn199, Thr200 y Lys201 sobresalen como una región de bucle hacia el sitio de unión de OPG, poniendo en contacto posiblemente la OPG dentro de la región de los residuos Leu119 a Arg143 en OPG, con los residuos con los que entra en contacto con más probabilidad Lys120, His121, Arg122, Cys124, Pro125, Pro126, Gly127, Phe128, Cys141, Lys142.

10 Sin embargo, la colocación precisa de esta región parece estar guiada adicionalmente por contactos dentro de la región N-terminal de bucle que sobresale con la región bisagra, que está encerrada entre Cys107 y Cys118. Dentro de este bucle, Glu116 y Phe117 parecen poder formar conjuntos de interacciones favorables en al menos dos orientaciones. Las mutaciones en el residuo vecino Ile115, por ejemplo I115G o I115E, parecen predisponer hacia una orientación, lo que podría traducirse en una posición más abierta y de ese modo debilitar la interacción de los contactos de la región C-terminal con el bucle 195-202 de TRAIL mientras que se mantiene la interacción con RANKL. Sin embargo, en estos estudios se encontró que algunos cambios en el residuo 115 alteraban la unión a RANKL así como a TRAIL. Estos cambios fueron aquellos en los que el aminoácido sustituido tenía una cadena lateral más larga en combinación con una carga positiva o negativa. Esto sugiere que el residuo 115 también está implicado en entrar en contacto con RANKL o que cambios desfavorables en este residuo alteran contactos importantes realizados por residuos vecinos tales como 116.

20 La modelización de los cambios dentro de la región 120-142 sugiere que las alteraciones en uno cualquiera de varios residuos en esta región podrían influir en la unión a TRAIL específicamente, y se han detectado varios cambios de este tipo entre las OVP examinadas.

25 Dentro de la región de unión N-terminal, los residuos 42-92 de OPG forman una amplia región de contacto tanto con RANKL como con TRAIL. Ambas estructuras de ligando parecen similares en su superficie de contacto. Puesto que no era una región en la que se observaron mutaciones que conducían a una pérdida de unión a TRAIL en el trabajo descrito en el presente documento, se concluye que los residuos en esta región pueden contribuir en realidad más débilmente a la unión a TRAIL, o que las mutaciones en esta región afectan a la unión a TRAIL y RANKL en paralelo, de modo que no se seleccionaron los cambios en esta zona durante la estrategia de clasificación. No obstante, cambios conformacionales sutiles debidos a mutaciones en esta zona o en una cercana pueden alterar posiblemente las propiedades de la molécula de manera favorable para sus efectos mediados por RANKL, tal como se ha sugerido anteriormente para un cambio conformacional debido a la mutación del residuo 115. De interés particular es un cambio en el residuo 40 identificado entre las OVP examinadas. Puesto que este se encuentra adyacente a esta región de contacto, es probable que los cambios en los residuos cercanos puedan influir sutilmente en la forma de este bucle, predisponiendo de ese modo preferentemente la unión hacia RANKL a expensas de la unión a TRAIL. Es probable que tales cambios sutiles en la forma puedan lograrse mediante la mutación en otros residuos de OPG que pueden afectar al plegado de este dominio.

40 Cualquier comentario de documentos, leyes, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente para el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe considerarse como una admisión de que cualquiera o todos estos contenidos forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada una de las reivindicaciones de esta solicitud.

Tabla 1: Estudios de unión de OVP

n.º de aumento por extrapolación en la unión = CE50 inferior; ( ) reducción en la unión – CE50 superior		
Variantes	Veces de cambio de RANKL con respecto al tipo natural	Veces de cambio de TRAIL con respecto al tipo natural
I115V	1,5	(4)
I115L	1,75	(4,3)
I115M	1,2	(25)
I115W	(1,4)	(5)
I115A	2,25	(2,5)
I115G	2,1	(>125#)
I115N	(1,1)	(390#)
I115S	(1,4)	(3,1)
I115R	(2,3)	(50#)
I115K	(60)	Sin unión
I115Y	1,1	(3)
I115D	1,5	(>125)
I115E	(2,25)	(>250)

(continuación)

n.º de aumento por extrapolación en la unión = CE50 inferior; ( ) reducción en la unión – CE50 superior		
Variantes	Veces de cambio de RANKL con respecto al tipo natural	Veces de cambio de TRAIL con respecto al tipo natural
N102D	1,1	(1)
I115M, L40S	1,1	(>250)
I115M, N139D	(1,75)	(60)
I115T, K51R	(1,75)	(0,8)
I115M plus:		
R122G	1	(12,5)
R122N	(1,1)	(>250)
R122Q	2,5	(3)
R122S	1,5	(3,5)
R122D	(6)	(23)
R122E	(1,2)	(>250)
I115M plus:		
F128L	1,2	(250#)
F128A	1,2	(2)
F128S	1	(50)
F128T	(3,3)	(7)
F128I	(2,1)	(250#)
I115T, K51R, R111H	1,5	(7,5)
I115T, K51R, S167G	1,5	(15)

Tabla 2: Resumen de la actividad biológica en ensayos basados en células

Proteína variante de OPG	Ensayo de apoptosis inducida por TRAIL*	Ensayo de células RAW	Ensayo de resorción de GCT
OPG de tipo natural	+++++	+++++	+++
OPG (R&D systems)	+++++	++++	
I115T, K51R	+++	+++++	
I115M	++	+++	++
I115M, N139D	++/+++	+++++	++
I115T, K51R, S167G	+++	+++++	
I115T, F128V	++	+++++	
I115V	++++	+++++	+++
I115M, L40S	++	+++++	++++
I115D	+	++++	
I115G	+	+++++	
I115R	-	++	
I115E	-	+	

\*- menor capacidad para bloquear la apoptosis inducida por TRAIL  
+++++ mayor capacidad de bloquear la apoptosis inducida por TRAIL

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> EvoGenix Ltd
- <120> Proteínas variantes de osteoprotegerina
- <130> 504034
- 5 <150> Documento US 60/635.722
- <151> 13-12-2004
- <160> 49
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 10 <211> 2291
- <212> ADN
- <213> Ser humano
- <220>
- <221> CDS
- 15 <222> (252)..(1454)
- <400> 1

ES 2 378 456 T3

ctttccgccc	cagccctgaa	agcgттаacc	ctggagcttt	ctgcacaccc	cccgaccgct	60
cccgcccaag	cttcctaaaa	aagaaaggтg	caaagtttgг	tccaggatag	aaaaatgact	120
gatcaaaggc	aggcgatact	tcctgttgcc	gggacgctat	atataacgtg	atgagcgcac	180
gggctgcgga	gacgcaccgg	agcgctcgcc	cagccgcccг	ctccaagccc	ctgaggtttc	240
cggggaccac	a atg aac aag ttg ctg tgc tgc gcg ctc gtg ttt ctg gac	290				
	Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp					
	1 5 10					
atc tcc att aag tgg acc acc cag gaa acg ttt cct cca aag tac ctt	338					
Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu						
15 20 25						
cat tat gac gaa gaa acc tct cat cag ctg ttg tgt gac aaa tgt cct	386					
His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro						
30 35 40 45						
cct ggt acc tac cta aaa caa cac tgt aca gca aag tgg aag acc gtg	434					
Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val						
50 55 60						
tgc gcc cct tgc cct gac cac tac tac aca gac agc tgg cac acc agt	482					
Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser						
65 70 75						
gac gag tgt cta tac tgc agc ccc gtg tgc aag gag ctg cag tac gtc	530					
Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val						
80 85 90						
aag cag gag tgc aat cgc acc cac aac cgc gtg tgc gaa tgc aag gaa	578					
Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu						
95 100 105						

ggg	cgc	tac	ctt	gag	ata	gag	ttc	tgc	ttg	aaa	cat	agg	agc	tgc	cct	626
Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys	His	Arg	Ser	Cys	Pro	
110					115					120					125	
cct	gga	ttt	gga	gtg	gtg	caa	gct	gga	acc	cca	gag	cga	aat	aca	gtt	674
Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	
				130					135						140	
tgc	aaa	aga	tgt	cca	gat	ggg	ttc	ttc	tca	aat	gag	acg	tca	tct	aaa	722
Cys	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	
			145					150						155		
gca	ccc	tgt	aga	aaa	cac	aca	aat	tgc	agt	gtc	ttt	ggt	ctc	ctg	cta	770
Ala	Pro	Cys	Arg	Lys	His	Thr	Asn	Cys	Ser	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	
		160						165					170			
act	cag	aaa	gga	aat	gca	aca	cac	gac	aac	ata	tgt	tcc	gga	aac	agt	818
Thr	Gln	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr	His	Asp	Asn	Ile	Cys	Ser	Gly	Asn	Ser	
	175					180				185						
gaa	tca	act	caa	aaa	tgt	gga	ata	gat	ggt	acc	ctg	tgt	gag	gag	gca	866
Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Cys	Gly	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Cys	Glu	Glu	Ala	
190					195					200					205	
ttc	ttc	agg	ttt	gct	ggt	cct	aca	aag	ttt	acg	cct	aac	tgg	ctt	agt	914
Phe	Phe	Arg	Phe	Ala	Val	Pro	Thr	Lys	Phe	Thr	Pro	Asn	Trp	Leu	Ser	
				210					215					220		
gtc	ttg	gta	gac	aat	ttg	cct	ggc	acc	aaa	gta	aac	gca	gag	agt	gta	962
Val	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asn	Ala	Glu	Ser	Val	
			225					230					235			
gag	agg	ata	aaa	cgg	caa	cac	agc	tca	caa	gaa	cag	act	ttc	cag	ctg	1010
Glu	Arg	Ile	Lys	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Gln	Glu	Gln	Thr	Phe	Gln	Leu	
		240					245					250				
ctg	aag	tta	tgg	aaa	cat	caa	aac	aaa	gac	caa	gat	ata	gtc	aag	aag	1058
Leu	Lys	Leu	Trp	Lys	His	Gln	Asn	Lys	Asp	Gln	Asp	Ile	Val	Lys	Lys	
	255					260					265					
atc	atc	caa	gat	att	gac	ctc	tgt	gaa	aac	agc	gtg	cag	cgg	cac	att	1106
Ile	Ile	Gln	Asp	Ile	Asp	Leu	Cys	Glu	Asn	Ser	Val	Gln	Arg	His	Ile	
270					275					280					285	
gga	cat	gct	aac	ctc	acc	ttc	gag	cag	ctt	cgt	agc	ttg	atg	gaa	agc	1154
Gly	His	Ala	Asn	Leu	Thr	Phe	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Met	Glu	Ser	
				290					295					300		
tta	ccg	gga	aag	aaa	gtg	gga	gca	gaa	gac	att	gaa	aaa	aca	ata	aag	1202
Leu	Pro	Gly	Lys	Lys	Val	Gly	Ala	Glu	Asp	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Lys	
			305					310					315			
gca	tgc	aaa	ccc	agt	gac	cag	atc	ctg	aag	ctg	ctc	agt	ttg	tgg	cga	1250
Ala	Cys	Lys	Pro	Ser	Asp	Gln	Ile	Leu	Lys	Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Arg	
		320					325					330				
ata	aaa	aat	ggc	gac	caa	gac	acc	ttg	aag	ggc	cta	atg	cac	gca	cta	1298
Ile	Lys	Asn	Gly	Asp	Gln	Asp	Thr	Leu	Lys	Gly	Leu	Met	His	Ala	Leu	
	335					340					345					

ES 2 378 456 T3

aag cac tca aag acg tac cac ttt ccc aaa act gtc act cag agt cta 1346  
 Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu  
 350 355 360 365

aag aag acc atc agg ttc ctt cac agc ttc aca atg tac aaa ttg tat 1394  
 Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr  
 370 375 380

cag aag tta ttt tta gaa atg ata ggt aac cag gtc caa tca gta aaa 1442  
 Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys  
 385 390 395

ata agc tgc tta taactggaaa tggccattga gctgtttcct cacaattggc 1494  
 Ile Ser Cys Leu  
 400

gagatcccat ggatgagtaa actgtttctc aggcacttga ggctttcagt gatattcttc 1554

tcattaccag tgactaattt tgccacaggg tactaaaaga aactatgatg tggagaaagg 1614

actaacatct cctccaataa accccaaatg gttaatccaa ctgtcagatc tggatcgтта 1674

tctactgact atattttccc ttattactgc ttgcagtaat tcaactggaa attaaaaaaaa 1734

aaaaactaga ctccattgtg ccttactaaa tatgggaatg tctaacttaa atagctttga 1794

gatttcagct atgctagagg cttttattag aaagccatat ttttttctgt aaaagttact 1854

aatatatctg taacactatt acagtattgc tatttatatt cattcagata taagatttgt 1914

acatattatc atcctataaa gaaacgggat gacttaattt tagaaagaaa attatattct 1974

gtttattatg acaaatgaaa gagaaaatat atatttttaa tggaaagttt gtagcatttt 2034

tctaataagg actgccatat ttttctgtgt ggagtatttt tataatttta tctgtataag 2094

ctgtaatatc attttataga aaatgcatta tttagtcaat tgtttaatgt tggaaaacat 2154

atgaaatata aattatctga atattagatg ctctgagaaa ttgaatgtac cttattttaa 2214

agattttatg gttttataac tatataaatg acattattaa agttttcaaa ttatttttta 2274

aaaaaaaaaa aaaaaaa 2291

<210> 2 .

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Ser humano

<400> 2

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile  
 1 5 10 15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp  
 20 25 30

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

ES 2 378 456 T3

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala  
 275 280 285

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly  
 290 295 300

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys  
 305 310 315 320

Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn  
 325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser  
 340 345 350

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr  
 355 360 365

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu  
 370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys  
 385 390 395 400

Leu

<210> 3

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Rata

<400> 3

ES 2 378 456 T3

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile  
1 5 10 15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp  
20 25 30

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

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro  
50 55 60

Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys



305					310					315					320
Pro	Ser	Glu	Gln	Leu	Leu	Lys	Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Arg	Ile	Lys	Asn
				325					330					335	
Gly	Asp	Gln	Asp	Thr	Leu	Lys	Gly	Leu	Met	Tyr	Ala	Leu	Lys	His	Leu
			340					345					350		
Lys	Ala	Tyr	His	Phe	Pro	Lys	Thr	Val	Thr	His	Ser	Leu	Arg	Lys	Thr
		355					360					365			
Ile	Arg	Phe	Leu	His	Ser	Phe	Thr	Met	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Gln	Lys	Leu
	370					375					380				
Phe	Leu	Glu	Met	Ile	Gly	Asn	Gln	Val	Gln	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys
385					390					395					400

Leu

<210> 4

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Ratón

<400> 4

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile  
 1 5 10 15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp  
 20 25 30

Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr  
 35 40 45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro  
 50 55 60

Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys  
 65 70 75 80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu  
 85 90 95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr  
 100 105 110

ES 2 378 456 T3

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser  
 115 120 125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Pro Asn Thr Val Cys Lys Lys  
 130 135 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys  
 145 150 155 160

Arg Lys His Thr Asp Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys  
 165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr  
 180 185 190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg  
 195 200 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val  
 210 215 220

Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile  
 225 230 235 240

Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu  
 245 250 255

Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln  
 260 265 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ala  
 275 280 285

Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly  
 290 295 300

Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys  
 305 310 315 320

Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn  
 325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu  
 340 345 350

Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr  
355 360 365

Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu  
370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys  
385 390 395 400

Leu

<210> 5

<211> 173

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Proteína variante humana

<400> 5

ES 2 378 456 T3

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
 20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
 35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
 50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
 65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe  
 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
 115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
 130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
 145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
 165 170

<210> 6

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína variante humana

<400> 6

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

<210> 7

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 378 456 T3

<220>

<223> Proteína variante humana

<400> 7

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

5 <210> 8

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína variante humana

5 <400> 8

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Asp Asp Glu Glu Thr Ser His  
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
 20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
 35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
 50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
 65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe  
 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Glu Val Gln Ala  
 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
 115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
 130 135 140

Cys Ser Asp Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
 145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
 165 170

<210> 9

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 9

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Gly Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170



ES 2 378 456 T3

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
 20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
 35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
 50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
 65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Thr Glu Phe  
 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Val Gly Val Val Gln Ala  
 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
 115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
 130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
 145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
 165 170

<210> 11

<211> 173

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Proteína variante humana

<400> 11

ES 2 378 456 T3

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

<210> 12

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína variante humana

ES 2 378 456 T3

<400> 12

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
 20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
 35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
 50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
 65 70 75 80

Asp Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe  
 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
 115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
 130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
 145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
 165 170

<210> 13

5 <211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 378 456 T3

<223> Proteína variante humana

<400> 13

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Arg Gln His  
 20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
 35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
 50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
 65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Thr Glu Phe  
 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
 115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
 130 135 140

Cys Gly Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
 145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
 165 170

5 <210> 14

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 378 456 T3

<220>

<223> Proteína variante humana

<400> 14

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

5

<210> 15

<211> 173

<212> PRT

ES 2 378 456 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína variante humana

<400> 15

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asp Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 16

<211> 173

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína variante humana

5 <400> 16

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Ala Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Ala Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 17

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 17

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Thr Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 18

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 18

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Gln Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Glu Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 19

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 19

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asp Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 20

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 20

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Ser Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 21

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 21

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Leu Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 22

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 22

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Trp Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 23

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 23

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Phe Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 24

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 24

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ala Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 25

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 25

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Gly Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 26

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 26

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 27

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 27

```

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His
1          5          10          15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His
          20          25          30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr
          35          40          45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro
          50          55          60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His
65          70          75          80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Asn Glu Phe
          85          90          95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala
          100          105          110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe
          115          120          125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
          130          135          140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His
145          150          155          160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys
          165          170

```

<210> 28

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 28

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Gln Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 29

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 29

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ser Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 30

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 30

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Arg Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 31

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 31

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
 20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
 35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
 50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
 65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Lys Glu Phe  
 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
 115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
 130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
 145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
 165 170

<210> 32

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 32

```

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His
 1           5           10           15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His
          20           25           30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr
          35           40           45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro
 50           55           60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His
 65           70           75           80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Tyr Glu Phe
          85           90           95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala
          100          105          110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe
 115           120           125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
 130           135           140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His
 145           150           155           160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys
          165           170
    
```

<210> 33

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 33

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Asp Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 34

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 34

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Glu Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 35

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 35

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Gly Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 36

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 36

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Asn Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 37

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 37

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Gln Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 38

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 38

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Ser Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr\_Gln Lys  
165 170

<210> 39

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 39

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Asp Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 40

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 40

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Glu Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 41

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 41

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
 20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
 35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
 50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
 65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu Gly Val Val Gln Ala  
 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
 115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
 130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
 145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
 165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 42

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 42

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

<210> 43

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 43

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Pro Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 44

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 44

```

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His
1          5          10          15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His
          20          25          30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr
          35          40          45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro
          50          55          60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His
65          70          75          80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe
          85          90          95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala
          100          105          110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe
          115          120          125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
          130          135          140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His
145          150          155          160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys
          165          170

```

<210> 45

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 45

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Thr Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 46

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 46

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

ES 2 378 456 T3

<210> 47

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Proteína variante humana

<400> 47

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His  
1 5 10 15

Gln Leu Ser Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His  
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr  
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro  
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His  
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly His Tyr Leu Glu Met Glu Phe  
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe  
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn  
130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His  
145 150 155 160

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys  
165 170

ES 2 378 456 T3

<210> 48

<211> 51

<212> ADN

<213> Cebador

5 <400> 48 51

tattactcgc ggcccagccg gccatgaaca agttgctgtg ctgcgcgctc g 51

<210> 49

<211> 50

<212> ADN

10 <213> Cebador

<400> 49

catctttata atctgcccgc gctaagcagc ttatctttac tgattggacc 50

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de osteoprotegerina (OPG) de tipo natural en la que la secuencia de la variante comprende al menos una sustitución de aminoácido dentro de la región englobada por los aminoácidos 102-130 en comparación con la secuencia de la OPG de tipo natural tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, conservando la variante la afinidad de unión por RANKL pero mostrando afinidad de unión reducida por TRAIL en comparación con la OPG de tipo natural.
2. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 1, que comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición de residuo 102, 111, 115, 122, 128 ó 130.
3. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 2, que comprende al menos una sustitución dentro de la estructura de bucle que comprende los residuos 107-118.
- 10 4. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 3, que comprende una sustitución en el residuo 115.
5. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 4, en la que Ile en la posición 115 se sustituye por Thr, Met, Val, Asp, Gly, Ser o Arg.
6. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 2, en la que Arg en la posición 122 se sustituye por Gly, Gln, Ser, Asn o Glu.
- 15 7. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 2, en la que Phe en la posición 128 se sustituye por Val, Ala, Leu, Ile o Ser.
8. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 2, en la que Val en la posición 130 se sustituye por Glu o Ala.
9. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 1, que comprende al menos dos sustituciones en la región englobada por los residuos 102-130.
- 20 10. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 9, que comprende al menos dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- (i) R122N y 1115M;
- (ii) R122E y 1115M;
- 25 (iii) F128S y 1115M;
- (iv) F128I y 1115M; y
- (v) F128L y 1115M.
11. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 1, que comprende al menos una sustitución en la región englobada por los residuos 122-130 y al menos una sustitución adicional fuera de esta región.
- 30 12. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 11, en la que la sustitución adicional se produce en uno cualquiera o más de los residuos 31, 40, 51, 100, 155, 167 ó 168.
13. Variante de OPG de tipo natural según la reivindicación 11, en la que la sustitución adicional se produce en uno cualquiera o más de los residuos Gln21, Glu22, Thr23, Phe24, Pro25, Pro26, Lys27, Tyr28, Leu29, His30, Tyr31, Asp32, Glu33, Glu34, Thr35, Ser36, His37, Gln38, Asp42, Lys43, Pro45, Pro46, Thr48, Lys51, Gln52, His53, Cys54, Thr55, Ala56, Lys57, Trp58, Lys59, Thr60, Val61, Ala63, Pro64, Pro66, Asp67, His68, Tyr69, Asp72, Ser73, Trp74, Thr76, Ser77, Asp78, Glu79, Leu81, Tyr82, Ser84, Pro85, Val86, Lys88, Glu89, Leu90, Tyr92, Val93, Lys94, Gln95, Glu96, Asn98, Arg99, Thr100, His101, Val131, Gln132, Ala133, Gly134, Thr135, Pro136, Glu137, Arg138, Val141, Lys143, Arg144, Cys145, Pro146, Asp147, Gly148, Phe149, Phe150, Ser151, Asn152, Glu153, Thr154, Ser155, Ser156, Lys157, Ala158, Pro159, Cys160, Arg161, Lys162, His163, Thr164, Asn165, Cys166, Ser167, Val168, Phe169, Gly170, Leu171, Leu172, Leu173, Thr174, Gln175, Lys176, Gly177, Asn178, Ala179, Thr180, His181, Asp182, Asn183, Ile184, Cys185, Ser186, Gly187, Asn188, Ser189, Glu190, Ser191, Thr192, Gln193, Lys194, Cys195, Gly196, Ile197, Asp198, Val199, Thr200 o Leu201.
- 40 14. Variante de OPG de tipo natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende una cualquiera o más de las sustituciones mostradas en la tabla 1.

15. Variante de OPG de tipo natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la proteína variante de OPG está conjugada a un polipéptido.
16. Dímero o multímero que comprende al menos dos variantes de OPG de tipo natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 5 17. Polinucleótido aislado que codifica para una variante de OPG de tipo natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 10 18. Método para reducir la afinidad de unión de OPG por TRAIL, comprendiendo el método modificar al menos un aminoácido seleccionado de los residuos 102, 111, 115, 122, 128, 130 de OPG de tipo natural para producir una variante de OPG de tipo natural o fragmento de la misma para producir una proteína variante de OPG, y someter a prueba la proteína variante de OPG para determinar la afinidad de unión por TRAIL.
19. Uso de una variante de OPG de tipo natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la fabricación de un medicamento para inhibir o reducir un efecto biológico mediado a través de la interacción de RANK y RANKL en una célula.
20. Variante de OPG de tipo natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en terapia.
- 15 21. Uso de una variante de OPG de tipo natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario.
22. Uso de una variante de OPG de tipo natural según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad cardiovascular.

20

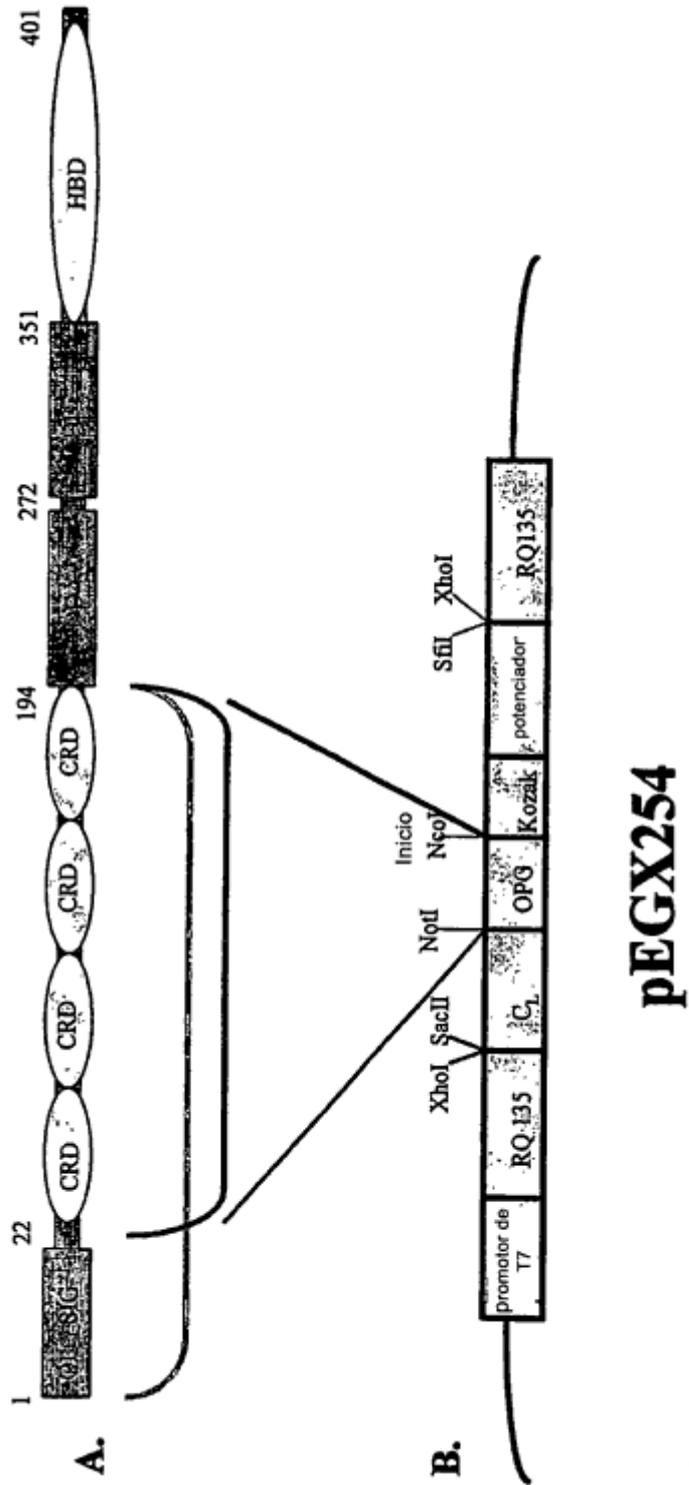


Figura 1

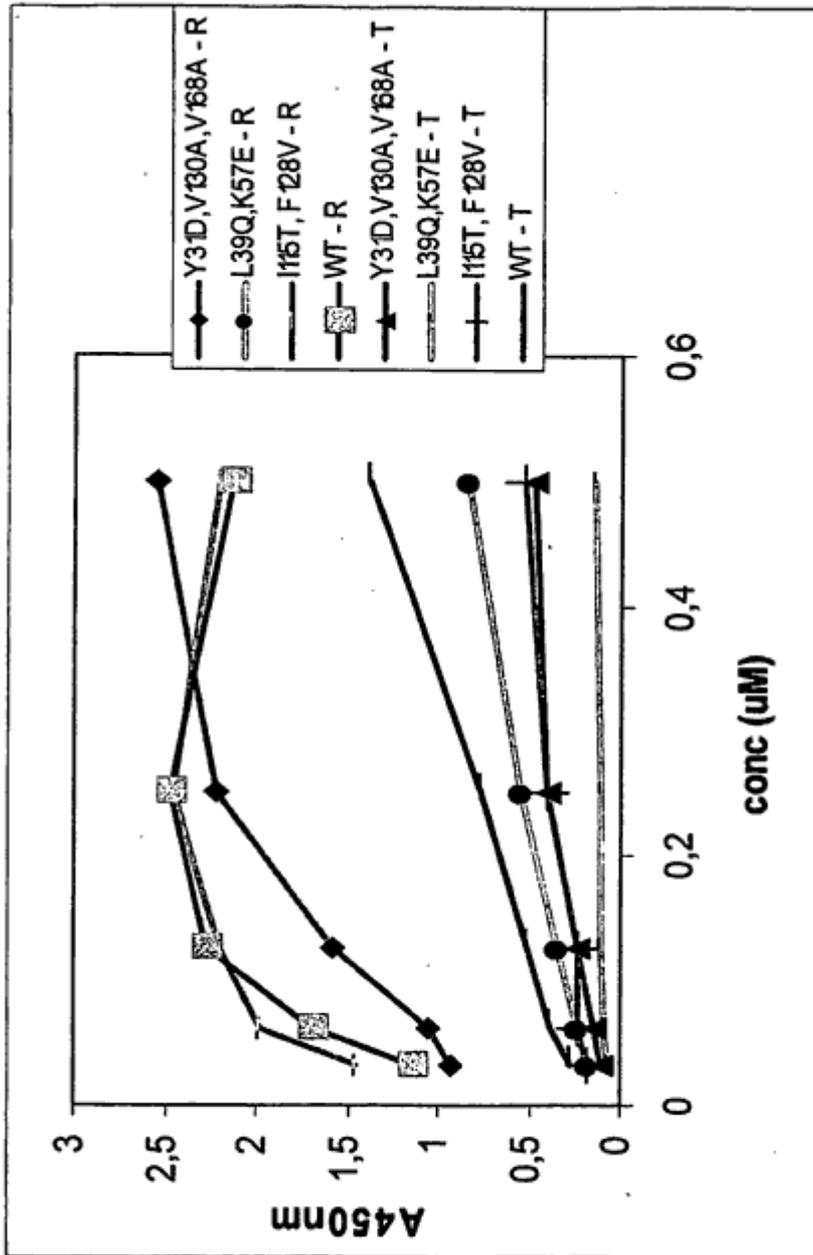


Figura 2

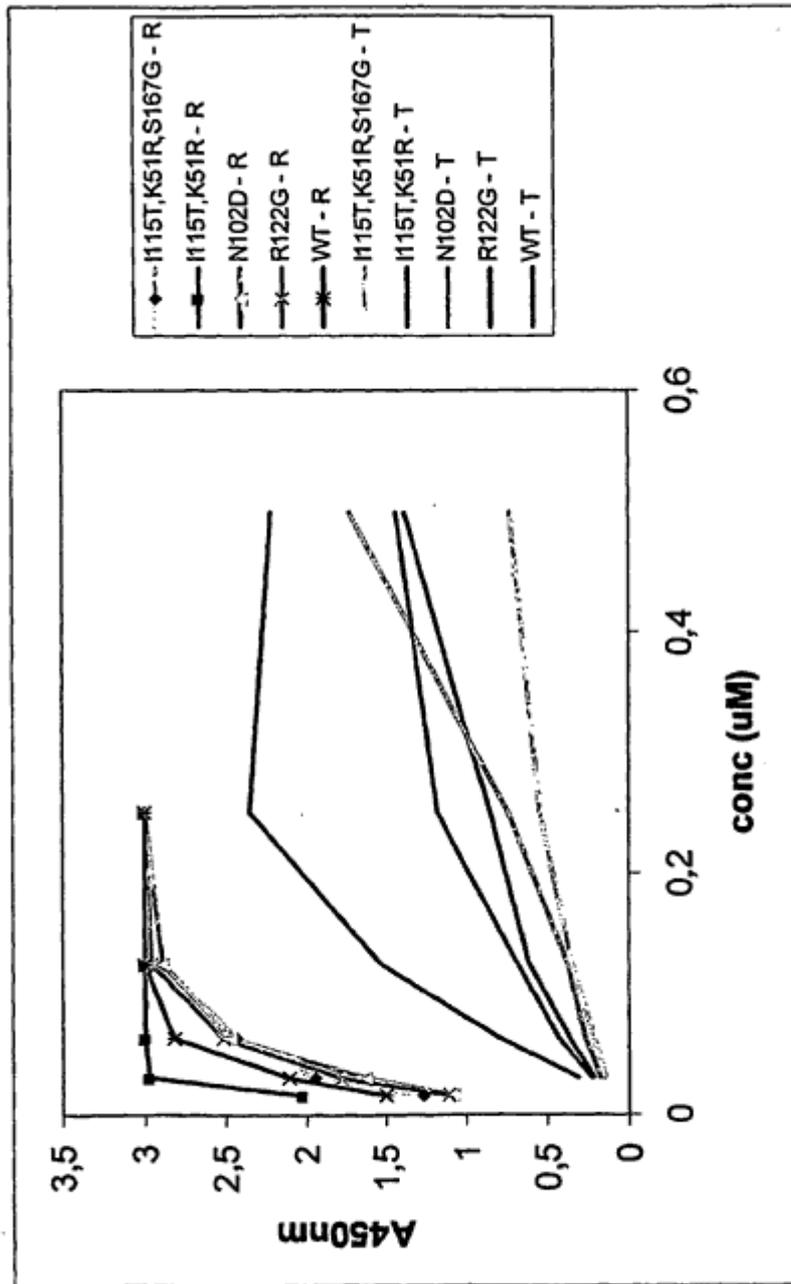


Figura 3

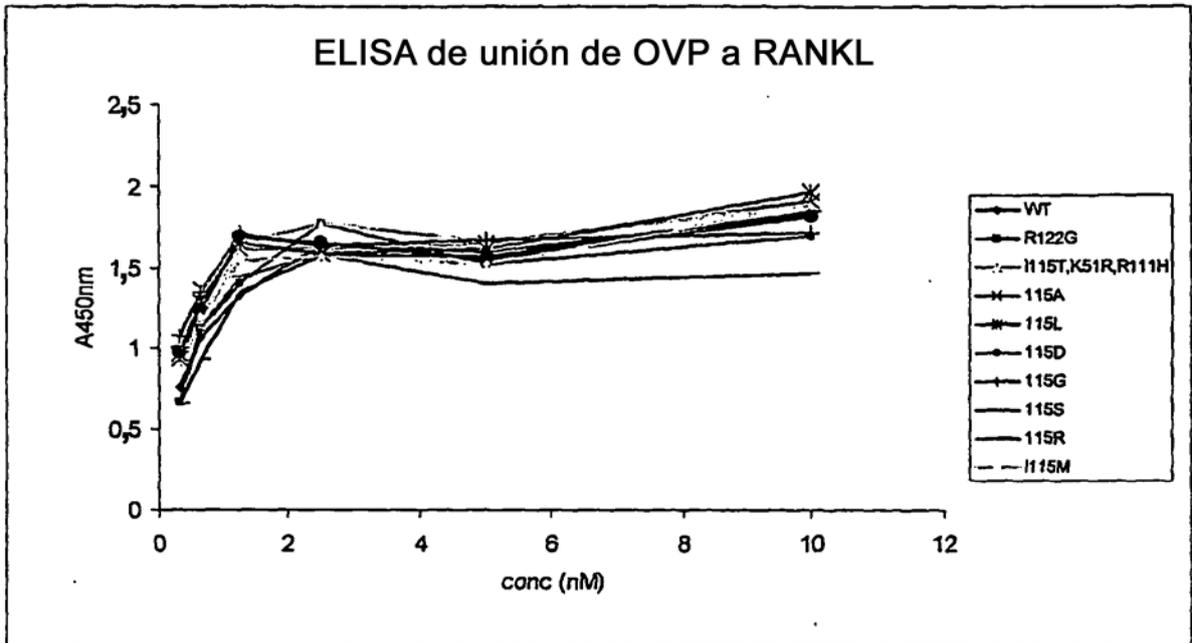


Figura 4A

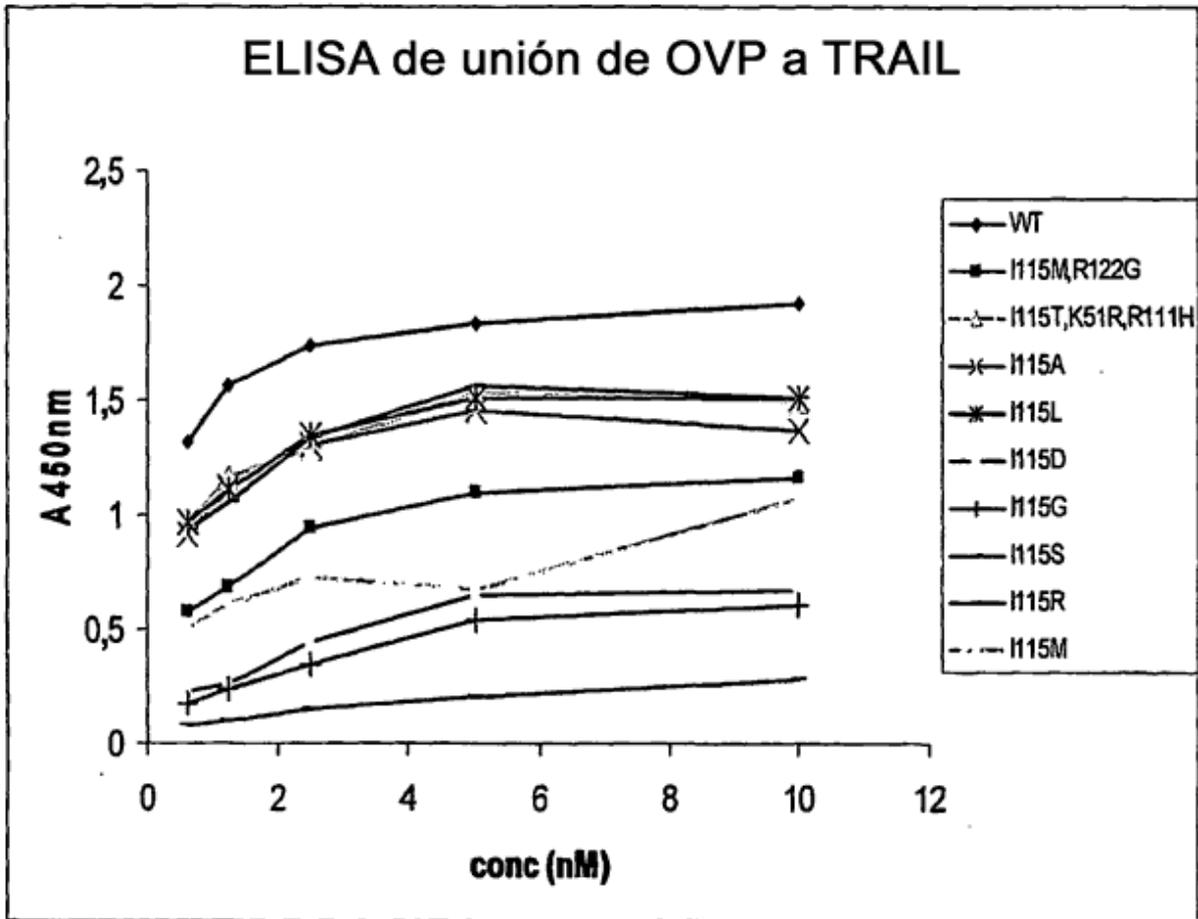


Figura 4B

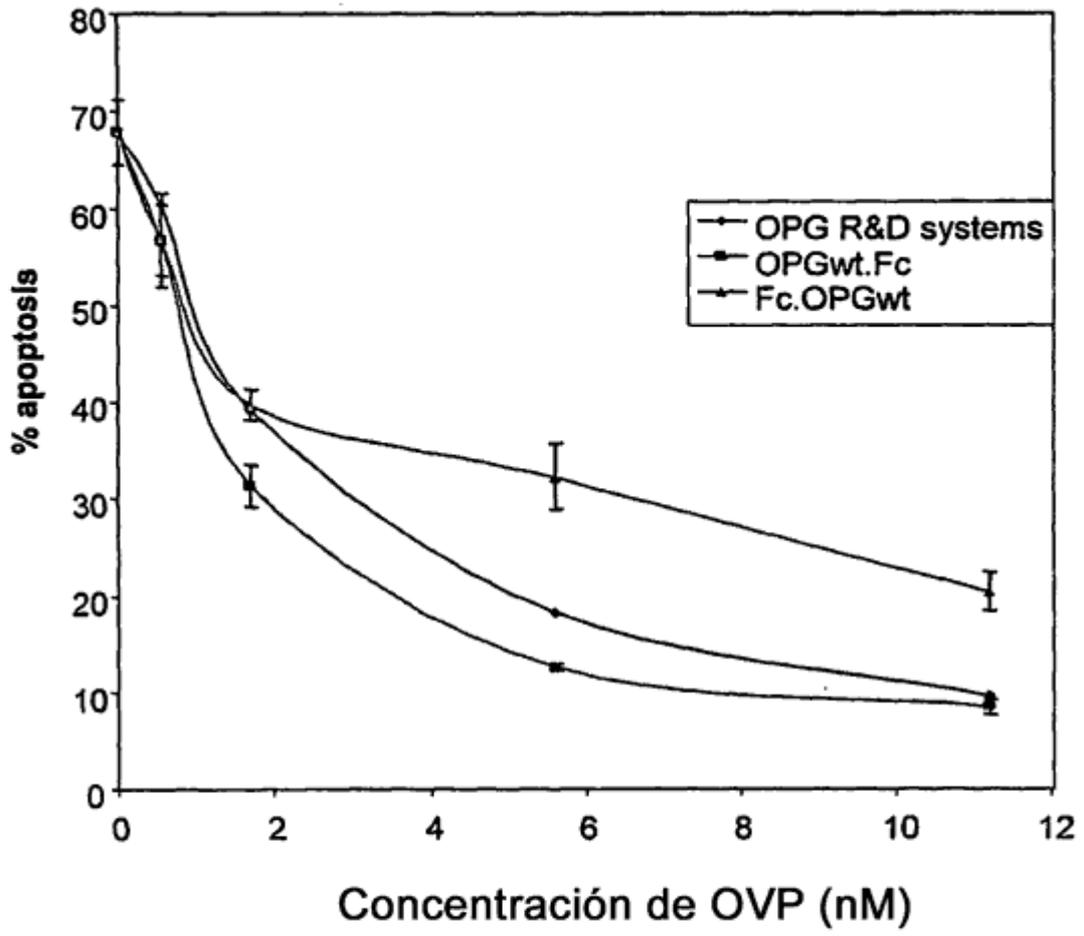


Figura 5A

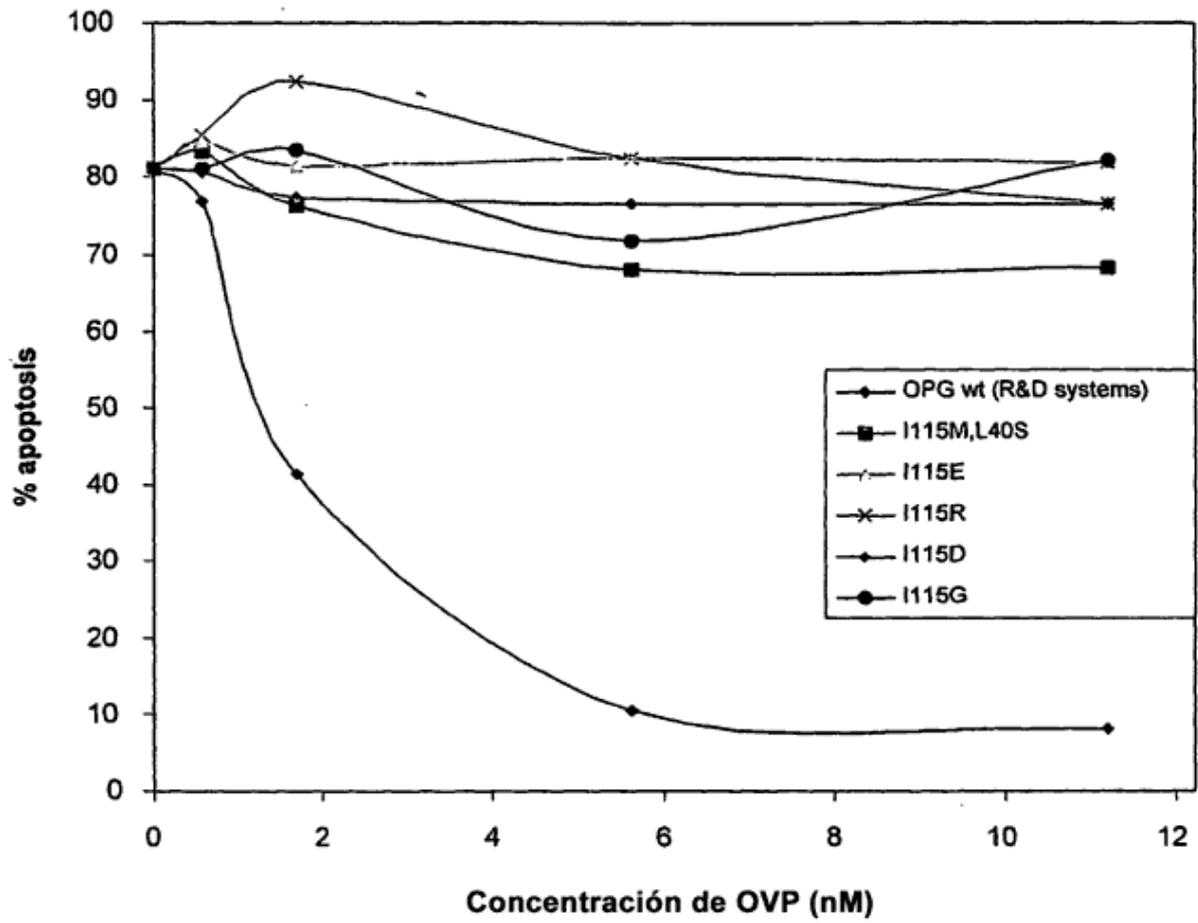


Figura 5B

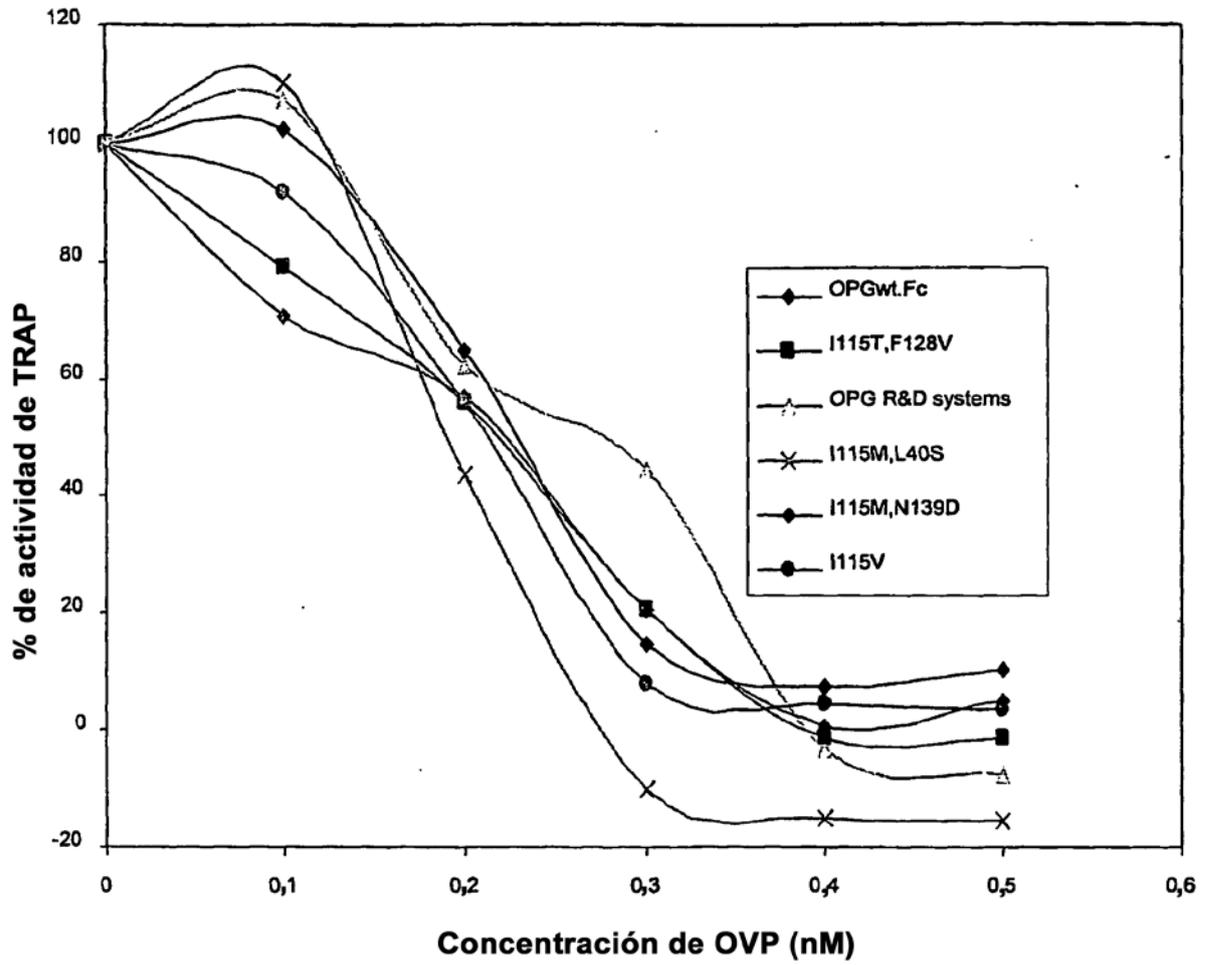


Figura 6A

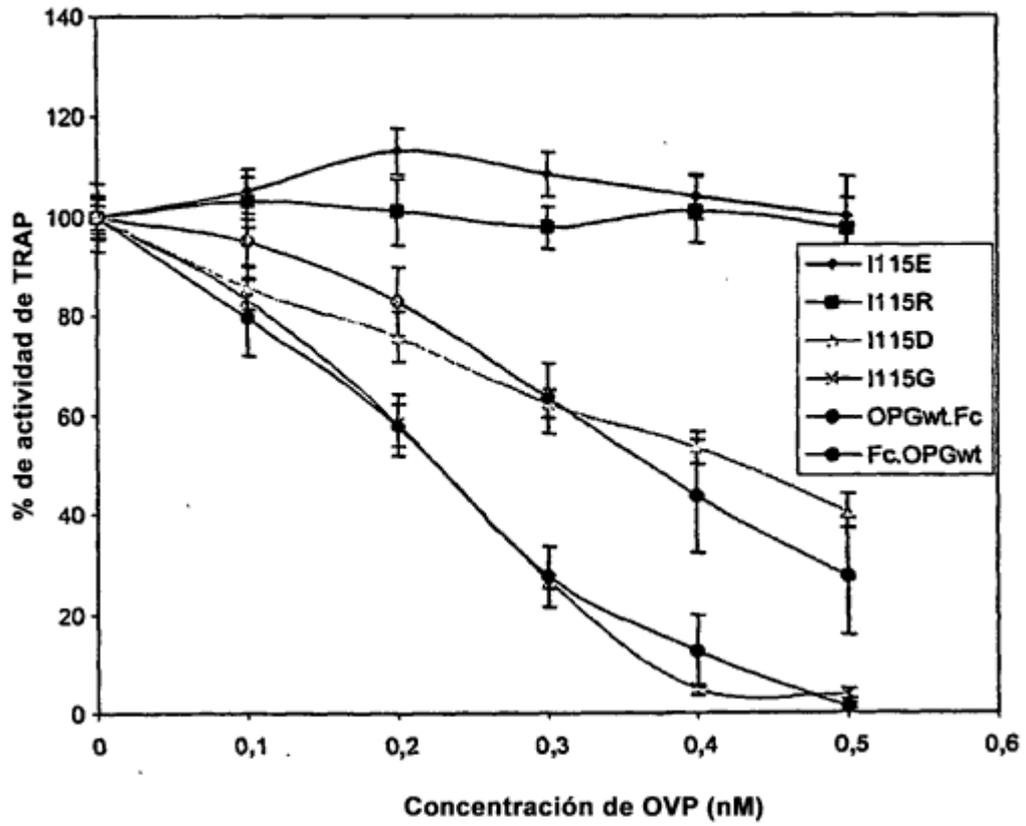
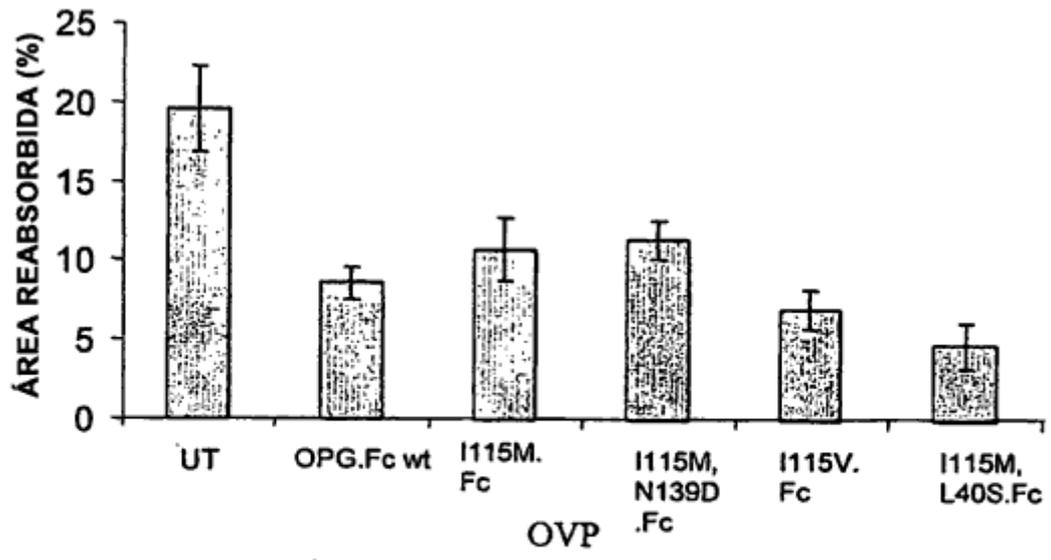


Figura 6B



**Figura 7**

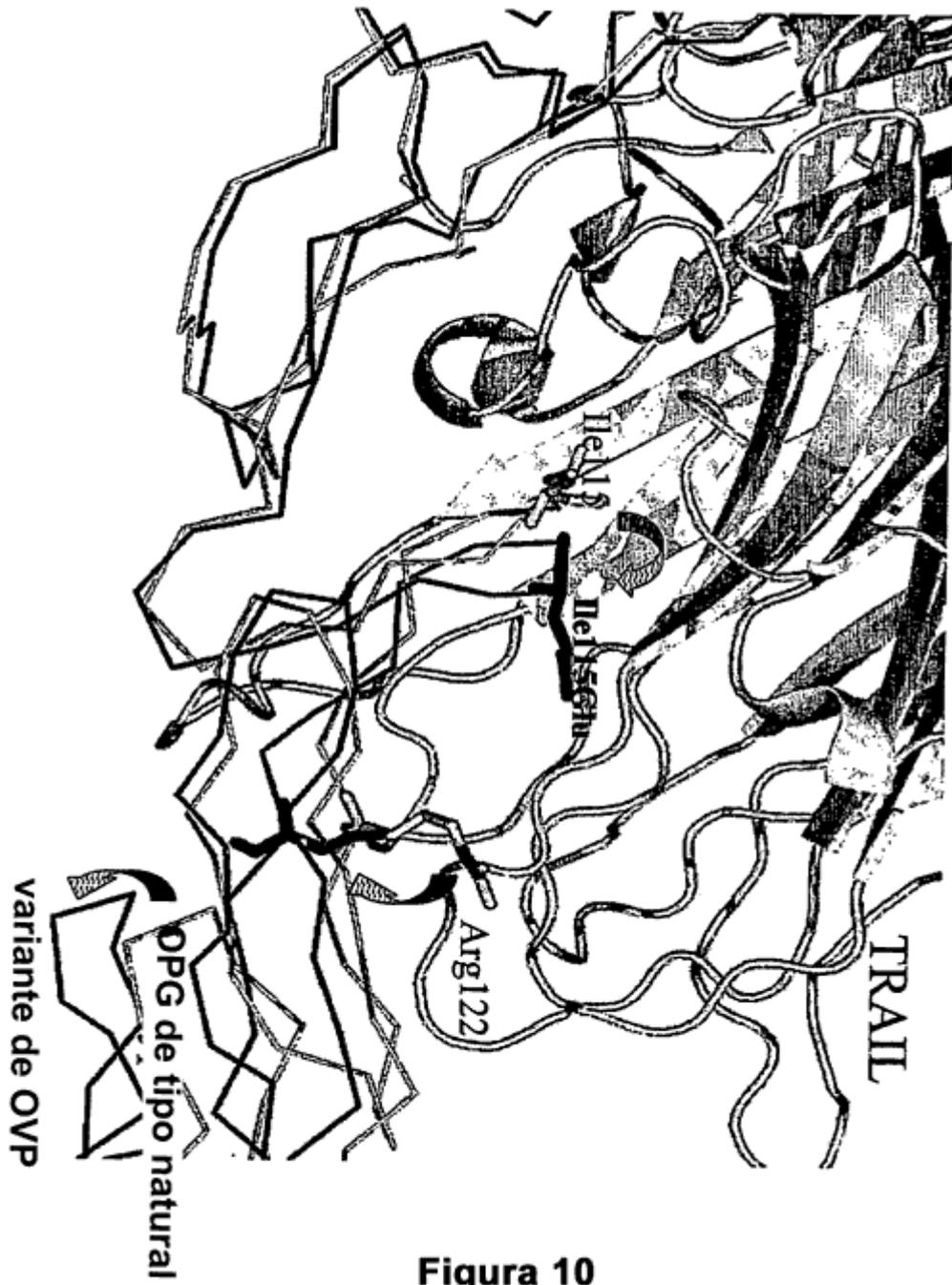
ETFPKYLHYDEETSHQLLCKCPPTLYLKHCTAKKTKTVCAPCPDHYYTDSWRTSDE	ORGHt.seq
.....	OVPIR34.seq
.....	OVPIR17.seq
.....	OVFR2R32.seq
.....	OVFR2R39.seq
.....	OVFR2T7.seq
.....	OVFR2T39.seq
.....	OVFR2eR36.SEQ
.....	OVPIR34QR30.seq
.....	OVPIR34QT42.seq
.....	OVFR113.seq
.....	OVFR4.SEQ
.....	OVFR23b.SEQ
.....	OVFR12c.SEQ
.....	
CLYCSPVCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLKHRSCPFGFVVAQTPE	ORGHt.seq
.....	OVPIR34.seq
.....	OVPIR17.seq
.....	OVFR2R32.seq
.....	OVFR2R39.seq
.....	OVFR2T7.seq
.....	OVFR2T39.seq
.....	OVFR2eR36.SEQ
.....	OVPIR34QR30.seq
.....	OVPIR34QT42.seq
.....	OVFR113.seq
.....	OVFR4.SEQ
.....	OVFR23b.SEQ
.....	OVFR12c.SEQ

Figura 8



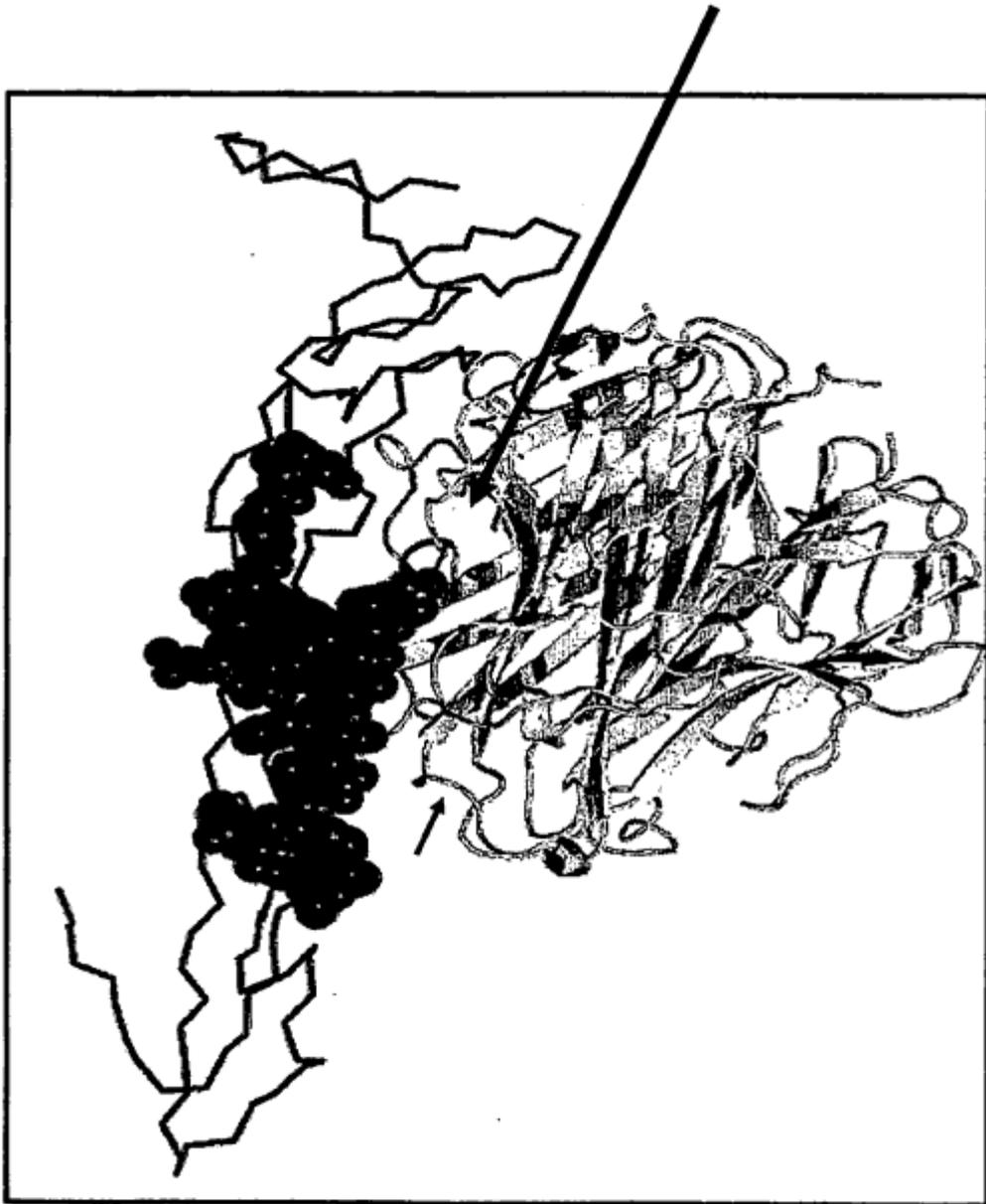


**Figura 9**





**Figura 11**



**Figura 12**