

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 689**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 14/475** (2006.01)  
**C07K 14/51** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)  
**G01N 33/74** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04720380 .7**  
96 Fecha de presentación: **12.03.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1608399**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Complejo de esclerostina y nogina o cordina, y agentes que modulan la formación de dicho complejo**

30 Prioridad:  
**14.03.2003 US 455253 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.04.2012**

73 Titular/es:  
**UCB MANUFACTURING, INC. A company  
incorporated under the laws of the State of  
Delaware  
755 Jefferson St.  
Rochester, NY 14623, US**

72 Inventor/es:  
**WINKLER, David G.;  
LATHAM, John;  
SKONIER, John;  
SHPEKTOR, Diana;  
HAYES, Trenton y  
GEOGHEGAN, James**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

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

ES 2 379 689 T3

## DESCRIPCIÓN

Complejo de esclerostina y nogina o cordina, y agentes que modulan la formación de dicho complejo

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a complejos aislados, anticuerpos monoclonales, productos farmacéuticos y métodos para identificar agentes.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 Se producen cambios en la masa ósea en distintas fases a lo largo de la vida de un individuo (por ejemplo, Riggs, West J. Med. 154: 63-77, 1991). La primera fase se produce tanto en hombres como en mujeres y prosigue hasta la obtención de una masa ósea máxima. Esta primera fase se consigue a través del crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondrales y del crecimiento radial debido a una tasa de aposición periosteal. La segunda fase comienza alrededor de la edad de 30 años para el hueso trabecular (huesos planos tales como las vértebras y la pelvis) y a aproximadamente la edad de 40 años para el hueso cortical (por ejemplo, huesos largos que se encuentran en los miembros) y continúa hasta la vejez. Esta fase se caracteriza por una pérdida lenta de hueso y se produce tanto en hombres como en mujeres. En mujeres, también se produce una tercera fase de pérdida de hueso, muy probablemente debido a las deficiencias de estrógeno post-menopáusicas. Durante esta fase solamente, las mujeres pueden perder un 10% adicional de masa ósea del hueso cortical y un 25% del compartimento trabecular (véase Riggs, anteriormente).

25 La pérdida de contenido mineral óseo puede estar causada por una amplia diversidad de afecciones y puede dar como resultado problemas médicos significativos. Por ejemplo, la osteoporosis es una enfermedad debilitante en seres humanos caracterizada por disminuciones notables en la masa ósea esquelética y la densidad mineral, deterioro estructural de hueso incluyendo degradación de la microarquitectura ósea, y aumentos correspondientes en la fragilidad del hueso y la susceptibilidad a fracturas en individuos afectados. La osteoporosis en seres humanos está precedida por una osteopenia clínica (densidad mineral ósea que es superior a una desviación típica pero inferior a 2,5 desviaciones típicas por debajo del valor medio para hueso adulto joven), una afección que se encuentra en aproximadamente 25 millones de personas en los Estados Unidos. Otros 7-8 millones de pacientes en los Estados Unidos han sido diagnosticados con osteoporosis clínica (definida como un contenido mineral óseo superior a 2,5 desviaciones típicas por debajo del de hueso adulto joven maduro). La osteoporosis es una de las enfermedades más costosas para el sistema de atención sanitaria, suponiendo un coste de decenas de miles de millones de dólares anualmente en los Estados Unidos. Además de los costes relacionados con la atención sanitaria, los cuidados residenciales a largo plazo y la pérdida de días de trabajo se suman a los costes financieros y sociales de esta enfermedad. En todo el mundo aproximadamente 75 millones de personas están en riesgo de osteoporosis.

45 La frecuencia de la osteoporosis en la población humana aumenta con la edad, y entre los caucásicos la osteoporosis es predominante en mujeres (que comprenden el 80% del conjunto de pacientes de osteoporosis en los Estados Unidos). La fragilidad y susceptibilidad aumentada a fracturas de huesos esqueléticos en las personas de edad avanzada se ve agravada por el mayor riesgo de caídas accidentales en esta población. Se describen más de 1,5 millones de fracturas de huesos relacionadas con osteoporosis en los Estados Unidos cada año. Las caderas, muñecas y vértebras fracturadas están entre las lesiones más comunes asociadas con la osteoporosis. Las fracturas de cadera en particular son extremadamente incómodas y costosas para el paciente, y para las mujeres se correlacionan con altas tasas de mortalidad y morbilidad.

50 Aunque la osteoporosis se ha considerado como un aumento en el riesgo de fractura debido a una masa ósea disminuida, ninguno de los tratamientos actualmente disponibles para trastornos esqueléticos puede aumentar sustancialmente la densidad ósea de los adultos. Existe una clara percepción entre muchos médicos de que son necesarios fármacos que pudieran aumentar la densidad ósea en adultos, particularmente en los huesos de la muñeca, la columna espinal y la cadera, que estén en riesgo de osteopenia y osteoporosis.

60 Las estrategias actuales para la prevención de la osteoporosis pueden ofrecer ciertos beneficios a los individuos pero no pueden asegurar la resolución de la enfermedad. Estas estrategias incluyen una actividad física moderada (particularmente actividades llevando peso) con el inicio de la edad avanzada, incluyendo un nivel de calcio adecuado en la dieta, y evitar el consumo de productos que contengan alcohol o tabaco. Para pacientes que presentan osteopenia u osteoporosis clínica, los fármacos y estrategias terapéuticas actuales prevalentes están dirigidos a reducir la pérdida adicional de masa ósea por inhibición del proceso de absorción ósea, un componente natural del proceso de remodelación ósea que se produce de forma constitutiva.

65 Por ejemplo, actualmente se están prescribiendo estrógenos para retrasar la pérdida de hueso. Sin embargo, existe cierta controversia sobre si existe algún beneficio a largo plazo para los pacientes y si existe algún efecto en

absoluto en los pacientes de más de 75 años de edad. Además, se cree que el uso de estrógenos aumenta el riesgo de cáncer de mama y endometrial. La calcitonina, osteocalcina con vitamina K o altas dosis de calcio dietético con o sin vitamina D, también se han sugerido para mujeres post-menopáusicas. Sin embargo, las altas dosis de calcio pueden tener con frecuencia efectos secundarios gastrointestinales desagradables, y los niveles de calcio séricos y urinarios deben controlarse continuamente (por ejemplo, Khosla y Riggs, Mayo Clin. Proc. 70: 978-982, 1995).

Otras estrategias terapéuticas para la osteoporosis incluyen bisfosfonatos (por ejemplo, Fosamax™, Actonel™, Bonviva™, Zometa™, olpadronato, neridonato, skelid, bonefos), hormona paratiroidea, calcilíticos, calcimiméticos (por ejemplo, cinacalef), estatinas, esteroides anabólicos, sales de estroncio y lantano y fluoruro sódico. Sin embargo, dichos agentes terapéuticos están asociados con frecuencia con efectos secundarios indeseables (por ejemplo, la calcitonina y los esteroides pueden causar náuseas y provocar una reacción inmune, los bisfosfonatos y el fluoruro sódico pueden inhibir la reparación de fracturas, aun cuando la densidad ósea aumenta modestamente) que pueden impedir su uso eficaz (véase Khosla y Riggs, anteriormente).

Las estrategias terapéuticas limitadas puestas en práctica en la actualidad para tratar una afección asociada con una mineralización ósea excesiva o insuficiente, tal como osteoporosis u otros trastornos caracterizados por pérdida de mineralización ósea, implican un fármaco que module (es decir, aumente o disminuya de una forma estadísticamente significativa) la masa ósea. En particular, ninguna estrategia actual estimula o aumenta terapéuticamente el crecimiento de nueva masa ósea. La presente invención proporciona composiciones y métodos que pueden utilizarse para aumentar la mineralización ósea y que, por lo tanto, pueden usarse para tratar una amplia diversidad de afecciones en las que sea deseable aumentar la masa ósea. La presente invención también ofrece otras ventajas relacionadas.

#### Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un complejo aislado que comprende:

(i) un polipéptido de esclerostina que es capaz de unirse específicamente a BMP-5 y/o BMP-6 y

(ii) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de Cordina y un polipéptido de Nogina, siendo dicho polipéptido capaz de unirse específicamente a BMP-2 y/o BMP-4 y/o BMP-7, en el que el complejo es incapaz de unirse a un polipéptido miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-5 y BMP-6.

La presente invención proporciona además un complejo aislado que comprende un polipéptido de esclerostina y un polipéptido de cordina en asociación específica, en el que:

(a) el polipéptido de esclerostina es capaz de unirse a un primer miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6 y BMP-7; y

(b) el polipéptido de cordina es capaz de unirse a un segundo miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4 y BMP-7;

en el que el complejo es incapaz de unirse al primer miembro de la superfamilia de TGF-beta.

La invención proporciona además un complejo aislado que comprende un polipéptido de esclerostina y un polipéptido de nogina en asociación específica, en el que:

(a) el polipéptido de esclerostina es capaz de unirse a un primer miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-5 y BMP-6; y

(b) el polipéptido de nogina es capaz de unirse a un segundo miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4, BMP-7 y GDF-5;

en el que el complejo es incapaz de unirse al primer y segundo miembros de la superfamilia de TGF-beta.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona un método para identificar un agente que module la unión entre un polipéptido de esclerostina y un segundo polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos de nogina y cordina, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto, en ausencia y presencia de un agente candidato, el polipéptido de esclerostina y el segundo polipéptido en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la asociación específica de un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y

(b) determinar un nivel de complejo que está presente, en el que una diferencia en el nivel de complejos en presencia del agente candidato respecto al nivel en ausencia del agente candidato indica que el agente modula la unión entre el polipéptido de esclerostina y el segundo polipéptido.

En ciertas realizaciones adicionales del método que se acaba de describir, el agente candidato disminuye la asociación específica de proteínas para formar un complejo, y en ciertas otras realizaciones adicionales el agente candidato aumenta la asociación específica de proteínas para formar un complejo, y en ciertas otras realizaciones adicionales el agente candidato estabiliza la asociación específica de proteínas para formar un complejo. En ciertas otras realizaciones adicionales el agente candidato se selecciona de una molécula orgánica, un producto natural, un péptido, un oligosacárido, un ácido nucleico, un lípido, un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, y una célula. En ciertas otras realizaciones adicionales el agente candidato se obtiene a partir de una biblioteca de compuestos, seleccionándose dicha biblioteca de acuerdo con ciertas realizaciones todavía adicionales de una biblioteca de péptidos aleatoria, una biblioteca de productos naturales, una biblioteca combinatoria, una biblioteca de oligosacáridos y una biblioteca de presentación en fago.

En ciertas otras realizaciones se proporciona un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento modulan la formación de complejo entre:

- (i) esclerostina; y
- (ii) Cordin o Nogina.

También se proporciona un artículo de composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria, en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable. Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes en referencia a la descripción detallada y a los dibujos adjuntos siguientes. Además, se exponen diversas referencias en la presente memoria que describen en más detalle ciertos aspectos de esta invención.

#### Breve descripción de varias vistas del dibujo o dibujos

La Figura 1 es una ilustración esquemática que compara la secuencia de aminoácidos de Dan humana; Gremlin humana; Cerberus humana y Beer humana. Las flechas indican la cadena principal de cisteína.

La Figura 2 muestra la unión de los antagonistas de BMP Cordin (Fig. 2A) y Nogina (Fig. 2B) a esclerostina humana recombinante, según se determina por resonancia de plasmón superficial (SPR).

La Figura 3 muestra la unión del antagonista de BMP Nogina a esclerostina en un ensayo de inmunoprecipitación.

La Figura 4 muestra la unión competitiva a esclerostina por BMP-6 y Nogina.

La Figura 5 muestra la unión competitiva a esclerostina por BMP-6 y Cordin.

La Figura 6 muestra la unión de BMP-6 humana a esclerostina humana y a esclerostina de rata.

La Figura 7 muestra efectos de anticuerpos anti-BMP-6 sobre la unión de BMP-6 a esclerostina.

La Figura 8 muestra la exploración de anticuerpos anti-esclerostina para la inhibición de la interacción de unión de BMP-6 con esclerostina.

La Figura 9 muestra la inhibición por un anticuerpo policlonal anti-esclerostina de la unión de esclerostina por Nogina o Cordin.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención procede de la sorprendente observación de interacciones de unión específicas entre ciertas combinaciones emparejadas de miembros de la amplia familia de proteínas de unión a TGF-beta entre sí, en lugar de con miembros de la superfamilia de proteínas de TGF-beta diferente, para formar complejos de primeras y segundas proteínas de unión a TGF-beta en asociación específica.

Por consiguiente, y como se describe en más detalle a continuación, de acuerdo con ciertos aspectos de la presente invención se identifica por primera vez un complejo aislado que comprende una proteína de unión a TGF-beta y una proteína antagonista de BMP en asociación específica, en el que (i) la proteína de unión a TGF-beta comprende un polipéptido de esclerostina que es capaz de unirse específicamente a un primer polipéptido miembro de la superfamilia de TGF-beta que se selecciona de un polipéptido de BMP-5 y un polipéptido de BMP-6, y (ii) la proteína antagonista de BMP se selecciona de un polipéptido de Cordin y un polipéptido de Nogina, siendo la proteína antagonista de BMP capaz de unirse específicamente a al menos un segundo polipéptido miembro de la superfamilia de TGF-beta que se selecciona de un polipéptido de BMP-2, un polipéptido de BMP-4 y un polipéptido de BMP-7, y en el que el complejo es incapaz de unirse al primer polipéptido miembro de la superfamilia de TGF-beta.

La identificación de dichas interacciones de unión específicas entre proteínas particulares proporciona parejas de unión que pueden explotarse provechosamente, por ejemplo, para explorar para agentes que modulen (es decir, aumenten o disminuyan de una forma estadísticamente significativa) la formación de complejos por dichas proteínas en asociación específica.

Debería entenderse que las moléculas de interés particular incluyen proteínas o péptidos (por ejemplo, anticuerpos, compañeros de unión recombinantes, péptidos con una afinidad de unión deseada), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, moléculas de ácido nucleico quiméricas y análogos de ácido nucleico tales como PNA); y compuestos

orgánicos o inorgánicos. Entre las moléculas especialmente significativas a las que se hace referencia en la presente memoria están el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-beta), que incluye cualquier miembro conocido o novedoso de la superfamilia de TGF-beta, que también incluye proteínas morfogénicas óseas (BMP); receptores de TGF-beta, que debería entenderse que se refieren al receptor específico para un miembro particular de la superfamilia de TGF-beta (incluyendo proteínas morfogénicas óseas (BMP)); y proteínas de unión a TGF-beta, que debería entenderse que se refieren a una proteína con una afinidad de unión específica por un miembro o un subconjunto de miembros particular de la superfamilia de TGF-beta (incluyendo proteínas morfogénicas óseas (BMP)). Los ejemplos específicos de proteínas de unión a TGF-beta incluyen proteínas codificadas por las SEC ID N°: 1, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 (véase, por ejemplo, Bailemans et al., 2002 Dev. Biol. 250: 231; Schmitt et al., 1999 J. Orthopaed. Res. 17: 269; Khalil, 1999 Microbes Infect. 1: 1255; Miyazono et al., 1993 Growth Factors 8: 11; von Bubnoff et al., 2001 Dev. Biol. 239:1; Koli et al., 2001 Microsc. Res. Tech. 52: 354; Ebara et al., 2002 Spine 27(16 Suppl. 1): S10; Bondestam, 2002, Ligands & Signaling Components of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Family, Helsinki University Biomedical Dissertations N° 17). Por consiguiente, por ejemplo, la inhibición de la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas de TGF-beta y proteínas morfogénicas óseas (BMP) debería entenderse que se refiere a moléculas que permiten la activación de TGF-beta o proteínas morfogénicas óseas (BMP), o que permiten la unión de miembros de la familia de TGF-beta incluyendo proteínas morfogénicas óseas (BMP) a sus receptores respectivos, por eliminación o prevención de la unión de TGF-beta a proteína de unión a TGF. Dicha inhibición puede lograrse, por ejemplo, por moléculas que inhiban la unión de la proteína de unión a TGF-beta a miembros específicos de la superfamilia de TGF-beta.

El término vector se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de la proteína deseada. El vector debe incluir elementos promotores de la transcripción que están unidos operativamente al gen o genes de interés. El vector puede estar compuesto por ácidos desoxirribonucleicos ("ADN"), ácidos ribonucleicos ("ARN") o una combinación de los dos (por ejemplo, un ADN-ARN quimérico). Opcionalmente, el vector puede incluir una secuencia de poliadenilación, uno o más sitios de restricción, así como uno o más marcadores de selección tales como neomicina fosfotransferasa o higromicina fosfotransferasa. Además, dependiendo de la célula hospedadora seleccionada y del vector empleado, también pueden incorporarse en los vectores descritos en la presente memoria otros elementos genéticos tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ácidos nucleicos adicionales, potenciadores, secuencias que confieren capacidad de inducción de la transcripción y marcadores de selección.

Una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica una proteína de unión a TGF que se ha separado del ADN genómico de una célula eucariota es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. La molécula de ácido nucleico aislada puede ser ADN genómico, ADNc, ARN o estar compuesta al menos en parte por análogos de ácido nucleico.

Un polipéptido aislado es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Dentro de ciertas realizaciones, una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado si aparece nominalmente como una sola banda en un gel de SDS-PAGE con tinción de Azul de Coomassie. El término "aislado", cuando se refiere a moléculas orgánicas, significa que los compuestos tienen una pureza superior al 90% utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, NMR, punto de fusión).

La esclerosteosis es un término que se aplicó por Hansen (1967) (Hansen, H. G., Sklerosteose. En: Opitz, H.; Schmid, F., Handbuch der Kinderheilkunde. Berlín: Springer (pub.) 6 1967. Págs. 351-355) a un trastorno similar a la hiperostosis cortical generalizada de van Buchem, pero que difiere posiblemente en el aspecto radiológico de los cambios óseos y en la presencia de sindactilia cutánea asimétrica de los dedos índice y medio en muchos casos. La mandíbula tiene una apariencia cuadrada poco habitual en esta afección.

Los anticuerpos humanizados son proteínas recombinantes en las que se han transferido regiones determinantes de complementariedad de anticuerpos monoclonales de donantes (tales como murino, conejo) de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina del donante a un dominio variable aceptor (tal como humano). Como se usa en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo es una porción de un anticuerpo tal como F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab y similar. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-proteína de unión a TGF-beta se une con un epítipo de proteína de unión a TGF-beta.

El término fragmento de anticuerpo también incluye cualquier proteína sintética u obtenida por ingeniería genética que actúa como un anticuerpo por unión a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados que consisten en la región variable de cadena ligera y pesada; fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinantes en las que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un enlazador peptídico ("proteínas sFv") y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos aminoacídicos que mimetizan la región hipervariable.

Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y reconocimiento de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación estrecha no covalente (dímero de VH-VL). Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero de VH-VL. En su conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

Un anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), definido como una molécula obtenida por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente. Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se denominan fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv". En general, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., págs. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos y construcciones de anticuerpos pequeños similares más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993); Muyldermaus, S., *J. Biotechnol.*, 74: 277-302 (2001); Davies, J. et al., *Biotechnology*, 13: 475-479 (1995); Nguyen, V. K. et al., *Immunology*, 109: 93-101 (2003).

Un marcador detectable es una molécula o átomo que puede conjugarse con un resto de anticuerpo para producir una molécula útil para el diagnóstico. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos, enzimas y otros restos marcadores.

Como se usa en la presente memoria, un inmunoconjugado es una molécula que comprende un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta, o un fragmento de anticuerpo, y un marcador detectable. Un inmunoconjugado tiene aproximadamente la misma, o solo ligeramente reducida, capacidad de unirse a proteína de unión a TGF-beta tanto después de la conjugación como antes de la conjugación.

Como se usa en la presente memoria, el término modular significa aumentar o disminuir de una forma estadísticamente significativa.

**Abreviaturas:** TGF-beta - "Factor de Crecimiento Transformante-beta"; TGF-bBP - "proteína de unión a Factor de Crecimiento Transformante-beta" (una TGF-bBP representativa se denomina "esclerostina", "Beer" o "H. Beer"); BMP - "proteína morfogénica ósea"; PCR - "reacción en cadena de la polimerasa"; RT-PCR - proceso de PCR en el que el ARN se transcribe primero en ADN en la primera etapa usando transcriptasa inversa (RT); ADNc - cualquier ADN generado por copia de una secuencia de ARN en forma de ADN.

Como se ha señalado anteriormente, la presente invención proporciona complejos aislados que comprenden una proteína de unión a TGF-beta como se define en la reivindicación 1, en asociación específica con una proteína antagonista de BMP como se ha definido en la reivindicación 1, y métodos y composiciones relacionadas. En resumen, las presentes invenciones se basan en el descubrimiento inesperado de que las proteínas antagonistas de BMP cordina y nogina son cada una de ellas capaces de unirse específicamente a esclerostina. Por lo tanto, como se ha analizado en más detalle a continuación, este descubrimiento ha conducido al desarrollo de ensayos que pueden utilizarse para seleccionar moléculas que inhiban la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas de TGF-beta y proteínas morfogénicas óseas (BMP).

La superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF-beta) contiene una diversidad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales (a nivel tanto secundario como terciario) comunes. Se sabe que esta familia de proteínas ejerce un amplio espectro de respuestas biológicas en una amplia diversidad de tipos celulares. Muchas de ellas tienen funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y en la especificación de tejidos; en adultos están implicadas, por ejemplo, en la cicatrización de heridas, y en la reparación ósea y la remodelación ósea, y en la modulación del sistema inmune. Además de las tres TGF-beta, la superfamilia incluye las Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP), activinas, inhibinas, Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF) y Factores Neurotróficos Derivados de la Glía (GDNF). La clasificación primaria se establece a través de las características de secuencia generales que unen una proteína específica a una subfamilia general. La estratificación adicional dentro de la subfamilia es posible debido a una conservación de secuencias más estricta entre miembros del grupo más pequeño. En cierto caso, tal como con BMP-5, BMP-6 y BMP-7, esto puede ser tan alto como una homología de aminoácidos del 75 por ciento entre miembros del grupo

más pequeño. Este nivel de identidad permite que una sola secuencia representativa ilustre los elementos bioquímicos clave del subgrupo que la separan de otros miembros de la familia de mayor tamaño.

TGF-beta señala por inducción de la formación de complejos hetero-oligoméricos de receptores de tipo I y tipo II. La estructura cristalina de TGF-beta2 se ha determinado. El plegamiento general del monómero de TGF-beta2 contiene una estructura de tipo nudo de cisteína compacta estable formada por tres puentes disulfuro. La dimerización, estabilizada por un puente de disulfuro, es antiparalela.

Los miembros de la familia de TGF-beta inician su acción celular por unión a receptores con actividad de serina/treonina quinasa intrínseca. Esta familia de receptores consiste en dos subfamilias, indicadas como receptores de tipo I y tipo II. Cada miembro de la familia de TGF-beta se une a una combinación característica de receptores de tipo I y tipo II, siendo ambos necesarios para la señalización. En el modelo actual para activación del receptor de TGF-beta, TGF-beta se une primero al receptor de tipo II (TbR-II), que aparece en la membrana celular en una forma oligomérica con quinasa activada. Después de eso, el receptor de tipo I (TbR-I) que no puede unirse al ligando en ausencia de TbR-II, se recluta en el complejo. TbR-II fosforila entonces TbR-I predominantemente en un dominio rico en restos de glicina y serina (dominio GS) en la región yuxtamembrana, y de este modo activa a TbR-I.

Las Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP) son Proteínas Reguladoras Clave en la Determinación de la Densidad Mineral Ósea en Seres Humanos. Un avance principal en la comprensión de la formación de hueso fue la identificación de las proteínas morfogénicas óseas (BMP), también conocidas como proteínas osteogénicas (OP), que regulan la diferenciación de cartílago y de hueso *in vivo*. Las BMP/OP inducen la diferenciación ósea endocondral a través de una cascada de acontecimientos que incluyen la formación de cartílago, la hipertrofia y la calcificación del cartílago, la invasión vascular, la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso. Como se ha descrito anteriormente, las BMP/OP (BMP 2-14 y proteína osteogénica 1 y 2, OP-1 y OP-2) son miembros de la superfamilia de TGF-beta. La sorprendente conservación evolutiva entre los miembros de la subfamilia de BMP/OP sugiere que son críticos en el desarrollo y la función normal de los animales. Además, la presencia de múltiples formas de BMP/OP plantea una cuestión importante acerca de la importancia biológica de esta redundancia aparente. Además de la condrogénesis y de la osteogénesis postfetal, las BMP/OP desempeñan múltiples papeles en la esquelotogénesis (incluyendo el desarrollo de tejidos craneofaciales y dentales) y en el desarrollo embrionario y la organogénesis de órganos parenquimatosos, incluyendo el riñón. Actualmente se entiende que la naturaleza depende de mecanismos moleculares comunes (y pocos) confeccionados para proporcionar la emergencia de tejidos y órganos especializados. La superfamilia de BMP/OP es un ejemplo elegante de la frugalidad de la naturaleza en la programación de múltiples funciones especializadas desplegando isoformas moleculares con variaciones minoritarias en motivos aminoácidos dentro de regiones carboxi-terminales altamente conservadas.

Las subfamilias de BMP y Activina están sujetas a una regulación post-traducciona significativa. Existe un sistema de control extracelular intrincado, por lo que un antagonista de alta afinidad se sintetiza y se exporta, y posteriormente forma complejos selectivamente con BMP o activinas para alterar su actividad biológica (W.C. Smith (1999) TIG 15(1) 3-6). Se han identificado varios de estos antagonistas naturales y, basándose en la divergencia de secuencia, parecen haber evolucionado independientemente debido a la ausencia de una conservación de secuencia primaria. No ha habido trabajos estructurales hasta la fecha sobre esta clase de proteínas. Los estudios de estos antagonistas han destacado una preferencia distintiva por interaccionar con y neutralizar BMP-2 y BMP-4. Además, el mecanismo de inhibición parece diferir para los diferentes antagonistas (S. Iemura et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 9337-9342).

Las Patentes de Estados Unidos N° 6.395.511, 6.489.445 y 6.495.736 proporcionan esclerostina, también conocida como proteínas Beer, una nueva clase de proteínas de unión a TGF-beta que poseen un armazón de cisteína (disulfuro) casi idéntico en comparación con DAN Humana, Gremlin Humana y Cerberus Humana, y SCGF (Patente de Estados Unidos N° 5.780.263), pero sin apenas homología a nivel de nucleótido (para información antecedente, véase en general Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., Harland, R.M., "The Xenopus Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities," Molecular Cell 1: 673-683, 1998).

Un ejemplo representativo de la nueva clase de proteínas de unión a TGF-beta se describe en las SEC ID N°: 1, 5, 9, 11, 13 y 15. Debería entenderse que los miembros representativos de esta clase de proteínas de unión incluyen variantes de la proteína de unión a TGF-beta (por ejemplo, SEC ID N°: 5 y 7). Como se utiliza en la presente memoria, un "gen variante de proteína de unión a TGF-beta" se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de las SEC ID N°: 2, 10, 12, 14 ó 16. Dichas variantes incluyen polimorfismos de origen natural o variantes alélicas de genes de proteínas de unión a TGF-beta, así como genes sintéticos que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas de estas secuencias de aminoácidos. Las formas variantes adicionales de un gen de proteína de unión a TGF-beta son moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o deleciones de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria. Los genes variantes de proteína de unión a TGF-beta pueden identificarse por determinación de si los genes hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 1, 5, 7, 9, 11, 13 ó 15 en condiciones rigurosas. Además, los genes variantes de proteína de unión a TGF-beta deberían codificar una proteína que tenga una cadena principal de cisteína.

Como alternativa, pueden identificarse genes variantes de proteína de unión a TGF-beta por comparación de secuencia. Como se usa en la presente memoria, dos secuencias de aminoácidos tienen una "identidad de secuencia de aminoácidos del 100%" si los restos aminoacídicos de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima. De forma similar, dos secuencias de nucleótidos tienen una "identidad de secuencia de nucleótidos del 100%" si los restos de nucleótidos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima. Las comparaciones de secuencia pueden realizarse usando programas informáticos convencionales tales como los incluidos en el LASERGENE bioinformatics computing suite, que está producido por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros métodos para comparar dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por determinación del alineamiento óptimo son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997), Wu et al. (eds.), "information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," en Methods in Gene Biotechnology, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997) y Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2ª Edición (Academic Press, Inc. 1998)).

Una proteína de unión a TGF-beta variante debería tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 50% con las SEC ID N°: 2, 6, 10, 12, 14 ó 16 y, preferentemente, una identidad superior al 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%. Como alternativa, pueden identificarse variantes de proteína de unión a TGF-beta por tener una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 70% con las SEC ID N°: 1, 5, 9, 11, 13 ó 15. Además, también se contemplan variantes génicas de proteínas de unión a TGF-beta que tienen una identidad superior al 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% con la SEC ID N°: 1. Independientemente del método particular usado para identificar un gen variante de proteína de unión a TGF-beta o proteína de unión a TGF-beta variante, una proteína de unión a TGF-beta variante o un polipéptido codificado por un gen de proteína de unión a TGF-beta variante puede caracterizarse funcionalmente por, por ejemplo, su capacidad para unirse a y/o inhibir la señalización de un miembro seleccionado de la familia de proteínas de TGF-beta, o por su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta.

También se hace referencia a fragmentos funcionales de genes de proteínas de unión a TGF-beta. Dentro del contexto al que se hace referencia en la presente memoria, un "fragmento funcional" de un gen de proteína de unión a TGF-beta se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una porción de un polipéptido de proteína de unión a TGF-beta que (1) posee la actividad funcional señala anteriormente o (2) se une específicamente con un anticuerpo anti-proteína de unión a TGF-beta. Por ejemplo, un fragmento funcional de un gen de proteína de unión a TGF-beta descrito en la presente memoria comprende una porción de la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 1, 5, 9, 11, 13 ó 15.

La cordina (por ejemplo, Reddi et al. 2001 Arthritis Research 3: 1; Oelgeschlager et al., 2000 Nature 405: 757), proteínas con nudo de cistina tales como nogina (por ejemplo, Groppe et al., 2002 Nature 420: 636) y la familia de proteínas de DAN distinta (incluyendo DAN, Cerberus y Gremlin; por ejemplo, Hsu et al., 1998 Mol. Cell 1: 673) representan tres clasificaciones generales de proteínas antagonistas de BMP secretadas que actúan extracelularmente (por ejemplo, Bailemans et al., 2002 Dev. Biol. 250: 231). El alineamiento de secuencia de aminoácidos de esclerostina humana (Beer) con Cerberus, DAN y Gremlin mostró que a pesar de un armazón de cisteína altamente similar entre las cuatro proteínas, la esclerostina mostraba de otro modo escasa homología con los miembros de la familia de DAN (Fig. 1; véase también la Patente de Estados Unidos N° 6.395.511). Los ejemplos de polipéptidos de nogina, cordina y BMP que pueden usarse de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención se enumeran de acuerdo con los Números de Acceso de Genbank/NCBI en la Tabla 1.

Tabla 1: Proteínas de Unión a TGF-beta/Proteínas antagonistas de BMP/BMP representativas

| Fuente | Cordina                                                                                                                                      | Nogina | BMP-5              | BMP-6     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------|-----------|
| Humano | XM_209529,<br>AF209928,<br>AX235836,<br>AF283325,<br>AF209930,<br>AF209929,<br>BC002909,<br>AX175126,<br>AX175126,<br>AX175123,<br>AX140204, |        | NM_02073<br>M60314 | NM_001718 |



| Fuente                | Cordina                                                                                                                                                                                           | Nogina            | BMP-5                           | BMP-6                                                                                    |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       | AX140203,<br>AX140202,<br>AX140201,<br>AX140200,<br>AX140199,<br>AX140198,<br>AX140197,<br>AX140196,<br>AX140195,<br>AF136632S4,<br>AF136634,<br>AF136633,<br>AF136632,<br>AH009297,<br>AF076612, |                   |                                 |                                                                                          |
| Ratón                 | AK077460,<br>AK007577,<br>NM_009893,<br>AX235833,<br>AX175120,<br>AX140205,<br>AF096276,<br>AF069501                                                                                              |                   | NM_007555,<br>L41145,<br>L02240 | NM_007556,<br>AH003686,<br>U73520,<br>U73519,<br>U73518,<br>U73517,<br>U73516,<br>U73515 |
| Conejo                | AB073105                                                                                                                                                                                          |                   | AF412307                        |                                                                                          |
| Rata                  | NW_042725,<br>XM_221307,<br>AB073715,<br>D86581                                                                                                                                                   |                   | XM_236415                       | AY184240,<br>XM_214455                                                                   |
| Pollo                 | AF031230                                                                                                                                                                                          |                   | S83278                          |                                                                                          |
| Oveja                 | AY150846                                                                                                                                                                                          |                   |                                 | AF508310                                                                                 |
| Cabra                 |                                                                                                                                                                                                   |                   |                                 |                                                                                          |
| <i>Xenopus laevis</i> | L35764,                                                                                                                                                                                           |                   |                                 |                                                                                          |
| Caballo               |                                                                                                                                                                                                   |                   |                                 | AF510665                                                                                 |
| Pez cebra             | NM_130973,<br>AF034606,                                                                                                                                                                           |                   |                                 |                                                                                          |
|                       | AR063998,<br>AR063997                                                                                                                                                                             |                   |                                 |                                                                                          |
|                       | 18203652                                                                                                                                                                                          | 214626            |                                 |                                                                                          |
|                       | 18202942<br>25140444                                                                                                                                                                              | 285271<br>1117817 |                                 |                                                                                          |

| Fuente | Cordina                                   | Nogina   | BMP-5 | BMP-6 |
|--------|-------------------------------------------|----------|-------|-------|
|        | 1072455                                   | 1117819  |       |       |
|        | 18202071                                  | 1352511  |       |       |
|        | 2498235                                   | 1710365  |       |       |
|        | 2498234                                   | 3695029  |       |       |
|        | 18858413                                  | 3860047  |       |       |
|        | 6753418                                   | 4185744  |       |       |
|        | 16555891                                  | 4432769  |       |       |
|        | 2731578                                   | 4885523  |       |       |
|        | 11494125                                  | 5410599  |       |       |
|        | 16215740                                  | 5410601  |       |       |
|        | 15077351                                  | 7110675  |       |       |
|        | 7839323                                   | 15214085 |       |       |
|        | 7839322                                   | 15214097 |       |       |
|        | 7839321                                   | 15214098 |       |       |
|        | 7839320                                   | 15214099 |       |       |
|        | 4406186                                   | 15214132 |       |       |
|        | 1468951                                   | 15214133 |       |       |
|        | 3822218                                   | 15214136 |       |       |
|        | 3800772                                   | 15214137 |       |       |
|        | 2826739                                   | 18859109 |       |       |
|        | 603945                                    | 18859111 |       |       |
|        | 11494373                                  | 18859113 |       |       |
|        | (Forma de corte y<br>empalme alternativa) | 21105761 |       |       |
|        | 11494129                                  | 21707595 |       |       |
|        | (Forma de corte y<br>empalme alternativa) | 21907883 |       |       |
|        | 11494127                                  | 27374944 |       |       |
|        | (Forma de corte y empalme alternativa)    |          |       |       |

Composiciones de anticuerpos, fragmentos de los mismos y otros agentes de unión

- 5 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona además anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son capaces de modular la formación de los complejos descritos en la presente memoria. También se hace referencia a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son capaces de detectar los complejos descritos en la presente memoria, y/o que son capaces de modular uno o más aspectos de la densidad ósea.
- 10 Por ejemplo, en una realización ilustrativa, los agentes de unión se unen a un complejo formado entre Esclerostina (Beer) y Cordina o Nogina. Dichos agentes de unión puede usarse, por ejemplo, en la detección de los complejos descritos en la presente memoria y, por lo tanto, son útiles en la detección de compuestos adicionales que se unen a un complejo formado entre Esclerostina (Beer) y Nogina o entre Esclerostina (Beer) y Cordina. Como alternativa, o
- 15 además, los agentes de unión de la presente invención pueden dirigirse, por ejemplo, a regiones de Esclerostina (Beer), Nogina y/o Cordina identificadas como responsables de las interacciones de unión entre estas proteínas. Dichos agentes de unión pueden usarse por consiguiente para alterar la formación de complejos entre Esclerostina (Beer) y Cordina o Esclerostina (Beer) y Nogina y, de este modo, pueden ser útiles para modular la densidad ósea.

Pueden prepararse anticuerpos por cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, 1988. En general, los anticuerpos pueden producirse por técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales como se describe en la presente memoria, o por transfección de genes de anticuerpo en hospedadores de células bacterianas o de mamíferos adecuadas, para permitir la producción de anticuerpos recombinantes. En una técnica, un inmunógeno que comprende el polipéptido se inyecta inicialmente en cualquiera de una amplia diversidad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas o cabras). En esta etapa, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden servir como inmunógeno sin modificación. Como alternativa, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, puede generarse una respuesta inmune superior si el polipéptido se une a una proteína transportadora, tal como albúmina de suero bovino o hemocianina de lapa californiana. El inmunógeno se inyecta en el hospedador animal, preferentemente de acuerdo con un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y se extrae sangre de los animales periódicamente. Después pueden purificarse anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido a partir de dichos antisueros, por ejemplo, por cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado. El mamífero usado para generar una respuesta inmune contra el inmunógeno puede ser un mamífero *knock out*. En esta realización, se usan métodos de inactivación de genes (*knock out*) conocidos en la técnica para generar animales que no expresan de forma natural la proteína correspondiente al inmunógeno. La tecnología de inactivación de genes (*knock out*) es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N°: 6.252.132; 6.437.215; y 6.444.873.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido antigénico de interés, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-19, 1976, y mejoras en la misma. En resumen, estos métodos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tengan la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de interés). Dichas líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de esplenocitos obtenidos de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente. Los esplenocitos se immortalizan entonces, por ejemplo, por fusión con un compañero de fusión de células de mieloma, preferentemente uno que sea singénico con el animal inmunizado. Pueden emplearse una diversidad de técnicas de fusión. Por ejemplo, los esplenocitos y las células de mieloma pueden combinarse con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y después sembrarse en placas a baja densidad en un medio selectivo que sirva de soporte al crecimiento de células híbridas, pero no a células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa selección con HTA (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después un tiempo suficiente, habitualmente de aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y sus sobrenadantes de cultivo se ensayan para determinar la actividad de unión contra el polipéptido. Se prefieren hibridomas que tengan una alta reactividad y especificidad.

Pueden aislarse anticuerpos monoclonales a partir de los sobrenadantes de colonias de hibridoma en crecimiento. Además, pueden emplearse diversas técnicas para aumentar el rendimiento, tales como inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado adecuado, tal como un ratón. Después, los anticuerpos monoclonales pueden recogerse del líquido ascítico o de la sangre. Pueden eliminarse los contaminantes de los anticuerpos por técnicas convencionales tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden usarse en el proceso de purificación, por ejemplo, en una etapa de cromatografía de afinidad.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor y sus CDR asociadas fusionadas a dominios constantes humanos (Winter et al., *Nature* 349: 293-99, 1991; Lobuglio et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 4220-24, 1989; Shaw et al., *J. Immunol.* 138: 4534-38, 1987; y Brown et al., *Cancer Res.* 47: 3577-83, 1987), CDR de roedor injertadas en una FR de soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado (Riechmann et al., *Nature* 332: 323-27, 1988; Verhoeven et al., *Science* 239: 1534-36, 1988; y Jones et al., *Nature* 321: 522-25, 1986), y CDR de roedor soportadas por FR de roedor revestidas recombinantemente (Publicación de Patente Europea N° 519.596, publicada el 23 de dic. de 1992). Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo de roedor anti-humano que limitan la duración y la eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos.

Por lo tanto, la invención contempla formas humanas y humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos). Dichos anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata o conejo, que tienen la eficacia, afinidad y capacidad deseadas.

Por lo tanto, los restos flanqueantes de Fv de la inmunoglobulina humana pueden sustituirse por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o flanqueantes importadas. Estas modificaciones se realizan para

refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento de anticuerpos. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponde a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. (Reichmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988); Presta, *Curro Op. Struct. Biol.* 2, 593-596 (1992); Holmes, et al., *J. Immunol.*, 158: 2192-2201 (1997) y Vaswani, et al., *Annals Allergy, Asthma & Immunol.*, 81: 105-115 (1998)).

También se hace referencia a procedimientos para mutar anticuerpos para optimizar su afinidad, selectividad, fuerza de unión u otra propiedad deseable. Un anticuerpo mutante se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo. En general, uno o más de los restos aminoacídicos en el anticuerpo mutante es diferente del que está presente en el anticuerpo de referencia. Dichos anticuerpos mutantes tienen necesariamente una identidad o similitud de secuencia de menos del 100% con la secuencia de aminoácidos de referencia. En general, los anticuerpos mutantes tienen una identidad o similitud de secuencia de aminoácidos de al menos el 75% con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo de referencia. Preferentemente, los anticuerpos mutantes tienen una identidad o similitud de secuencia de aminoácidos de al menos el 80%, más preferentemente de al menos el 85%, aún más preferentemente de al menos el 90% y más preferentemente de al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo de referencia. Un método para mutar anticuerpos implica maduración por afinidad usando presentación en fago.

Como se usan en la presente memoria, las expresiones "FR revestidas" y "FR revestidas recombinantemente" se refieren a la sustitución selectiva de restos de FR de, por ejemplo, regiones V de cadena pesada o ligera de roedor, con restos de FR humana para proporcionar una molécula xenogénica que comprende un sitio de unión a antígeno que conserva sustancialmente toda la estructura de plegamiento polipeptídica de la FR nativa. Las técnicas de revestimiento se basan en la comprensión de que las características de unión a ligando de un sitio de unión a antígeno están determinadas principalmente por la estructura y la disposición relativa de los conjuntos de CDR de cadena pesada y ligera dentro de la superficie de unión a antígeno. Davies et al., *Ann. Rev. Biochem.* 59: 439-73, 1990. Por lo tanto, la especificidad de unión a antígeno puede conservarse solamente en un anticuerpo humanizado en el que las estructuras de CDR, su interacción entre sí y su interacción con el resto de los dominios de región V se mantengan cuidadosamente. Usando técnicas de revestimiento, los restos de FR exteriores (por ejemplo, accesibles al disolvente) que se encuentran fácilmente por el sistema inmune se sustituyen selectivamente con restos humanos para proporcionar una molécula híbrida que comprenda una superficie revestida débilmente inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica.

El proceso de revestimiento hace uso de los datos de secuencia disponibles para dominios variables de anticuerpos humanos recopilados por Kabat et al., en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4ª ed., (U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1987), actualizaciones en la base de datos de Kabat y otras bases de datos accesibles de los Estados Unidos y extranjeras (tanto de ácido de nucleico como de proteína). Las accesibilidades al disolvente de los aminoácidos de la región V pueden deducirse a partir de la estructura tridimensional conocida para fragmentos de anticuerpo humanos y murinos. Hay dos etapas generales en el revestimiento de un sitio de unión a antígeno murino. Inicialmente, las FR de los dominios variables de una molécula de anticuerpo de interés se comparan con las secuencias de FR correspondientes de dominios variables humanos obtenidos a partir de las fuentes identificadas anteriormente. Las regiones V humanas más homólogas se comparan después resto por resto con los aminoácidos murinos correspondientes. Los restos en la FR murina que difieren del homólogo humano se sustituyen por los restos presentes en el resto humano usando técnicas recombinantes bien conocidas en la materia. El intercambio de restos se lleva a cabo solamente con restos que están al menos parcialmente expuestos (accesibles al disolvente) y se tiene cuidado en la sustitución de restos aminoacídicos que puedan tener un efecto significativo sobre la estructura terciaria de dominios de la región V, tales como aminoácidos de prolina, glicina y cargados.

De esta forma, los sitios de unión a antígeno murino "revestidos" resultantes están por lo tanto diseñados para conservar los restos de CDR murinos, los restos sustancialmente adyacentes a las CDR, los restos identificados como enterrados o en su mayor parte enterrados (inaccesibles al disolvente), los restos que se cree que participan en contactos no covalentes (por ejemplo, electrostáticos e hidrófobos) entre dominios de cadena pesada y ligera, y los restos de regiones estructurales conservadas de las FR que se cree que influyen en las estructuras terciarias "canónicas" de los bucles de CDR. Estos criterios de diseño se usan después para preparar secuencias de nucleótidos recombinantes que combinan las CDR tanto de la cadena pesada como ligera de un sitio de unión a antígeno murino en FR de apariencia humana que pueden usarse para transfectar células de mamífero para la expresión de anticuerpos humanos recombinantes que presentan la especificidad de antígeno de la molécula de anticuerpo murino.

La invención también contempla anticuerpos parcialmente o totalmente humanos específicos para un polipéptido antigénico de interés. Dichos anticuerpos pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Lonberg, N. et al., *Int. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995); Fishwild, D.M. et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:

826 (1996); Patente de Estados Unidos N° 6.632.976 B1 para Tomizuka et al.; y Tomizuka, K. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., 97: 722-727 (2000) (que describen anticuerpos totalmente humanos). También se contemplan fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos humanos preparados como se han descrito anteriormente.

- 5 En otra realización de la invención, los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden acoplarse a uno o más agentes terapéuticos. Los agentes adecuados a este respecto incluyen radionúclidos, inductores de la diferenciación, fármacos, toxinas y derivados de los mismos. Los radionúclidos preferidos incluyen  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$  y  $^{212}\text{Bi}$ . Los fármacos preferidos incluyen metotrexato y análogos de purina y pirimidina. Los inductores de la diferenciación preferidos incluyen ésteres de forbol y ácido butírico. Las toxinas preferidas incluyen ricina, abrina, toxina diftérica, toxina colérica, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de *Shigella* y proteína antiviral de hierba carmín.

- 15 Un agente terapéutico puede acoplarse (por ejemplo, unirse covalentemente) a un anticuerpo monoclonal adecuado directa o indirectamente (por ejemplo, mediante un grupo enlazador). Una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

- 20 Como alternativa, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico y un anticuerpo mediante un grupo enlazador. Un grupo enlazador puede funcionar como un espaciador para distanciar un anticuerpo de un agente para evitar la interferencia con las capacidades de unión. Un grupo enlazador también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente o un anticuerpo y, por lo tanto, aumentar la eficacia de acoplamiento. Un aumento en la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes o grupos funcionales en agentes, que de otro modo no sería posible.

- 30 Será evidente para los expertos en la materia que pueden emplearse una diversidad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo- como heterofuncionales (tales como los descritos en el catálogo de la Pierce Chemical Co., Rockford, IL), como el grupo enlazador. El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o grupos carbohidrato oxidados. Existen numerosas referencias que describen dicha metodología, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.671.958 para Rodwell et al.

- 35 Cuando un agente terapéutico es más potente cuando está libre de la porción de anticuerpo de los inmunoconjugados de la presente invención, puede ser deseable usar un grupo enlazador que sea escindible durante o tras la internalización en una célula. Se han descrito varios grupos enlazadores escindibles diferentes. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de estos grupos enlazadores incluyen la escisión por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.489.710 para Spittler), por irradiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.625.014 para Senter et al.), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivatizadas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.638.045 para Kohn et al.), por hidrólisis mediada por el complemento en suero (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.671.958 para Rodwell et al.) e hidrólisis catalizada por ácido (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.569.789 para Blattler et al.).

- 45 Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una realización, múltiples moléculas de un agente se acoplan a una molécula de anticuerpo. En otra realización, más de un tipo de agente puede acoplarse a un anticuerpo. Independientemente de la realización particular, pueden prepararse inmunoconjugados con más de un agente en una diversidad de formas. Por ejemplo, más de un agente puede acoplarse directamente a una molécula de anticuerpo, o pueden usarse enlazadores que proporcionen múltiples sitios para la unión. Como alternativa, puede usarse un vehículo.

- 50 Un vehículo puede portar los agentes de una diversidad de formas, incluyendo unión covalente directamente o mediante un grupo enlazador. Los vehículos adecuados incluyen proteínas tales como albúminas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.507.234, para Kato et al.), péptidos y polisacáridos tales como aminodextrano (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.699.784, para Shih et al.). Un vehículo también puede portar un agente por unión no covalente o por encapsulación, tal como dentro de una vesícula de liposoma (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.429.008 y 4.873.088). Los vehículos específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y compuestos quelantes. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.735.792 describe moléculas pequeñas radiohalogenadas representativas y su síntesis. Un quelato de radionúclido puede formarse a partir de compuestos quelantes que incluyen los que contienen átomos de nitrógeno y azufre como los átomos donadores para unir el metal, u óxido de metal, radionúclido. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.673.562 para Davison et al. describe compuestos quelantes representativos y su síntesis.

- 65 Ensayos para seleccionar moléculas. Esencialmente cualquier tipo de compuesto puede ensayarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria usando cualquier procedimiento de exploración adecuado, tal como un ensayo de exploración de alto rendimiento. Por consiguiente, los ejemplos de compuestos y técnicas de exploración descritos a continuación se ofrecen con fines ilustrativos solamente. Los compuestos de ensayo

ilustrativos para su uso en los métodos de exploración descritos en la presente memoria pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, ADNg, ADNc, ARNm, ARNt, iARN, etc. naturales o sintéticos), lectinas, azúcares, oligosacáridos, glicoproteínas, receptores, factores de crecimiento, citocinas, moléculas pequeñas tales como candidatos a fármacos (de, por ejemplo, una biblioteca de péptidos aleatoria, una biblioteca de productos naturales, una biblioteca de herencia, una biblioteca combinatoria, una biblioteca de oligosacáridos y una biblioteca de presentación en fago), metabolitos, sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, cofactores enzimáticos tales como vitaminas, lípidos, esteroides, metales, oxígeno y otros gases que se encuentran en fluidos fisiológicos, células, constituyentes celulares, membranas celulares y estructuras asociadas, moléculas de adhesión celular, productos naturales que se encuentran en fuentes vegetales y animales, otros productos parcialmente o completamente sintéticos y similares.

Como se ha señalado anteriormente, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente invención, se proporcionan métodos para identificar un compuesto que module la unión de Nogina o Cordina a Esclerostina (Beer). Dichos métodos implican proporcionar primero una composición que comprende Esclerostina (Beer) y Nogina o Cordina en condiciones en las que dicha Esclerostina (Beer) se une a Nogina o Cordina con una afinidad de unión predeterminada. El polipéptido de Nogina o Cordina usado de acuerdo con esta realización puede comprender un polipéptido aislado que comprende la proteína completa de Nogina o Cordina y, preferentemente, comprende al menos el dominio de Nogina o Cordina que se une a Esclerostina (Beer). Además, el polipéptido de Esclerostina (Beer) usado en esta realización puede comprender un polipéptido aislado que contiene la proteína Esclerostina (Beer) completa, y preferentemente comprende al menos el dominio de Esclerostina (Beer) que se une a Nogina o Cordina.

En el contexto de los métodos de exploración de la presente invención, la formación de un complejo entre Esclerostina (Beer) y Nogina o Cordina puede detectarse o medirse directamente o indirectamente usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, uno o más de los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden marcarse con un marcador adecuado y la formación de un complejo puede determinarse por detección del marcador. Los marcadores adecuados para su uso en la detección de un complejo entre Nogina o Cordina y Esclerostina (Beer) pueden incluir, por ejemplo, un radioisótopo, un marcador epitópico (etiqueta), un marcador de afinidad (por ejemplo, biotina, avidina), un marcador de espín, una enzima, un grupo fluorescente, un grupo quimioluminiscente y similares. Cuando no se emplean marcadores, puede determinarse la formación de complejo, por ejemplo, usando cualquier otra técnica conocida en la materia, incluyendo los ejemplos ilustrativos de las mismas entrecruzamiento, coimmunoprecipitación y cofraccionamiento por cromatografía, y el sistema de doble híbrido de levadura.

La composición que comprende una de las composiciones descritas anteriormente de Nogina o Cordina y Esclerostina (Beer) se pone en contacto con un compuesto de ensayo para determinar si el compuesto de ensayo es capaz de modular la unión entre Esclerostina (Beer) y Nogina o Cordina. Por comparación de la afinidad de unión determinada en presencia de un compuesto de ensayo con, por ejemplo, la afinidad de unión entre Nogina o Cordina y Esclerostina (Beer) en ausencia del compuesto de ensayo, el método permite la identificación de compuestos de ensayo capaces de modular la interacción entre estas proteínas.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para identificar un compuesto que module, y preferentemente inhiba, la unión de Nogina o Cordina con Esclerostina (Beer). De nuevo, por comparación de la afinidad de unión determinada en presencia de un compuesto de ensayo con, por ejemplo, la afinidad de unión entre Nogina o Cordina y Esclerostina (Beer) en ausencia del compuesto de ensayo, el método identifica si el compuesto de ensayo es capaz de inhibir la interacción entre estas proteínas.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para identificar un compuesto que module, y preferentemente aumente, la unión de Nogina o Cordina con Esclerostina (Beer). De nuevo, por comparación de la afinidad de unión determinada en presencia de un compuesto de ensayo con, por ejemplo, la afinidad de unión entre Nogina o Cordina y Esclerostina (Beer) en ausencia del compuesto de ensayo, el método identifica si el compuesto de ensayo es capaz de aumentar la interacción entre estas proteínas.

En otra realización, el nivel de unión de Esclerostina (Beer) a Nogina o Cordina en presencia de un compuesto de ensayo se compara con el nivel de unión de Esclerostina (Beer) a Nogina o Cordina en ausencia de dicho compuesto de ensayo. En ciertas realizaciones ilustrativas de la presente invención, el nivel de unión en presencia del compuesto de ensayo se disminuye, por ejemplo, el 100%, 90%, 80%, 75%, 70% o 50% o menos, en comparación con células no expuestas al compuesto de ensayo.

En otra realización, el nivel de unión de Esclerostina (Beer) a Nogina o Cordina en presencia de un compuesto de ensayo se compara con el nivel de unión de Esclerostina (Beer) a Nogina o Cordina en ausencia de dicho compuesto de ensayo. En ciertas realizaciones ilustrativas de la presente invención, el nivel de unión en presencia del compuesto de ensayo se aumenta en, por ejemplo, el 100%, 90%, 80%, 75%, 70% o 50% o menos, en comparación con células no expuestas al compuesto de ensayo.

Además de los ensayos ilustrativos descritos anteriormente para la exploración de compuestos de ensayo, pueden emplearse cualquiera de una diversidad de bibliotecas moleculares junto con los métodos de exploración de la presente invención. Las bibliotecas son colecciones creadas intencionadamente de diferentes moléculas que se

preparan usando, por ejemplo, métodos sintéticos orgánicos, métodos bioquímicos y otros. En el último caso, las moléculas pueden generarse *in vitro* o *in vivo*. Dichas bibliotecas incluyen, por ejemplo, bibliotecas de péptidos aleatorios, bibliotecas sintetizadas de forma combinatoria, bibliotecas de presentación en fago, bibliotecas de productos naturales, bibliotecas de oligosacáridos y bibliotecas de herencia (una colección de moléculas sintetizadas con el tiempo y recogidas).

Un desarrollo significativo en el descubrimiento y diseño de productos farmacéuticos ha sido el desarrollo de química combinatoria para crear bibliotecas químicas de nuevos fármacos potenciales. Las bibliotecas químicas son colecciones creadas intencionadamente de diferentes moléculas generadas, por ejemplo, por métodos sintéticos orgánicos o bioquímicamente. La química combinatoria es una estrategia sintética en la que los miembros químicos de la biblioteca se generan de acuerdo con una metodología sistemática mediante el ensamblaje de subunidades químicas. Cada molécula en la biblioteca está compuesta por lo tanto por una o más de estas subunidades. Las subunidades químicas pueden incluir aminoácidos de origen natural o modificados, nucleótidos de origen natural o modificados, sacáridos de origen natural o modificados u otras moléculas, ya sean orgánicas o inorgánicas. Típicamente, cada subunidad tiene al menos dos grupos reactivos, permitiendo la construcción por etapas de moléculas de mayor tamaño por reacción del primero y después de otro grupo reactivo de cada subunidad para construir moléculas sucesivamente más complejas y potencialmente diversas.

Creando condiciones sintéticas por las que un número fijado de componentes básicos individuales, por ejemplo, los veinte aminoácidos de origen natural, se hacen igualmente disponibles en cada etapa de la síntesis, puede ensamblarse una matriz o biblioteca de compuestos muy grande, después de incluso unas cuantas etapas de la reacción de síntesis. Usando aminoácidos como ejemplo, en la primera etapa sintética el número de compuestos resultantes (N) es igual al número de componentes básicos disponibles, denominado b. En el caso de los aminoácidos de origen natural,  $b = 20$ . En la segunda etapa de la síntesis, asumiendo que cada aminoácido tiene una oportunidad equivalente de formar un dipéptido con cada otro aminoácido, el número de compuestos posibles  $N = b^2 = 20^2 = 400$ .

Para etapas de síntesis sucesivas, de nuevo asumiendo un ensamblaje aleatorio igualmente eficaz de los componentes básicos con los compuestos resultantes de la etapa previa,  $N = b^x$  donde x equivale al número de etapas de ensamblaje sintéticas. Por lo tanto, puede observarse que para el ensamblaje aleatorio de sólo un decapeptido el número de compuestos diferentes es de  $20^{10}$  ó  $1,02 \times 10^{13}$ . Dicho número extremadamente grande de compuestos diferentes permite el ensamblaje y la exploración de un gran número de candidatos diversos para la capacidad para modular la infección por VIH mediada por LDLR2.

Se han construido bibliotecas combinatorias sintetizadas biológicamente usando técnicas de biología molecular en bacterias o partículas de bacteriófagos. Por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.270.970 y 5.338.665 para Schatz describen la construcción de un plásmido recombinante que codifica una proteína de fusión creada mediante el uso de oligonucleótidos aleatorios insertados en un sitio de clonación del plásmido. Este sitio de clonación se pone dentro de la región codificante de un gen que codifica una proteína de unión a ADN, tal como el represor lac, de modo que la función de unión específica de la proteína de unión a ADN no se destruye tras la expresión del gen. El plásmido también contiene una secuencia de nucleótidos reconocida como un sitio de unión por la proteína de unión a ADN. Por lo tanto, tras la transformación de una célula bacteriana adecuada y la expresión de la proteína de fusión, la proteína se unirá al plásmido que la produjo. Las células bacterianas se lisan después y las proteínas de fusión se ensayan para una actividad biológica dada. Además, cada proteína de fusión permanece asociada con el ácido nucleico que la codifica; por lo tanto, a través de la amplificación de ácido nucleico y de la secuenciación de la porción de ácido nucleico de los complejos de proteína-plásmido que se seleccionan para una caracterización adicional, puede determinarse la estructura exacta del compuesto candidato.

De forma similar, se han construido bibliotecas de presentación en bacteriófago mediante la clonación de oligonucleótidos aleatorios dentro de una porción de un gen que codifica una o más de las proteínas de cubierta de fago. Tras el ensamblaje de las partículas de fago, los polipéptidos aleatorios también miran hacia fuera para la exploración. Como en el sistema descrito previamente, las partículas de fago contienen el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, de modo que la información de secuencia de nucleótidos que identifica al candidato a fármaco se une al propio fármaco. Dichas bibliotecas de expresión en fago se describen en, por ejemplo, Sawyer et al., Protein Engineering 4: 947-53, 1991; Akamatsu et al., J. Immunol. 151: 4651-59, 1993 y Dower et al., Patente de Estados Unidos N° 5.427.908.

Otras estrategias para crear bibliotecas combinatorias molecularmente diversas emplean métodos sintéticos químicos para hacer uso de componentes básicos atípicos o no biológicos en el ensamblaje de los compuestos a ensayar. Por lo tanto, Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37: 2678-85, 1994, describen la construcción de una biblioteca usando una diversidad de glicinas N-(sustituidas) para la síntesis de compuestos de tipo péptido denominados "peptoides". Las sustituciones se seleccionaron para proporcionar una serie de sustituciones aromáticas, una serie de sustituciones laterales hidroxiladas y un conjunto diverso de sustituciones incluyendo estructuras ramificadas, amino y heterocíclicas.

Otra estrategia implica sintetizar químicamente las bibliotecas combinatorias en soportes sólidos de una forma metódica y predeterminada, de modo que la colocación de cada miembro de la biblioteca proporcione información en relación con la estructura sintética de ese compuesto. Los ejemplos de dichos métodos se describen, por ejemplo, en Geysen, Patente de Estados Unidos N° 4.833.092, en la que se sintetizan compuestos en clavijas de polietileno funcionalizadas diseñadas para ajustarse a una placa de microtitulación de 96 pocillos de modo que la posición de la clavija proporcione al investigador información en relación con la estructura del compuesto. De forma similar, Hudson et al., Publicación PCT N° W094/05394, describen métodos para la construcción de bibliotecas combinatorias de biopolímeros, tales como polipéptidos, oligonucleótidos y oligosacáridos, en una placa en fase sólida espacialmente abordable recubierta con una película de polímero funcionalizado. En este sistema, los compuestos se sintetizan y se exploran directamente en la placa. El conocimiento de la posición de un compuesto dado en la placa produce información en relación con la naturaleza y el orden de los componentes básicos que comprenden el compuesto. Pueden usarse métodos similares de construcción de bibliotecas combinatorias abordables para la síntesis de compuestos distintos de biopolímeros.

Otra estrategia ilustrativa más ha sido el uso de grandes cantidades de perlas derivatizadas muy pequeñas, que se dividen en tantas porciones equivalentes como diferentes componentes básicos existen. En la primera etapa de la síntesis, cada una de estas porciones se hace reaccionar con un componente básico diferente. Después, las perlas se mezclan minuciosamente y de nuevo se dividen en el mismo número de porciones equivalentes. En la segunda etapa de la síntesis cada porción, que contiene ahora teóricamente cantidades equivalentes de cada componente básico unidas a una perla, se hace reaccionar con un componente básico diferente. Las perlas se mezclan de nuevo y se separan, y el proceso se repite según se desee para dar un gran número de compuestos diferentes, conteniendo cada perla solamente un tipo de compuesto.

Esta metodología, denominada el método de “una perla un compuesto”, produce una mezcla de perlas, portando potencialmente cada perla un compuesto diferente. Por lo tanto, en este método las propias perlas no pueden considerarse “abordables” en el mismo sentido que en los soportes y matrices en fase sólida descritos anteriormente, o como en las bibliotecas de fago o celulares. Sin embargo, los compuestos presentados en la superficie de cada perla pueden ensayarse para determinar la capacidad para unirse con un compuesto específico y, si esas (típicamente) pocas perlas son capaces de identificarse y separarse de las otras perlas, puede recuperarse y analizarse una población presumiblemente pura de compuestos. Por supuesto, esta última posibilidad depende de la capacidad para cargar y extraer suficiente información en relación con los compuestos en la superficie de cada perla para ser susceptible a un análisis significativo posterior. Dicha información puede estar simplemente en forma de una cantidad adecuada del compuesto de interés para ser capaz de determinar su estructura. Por ejemplo, en el caso de un péptido, debe sintetizarse suficiente del péptido en la perla para ser capaz de realizar una secuenciación de péptido y obtener la secuencia de aminoácidos del péptido.

Como se ha descrito anteriormente, la construcción de bibliotecas combinatorias permite explorar un amplio número de compuesto de ensayo para determinar la capacidad para modular la unión de Esclerostina (Beer) a Nogina o Cordina.

Un método de exploración común aplicado en la actualidad consiste en recubrir un soporte sólido, tal como los pocillos de una placa de microtitulación, con la molécula específica para la que se busca un compañero de unión. Los compuestos miembros de la biblioteca se marcan después, se ponen en placas sobre el soporte sólido y se deja que se unan a los miembros de la biblioteca. Después de una etapa de lavado, los complejos de compañero de unión se detectan entonces por detección del marcador unido a los miembros de la biblioteca unidos. Este tipo de procedimiento es particularmente apropiado para bibliotecas combinatorias en las que los compuestos miembros se proporcionan en una solución o medio. Este método puede ser algo laborioso y, para conseguir el alto rendimiento necesario para explorar dichas grandes cantidades de compuestos de ensayo, puede requerir como primera etapa explorar combinaciones de compuestos de ensayo, seguida de una o más etapas de reexploración para identificar específicamente el compuesto de interés. La situación también puede revertirse, de modo que se deja que los miembros de la biblioteca recubran pocillos individuales y se sondan con la molécula específica.

En casos en los que la biblioteca combinatoria va a contener análogos de anticuerpo o péptidos dirigidos a un epítipo dado, los miembros de la biblioteca pueden contener una porción de un anticuerpo reconocida por un anticuerpo secundario capaz de detectarse, por ejemplo, en un ensayo inmunológico ligado a enzimas (ELISA) o en virtud de estar directa o indirectamente marcado, por ejemplo, con un radionúclido, un compuesto quimioluminiscente, un flúor, y una enzima o colorante.

Tawfik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 373-77, 1993, describen un método de exploración de una biblioteca de anticuerpos (en este caso, de una biblioteca de hibridoma generada usando un mimético del intermedio de estado de transición de una reacción enzimática) para la presencia de anticuerpos poco frecuentes que tengan una actividad catalítica deseada. El compuesto de exploración, en este caso el sustrato enzimático, se inmovilizó en placas de microtitulación de 96 pocillos. Los sobrenadantes de cada clon se pusieron en pocillos separados en condiciones que promueven la reacción enzimática. Los productos de la reacción enzimática, todavía inmovilizados en la placa de microtitulación, se ensayaron mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos de producto. De nuevo, este tipo de proceso de exploración es bastante laborioso y puede requerir la exploración repetitiva de



combinaciones de compuestos de ensayo para conseguir un alto rendimiento de bibliotecas grandes.

En las bibliotecas de presentación en fago o celulares y bibliotecas sintéticas de “una perla un compuesto” descritas anteriormente, los miembros de la biblioteca pueden explorarse para determinar la capacidad para unirse a un compañero de unión específico (por ejemplo, un receptor) que esté marcado con un flúor detectable, tal como fluoresceína o ficoeritrina. Debido a que cada partícula (por ejemplo, una célula o una perla) presenta solamente una especie de compuesto de ensayo, las partículas marcadas fluorescentemente pueden detectarse y clasificarse usando un separador de células activadas por fluorescencia (FACS). Después, puede volver a explorarse una población enriquecida de perlas o partículas positivas si es necesario, y analizarse individualmente. Esta estrategia puede emplearse usando células que presenten los compuestos de ensayo o perlas en las que se sintetizan los compuestos de ensayo.

Ciertos métodos de la presente invención utilizan matrices para realizar el proceso de exploración. El uso de matrices hace posible aumentar enormemente el rendimiento de la muestra. Estructuralmente, la matriz se forma típicamente en un soporte sólido que incluye múltiples elementos o sitios. En la exploración de métodos de la presente invención, cada elemento de la matriz incluye una trayectoria de señal tal como una línea de transmisión a la que una diana proteica o ligando se acopla electromagnéticamente o se une directamente. En muchos ensayos de exploración, el objetivo es explorar una gran cantidad de compuestos contra una diana proteica. Por lo tanto, en dichos métodos, todas las dianas proteicas localizadas dentro de cualquier elemento, así como todas las dianas en elementos diferentes, son iguales. Cada elemento se pone en contacto con diferentes muestras, conteniendo cada muestra un compuesto diferente. De este modo, es posible explorar los diferentes compuestos en una biblioteca con una diana común.

En otros métodos, sin embargo, puede ser deseable que todas las dianas proteicas en cualquier elemento particular sean las mismas, pero que las dianas proteicas en elementos diferentes varíen entre sí. Esto permite que un ligando o grupo de ligandos de ensayo se explore contra varias dianas proteicas diferentes. Así, por ejemplo, asumiendo que se usan diez inhibidores de proteasa diferentes como dianas, la matriz incluiría preferentemente diez filas o columnas de elementos, teniendo cada elemento una proteasa diferente.

Independientemente de la identidad de las dianas en los diversos elementos de la matriz, una señal se lanza hacia la trayectoria de señal que se está ejecutando para cada elemento para controlar la unión en cada uno de los diversos elementos. Se usan modulaciones en la señal lanzada para detectar la unión entre la diana y un ligando en la muestra. Puede usarse una matriz junto con un dispositivo microfluído para añadir de forma controlable microcantidades de diferentes muestras a las diferentes matrices. En la situación en la que todas las dianas son idénticas, típicamente el dispositivo fluído se usa para dispensar diferentes muestras a las diversas matrices; mientras que cuando la diana proteica en los diversos elementos varía, el dispositivo fluído dispensa la misma muestra a los diferentes elementos de las matrices.

Algunos métodos utilizan matrices sintetizadas en un soporte sólido como se ha descrito anteriormente. En ciertos métodos, es posible centrar el proceso de exploración hacia ligandos que tengan más probablemente una actividad biológica deseada utilizando la secuencia de un ligando que se sabe que se une a la diana proteica de interés (una “secuencia candidata”) para informar sobre la selección de secuencias sintetizadas en la matriz a usar en rondas de exploración posteriores. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.770.456. Por lo tanto, se sintetizan una serie de ligandos relacionados con la secuencia candidata realizando variaciones sistémicas en una o más posiciones de la secuencia candidata. La teoría es que alteraciones minoritarias de una secuencia (por ejemplo, un péptido) que se sabe que se une a una proteína diana pueden dar como resultado una secuencia con una afinidad de unión incluso superior.

El número de elementos en una matriz varía ampliamente, basándose principalmente en el tipo de aplicación de exploración para la que se va a usar la matriz. En las fases iniciales de exploración de una biblioteca, por ejemplo, se prefieren un gran número de elementos, de modo que puedan explorarse rápidamente un gran número de compuestos. Las matrices para dichas aplicaciones pueden tener hasta  $10^6$  elementos. En otros casos, hay hasta  $10^3$  elementos en la matriz. En otros métodos más, puede haber solamente un único elemento, tal como cuando se desea realizar estudios de mayor resolución con un compuesto que parece ser desde las rondas de exploración iniciales un buen candidato para un compuesto candidato que tenga un valor terapéutico potencial. Por lo tanto, en general, el número de elementos en la matriz puede ser de 1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  ó  $10^8$ , o cualquier número o intervalo entre los mismos.

La densidad de la diana proteica o ligandos que componen la matriz también puede variar significativamente. La densidad necesaria varía según diversos factores tales como el grado de sensibilidad de señal, el número de ligandos en solución y si los picos característicos para un complejo particular bajo estudio están bien definidos y se resuelven a partir de señales de otros complejos. En la situación óptima, la sensibilidad del presente sistema y la capacidad para realizar análisis usando señales que se sabe que están correlacionadas con ciertos complejos significan que un elemento puede contener una sola diana proteica o ligando. En otras situaciones, sin embargo, la densidad de dianas proteicas o ligandos puede ser de hasta 100 dianas/cm<sup>2</sup>. En otros métodos más, la densidad puede ser de hasta  $10^8$  dianas/cm<sup>2</sup>, hasta  $10^{12}$  dianas/cm<sup>2</sup> y hasta  $10^{18}$  dianas/cm<sup>2</sup>.

Es posible a través del uso de matriz y tecnología microfluida usar los métodos descritos en la presente memoria en un proceso de exploración de alto rendimiento (HTS). En dicha estrategia, se exploran cientos de miles de compuestos para determinar su capacidad para unirse a una diana particular, o se exploran de acuerdo con los mayores niveles de análisis descritos anteriormente. Por ejemplo, la invención descrita en la presente memoria puede miniaturizarse, de modo que pueden realizarse plataformas de exploración altamente paralelas; plataformas que son capaces de explorar cientos o miles de compuestos simultáneamente y al mismo tiempo determinar el efecto de unión (por ejemplo, agonista o antagonista), la afinidad, la cinética, etc.

También se hace referencia a métodos para seleccionar y/o aislar compuestos que sean capaces de aumentar la densidad ósea. Por ejemplo, se hace referencia a métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de aumentar el contenido mineral óseo, que comprenden las etapas de (a) mezclar una molécula seleccionada con proteína de unión a TGF-beta y un miembro seleccionado de la familia de proteínas de TGF-beta, (b) determinar si la molécula seleccionada estimula la señalización por la familia de proteínas de TGF-beta o inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas de TGF-beta. Dentro de ciertos casos, la molécula aumenta la capacidad de TGF-beta para funcionar como un regulador positivo de la diferenciación de células mesenquimales.

También se hace referencia a métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de aumentar el contenido mineral óseo, que comprenden las etapas de (a) exponer una molécula seleccionada a células que expresan la proteína de unión a TGF-beta y (b) determinar si la actividad (o expresión) de la proteína de unión a TGF-beta de las células expuestas disminuye y, a partir de eso, determinar si el compuesto es capaz de aumentar el contenido mineral óseo. Dentro de un caso, las células se seleccionan del grupo que consiste en el hueso humano normal espontáneamente transformado o no transformado de biopsias de hueso y osteoblastos de hueso parietal de rata. Dichos métodos pueden efectuarse en una amplia diversidad de formatos de ensayo incluyendo, por ejemplo, Inmuno-Electroforesis Contracorriente (CIEP), Radioinmunoensayos, Radioinmunoprecipitaciones, Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas (ELISA), ensayos de Transferencia Puntual, ensayos de Inhibición o Competición y ensayos de tipo sándwich (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.376.110 y 4.486.530; véase también Antibodies: A Laboratory Manual, anteriormente).

Se proporcionan realizaciones representativas de dichos ensayos en la Patente de Estados Unidos N° 6.395.511. En resumen, un miembro de la familia de la superfamilia de TGF-beta o una proteína de unión a TGF-beta se une primero a una fase sólida, seguido de la adición de una molécula candidata. El miembro de la familia marcado de la superfamilia de TGF-beta o una proteína de unión a TGF-beta se añade después al ensayo, se lava la fase sólida y la cantidad de miembros de la superfamilia de TGF-beta unidos o marcados o proteína de unión a TGF-beta en el soporte sólido se determina. Las moléculas que son adecuadas para su uso en el aumento del contenido mineral óseo como se describen en la presente memoria son las moléculas que disminuyen la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro o miembros de la superfamilia de TGF-beta de una forma estadísticamente significativa. Los ensayos adecuados para su uso dentro de la presente invención no tienen que limitarse a las realizaciones descritas en la presente memoria y en la Patente de Estados Unidos N° 6.395.511. En particular, pueden alterarse numerosos parámetros, tales como por unión de TGF-beta a una fase sólida o por eliminación de una fase sólida en su totalidad.

También se hace referencia a métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de aumentar el contenido mineral óseo, que comprenden las etapas de (a) exponer una molécula seleccionada a células que expresan TGF-beta y (b) determinar si la actividad de TGF-beta de las células expuestas está modulada y, a partir de eso, determinar si el compuesto es capaz de aumentar el contenido mineral óseo. De forma similar a los métodos descritos anteriormente, pueden utilizarse una amplia diversidad de métodos para evaluar los cambios de la expresión de proteína de unión a TGF-beta debido a un compuesto de ensayo seleccionado.

Por ejemplo, se hace referencia a métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de aumentar el contenido mineral óseo, que comprenden las etapas de (a) mezclar una molécula seleccionada con proteína de unión a TGF-beta y un miembro seleccionado de la familia de proteínas de TGF-beta, (b) determinar si la molécula seleccionada regula positivamente la señalización de la familia de proteínas de TGF-beta o inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a la familia de proteínas de TGF-beta. Dentro de ciertos casos, la molécula aumenta la capacidad de TGF-beta para funcionar como un regulador positivo de la diferenciación de células mesenquimales.

De forma similar a los métodos descritos anteriormente, pueden utilizarse una amplia diversidad de métodos para evaluar la estimulación de TGF-beta debida a un compuesto de ensayo seleccionado. Un método representativo de este tipo se proporciona a continuación en la Patente de Estados Unidos N° 6.395.511 (véase también Durham et al., Endo. 136: 1374-1380).

También se hace referencia a métodos para determinar si una molécula seleccionada es capaz de aumentar el contenido mineral óseo, que comprenden la etapa de determinar si una molécula seleccionada inhibe la unión de proteína de unión a TGF-beta a hueso o un análogo del mismo. Como se utiliza en la presente memoria, debería entenderse que el hueso o análogos del mismo se refieren a hidroxipatita, o como superficie compuesta por una forma de hueso en polvo, hueso triturado o hueso intacto. De forma similar a los métodos descritos anteriormente, pueden utilizarse una amplia diversidad de métodos para evaluar la inhibición de la localización de proteína de unión

a TGF-beta en la matriz ósea. Un método representativo de este tipo se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.395.511.

La molécula seleccionada también puede estar contenida dentro de una mezcla de compuestos. Por lo tanto, los métodos enumerados pueden comprender además la etapa de aislar una molécula que inhiba la unión de proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de TGF-beta.

Composiciones farmacéuticas. Además, la presente solicitud se refiere a la formulación de uno o más de polinucleótido, polipéptido, anticuerpo, antisentido u otras composiciones descritas en la presente memoria, en vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en los ensayos descritos en la presente memoria.

Se entenderá que, si se desea, una composición como se describe en la presente memoria puede administrarse en combinación con otros agentes así como, tal como, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. De hecho, prácticamente no existen límites respecto a otros componentes que también pueden incluirse, con tal de que los agentes adicionales no causen un efecto adverso significativo tras el contacto con las células diana o tejidos del hospedador. Las composiciones pueden administrarse por lo tanto junto con diversos otros agentes según sea necesario en el caso particular. Dichas composiciones pueden purificarse a partir de células hospedadoras u otras fuentes biológicas, o como alternativa pueden sintetizarse químicamente como se describe en la presente memoria. Asimismo, dichas composiciones pueden comprender además composiciones de ARN o ADN sustituidas o derivatizadas.

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria, en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

Aunque puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la materia en las composiciones farmacéuticas de esta invención, el tipo de vehículo variará típicamente dependiendo del modo de administración. Pueden formularse composiciones de la presente invención para cualquier forma de administración apropiada, incluyendo, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, mucosa, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular.

Los vehículos para su uso dentro de dichas composiciones farmacéuticas son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables. En ciertas realizaciones, la formulación proporciona preferentemente un nivel relativamente constante de liberación de componente activo. En otras realizaciones, sin embargo, puede desearse una velocidad de liberación más rápida inmediatamente tras la administración. La formulación de dichas composiciones está bien dentro del nivel de especialidad en la materia usando técnicas conocidas. Los vehículos ilustrativos útiles a este respecto incluyen micropartículas de poli(lactida-co-glicolida), poliacrilato, látex, almidón, celulosa, dextrano y similares. Otros vehículos de liberación retardada ilustrativos incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrófilo no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido reticulado) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfífilo, tal como un fosfolípido (véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.151.254 y las solicitudes PCT WO 94/20078, WO/94/23701 y WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implantación, la velocidad y la duración esperada de la liberación, y la naturaleza de la afección a tratar o prevenir.

En otra realización ilustrativa, se emplean microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato poliglicolato) como vehículos para las composiciones de esta invención. Se describen microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las Patente de Estados Unidos N° 4.897.268; 5.075.109; 5.928.647; 5.811.128; 5.820.883; 5.853.763; 5.814.344, 5.407.609 y 5.942.252. También serán útiles para muchas aplicaciones sistemas transportadores de proteína de núcleo de hepatitis B modificados, tal como se describe en el documento WO/99 40493 y referencias citadas en el mismo. Otros sistema de transporte/administración ilustrativo emplea un vehículo que comprende complejos de proteínas particulados, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.928.647, que son capaces de inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos restringidas por clase I en un hospedador.

En otra realización ilustrativa, se emplean partículas de núcleo de fosfato de calcio como vehículos o como matrices de liberación controlada para las composiciones de esta invención. Se describen partículas de fosfato de calcio ejemplares, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada N° WO/0046147.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenderán además con frecuencia uno o más tampones (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio), solutos que hacen que la formulación sea isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden formularse como un liofilizado.

El desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para el uso de las composiciones particulares descritas en la presente memoria en una diversidad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular, es bien conocido en la técnica, algunos de los cuales se analizan brevemente a continuación con fines ilustrativos generales.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden administrarse mediante administración oral a un animal. Como tales, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsulas de gelatina de carcasa dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta.

En determinadas circunstancias, será deseable administrar las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria por vía parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal. Dichas estrategias son bien conocidas por los expertos en la materia, algunas de las cuales se describen adicionalmente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.543.158; la Patente de Estados Unidos N° 5.641.515 y la Patente de Estados Unidos N° 5.399.363. En ciertas realizaciones, las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua convenientemente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contendrán generalmente un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil aplicación con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede facilitarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización, para la administración parenteral en una solución acuosa, la solución debería estar convenientemente tamponada si es necesario, y el diluyente líquido volverse primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la materia conocerán un medio acuoso estéril que puede emplearse a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª ed., págs. 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente cierta variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto a tratar. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones satisfarán preferentemente por supuesto las normas de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales requeridas por la FDA Office of Biologics standards.

En otra realización de la invención, las composiciones descritas en la presente memoria pueden formularse en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandálico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden proceder de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz.

Los vehículos pueden comprender además cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, tampones, soluciones transportadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos complementarios en las composiciones. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano.

En ciertas realizaciones, se usan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas lipídicas, vesículas y similares para la introducción de las composiciones de la presente invención en células/organismos hospedadores

adecuados. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similares. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden unirse, covalentemente o no covalentemente a la superficie de dichos vehículos transportadores.

La formulación y uso de liposomas y preparaciones de tipo liposoma como vehículos farmacológicos potenciales se conocen en general por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Lasic, Trends Biotechnol. 16(7): 307-21, 1998; Takakura, Nippon Rinsho 56(3): 691-95, 1998; Chandran et al., Indian J. Exp. Biol. 35(8): 801-09, 1997; Margalit, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 12(2-3): 233-61, 1995; Patente de Estados Unidos N° 5.567.434; Patente de Estados Unidos N° 5.552.157; Patente de Estados Unidos N° 5.565.213; Patente de Estados Unidos N° 5.738.868 y Patente de Estados Unidos N° 5.795.587, incorporándose cada uno específicamente en la presente memoria por referencia en su totalidad).

Se han usado con éxito liposomas con varios tipos celulares que normalmente son difíciles de transfectar mediante otros procedimientos, incluyendo suspensiones de células T, cultivos de hepatocitos primarios y células PC 12 (Renneisen et al., J. Biol. Chem. 265(27): 16337-42, 1990; Muller et al., DNA Cell Bio. 9(3): 221-20, 1990). Además, los liposomas están libres de las limitaciones de longitud de ADN que son típicas de sistemas de administración basados en virus. Los liposomas se han usado eficazmente para introducir genes, diversos fármacos, agentes radioterapéuticos, enzimas, virus, factores de transcripción, efectores alostéricos y similares, en una diversidad de líneas celulares cultivadas y animales. Además, el uso de liposomas no parece estar asociado con respuestas autoinmunes o una toxicidad inaceptable después de la administración sistémica.

En ciertas realizaciones, los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilaminares (también denominadas vesículas multilaminares (MLV)).

Como alternativa, en otras realizaciones, la invención proporciona formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de una forma estable y reproducible (véase, por ejemplo, Quintanar-Guerrero et al., Drug Dev. Ind. Pharm. 24(12): 1113-28, 1998). Para evitar efectos secundarios debido a una sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ ) pueden diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Dichas partículas pueden generarse como se ha descrito, por ejemplo, por Couver et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 5(1): 1-20, 1988; zur Muhlen et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 45(2): 149-55, 1998; Zambaux et al., J. Controlled Release 50(1-3): 31-40, 1998; y Patente de Estados Unidos N° 5.145.684.

Métodos de Tratamiento. También se hace referencia a métodos para aumentar el contenido mineral y la densidad mineral del hueso. En resumen, numerosas afecciones dan como resultado la pérdida de contenido mineral óseo, incluyendo, por ejemplo, enfermedad, predisposición genética, accidentes que dan como resultado la falta de uso de hueso (por ejemplo, debido a una fractura), agentes terapéuticos que efectúan la resorción ósea, o que destruyen células formadoras de hueso, y el envejecimiento normal. A través del uso de las moléculas descritas en la presente memoria que inhiben la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de TGF-beta dichas afecciones pueden tratarse o prevenirse. Como se utiliza en la presente memoria, debería entenderse que el contenido mineral óseo se ha aumentado si el contenido mineral óseo se ha aumentado de una forma estadísticamente significativa (por ejemplo, superior a media desviación típica), en un sitio seleccionado.

Pueden tratarse una amplia diversidad de afecciones que dan resultado la pérdida de contenido mineral óseo. Los pacientes con dichas afecciones pueden identificarse a través del diagnóstico clínico utilizando técnicas bien conocidas (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, Inc.). Los ejemplos representativos de enfermedades que pueden tratarse incluían displasias, en las que existe un crecimiento o desarrollo anormal de hueso. Los ejemplos representativos de dichas afecciones incluyen acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, Marfan, exostosis múltiple hereditaria, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, fracturas, enfermedad periodontal, pseudoartrosis y osteomielitis piogénica.

Otras afecciones que pueden tratarse o prevenirse incluyen una amplia diversidad de causas de osteopenia (es decir, una afección que cause más de una desviación típica de contenido de mineral óseo o una densidad por debajo del contenido mineral esquelético máximo en jóvenes). Los ejemplos representativos de dichas afecciones incluyen estados anémicos, afecciones causadas por esteroides, afecciones causadas por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis idiopática, osteopenia u osteoporosis congénita, alcoholismo, enfermedad hepática crónica, senilidad, estado post-menopáusico, oligomenorrea, amenorrea, gestación, diabetes mellitus, hipertiroidismo, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional transitoria y osteomalacia. Otras afecciones incluyen afecciones inflamatorias asociadas con pérdida de hueso, tales como artritis reumatoide.

El contenido o la densidad mineral ósea pueden aumentarse por administración a un animal de sangre caliente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que inhibe la unión de proteína de unión a TGF-beta a un

miembro de la familia de TGF-beta. Los ejemplos de animales de sangre caliente que pueden tratarse incluyen tanto vertebrados como mamíferos, incluyendo por ejemplo, seres humanos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, perros, gatos, ratas y ratones. Los ejemplos representativos de moléculas terapéuticas incluyen ribozimas, genes de ribozimas, oligonucleótidos antisentido y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos humanizados).

También se hace referencia a métodos para aumentar la densidad ósea que comprenden la etapa de introducir en células que se alojan en el hueso un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la unión de la proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de TGF-beta, y administrar las células que contienen vector a un animal de sangre caliente. En resumen, las células que se alojan en el hueso pueden obtenerse directamente del hueso de pacientes (por ejemplo, células obtenidas de la médula ósea, tales como CD34+, osteoblastos, osteocitos y similares), de sangre periférica o de cultivos.

Un vector que dirige la expresión de una molécula que inhibe la unión de proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de TGF-beta se introduce en las células. Los ejemplos representativos de vectores adecuados incluyen vectores virales tales como vectores de herpesvirus (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.288.641), vectores adenovirales (por ejemplo, documentos WO 94/26914, WO 93/9191; Kolls et al., PNAS 91 (1): 215-219; 1994; Kass-Eisler et al., PNAS 90(24): 11498-502, 1993; Guzman et al., Circulation 88(6): 2838-48, 1993; Guzman et al., Cir. Res. 73(6): 1202-1207, 1993; Zabner et al., Cell 75(2): 207-216, 1993; Li et al., Hum Gene Ther. 4(4): 403-409, 1993; Caillaud et al., Eur. J. Neurosci. 5(10): 1287-1291, 1993; Vincent et al., Nat. Genet. 5(2): 130-134, 1993; Jaffe et al., Nat. Genet. 1(5): 372-378, 1992; y Levrero et al., Gene 101 (2): 195-202, 1991), vectores virales adenoasociados (documento WO 95/13365; Flotte et al., PNAS 90(22): 10613-10617, 1993), vectores de baculovirus, vectores de parvovirus (Koering et al., Hum. Gene Therap. 5: 457-463, 1994), vectores de poxvirus (Panicali y Paoletti, PNAS 79: 4927-4931, 1982; y Ozaki et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193(2): 653-660, 1993) y retrovirus (por ejemplo, documentos EP 0.415.731; WO 90/07936; W091/0285, W094/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; Patente de Estados Unidos N° 5.219.740; documentos WO 93/11230; WO 93/10218). Asimismo, pueden construirse vectores virales que contienen una mezcla de diferentes elementos (por ejemplo, promotores, secuencias de envuelta y similares) de diferentes virus o fuentes no virales. Dentro de diversos casos, el propio vector viral o una partícula viral que contiene el vector viral puede utilizarse los métodos y composiciones descritos a continuación.

Dentro de otros casos, las propias moléculas de ácido nucleico que codifican una molécula que inhibe la unión de proteína de unión a TGF-beta a un miembro de la familia de TGF-beta pueden administrarse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, la administración de asialoorosomucoide (ASOR) conjugado con complejos de ADN de poli-L-lisina (Cristano et al., PNAS 92122-92126, 1993), ADN unido a adenovirus destruidos (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3(2): 147-154, 1992), introducción mediada por citofectina (DMRIE-DOPE, Vical, California), inyección de ADN directa (Acsadi et al., Nature 352: 815-818, 1991); ligando de ADN (Wu et al., J. of Biol. Chem. 264: 16985-16987, 1989); lipofección (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417, 1989); liposomas (Pickering et al., Circ. 89(1): 13-21, 1994; y Wang et al., PNAS 84: 7851-7855, 1987); bombardeo de microproyectiles (Williams et al., PNAS 88: 2726-2730, 1991); y administración directa de ácidos nucleicos que codifican la propia proteína en solitario (Vile y Hart, Cancer Res. 53: 3860-3864, 1993) o utilizando complejos de PEG-ácido nucleico.

Los ejemplos representativos de moléculas que pueden expresarse mediante los vectores incluyen ribozimas y moléculas antisentido, cada uno de los cuales se han analizado en más detalle anteriormente.

La determinación de un contenido mineral óseo aumentado puede determinarse directamente, mediante el uso de rayos X (por ejemplo, Absorciometría de rayos X de Doble Energía o "DEXA"), o por inferencia a través de marcadores de renovación ósea (fosfatasa alcalina específica de osteoblastos, osteocalcina, propéptido de procolágeno C' tipo 1 (PICP) y fosfatasa alcalina total; véase Cornier, C., Cuff. Opin, in Rheu. 7: 243, 1995), o marcadores de la resorción ósea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopepida, hidroxiprolina urinaria, fosfatasa ácida resistente a tartato plasmático y galactosil hidroxilisina; véase, Cornier, anteriormente). La cantidad de masa ósea también puede calcularse a partir de los pesos corporales o utilizando otros métodos (véase Guinness-Hey, Metab. Bone Dis. y Rel. Res. 5: 177-181, 1984).

Como será evidente para un experto en la materia, la cantidad y la frecuencia de administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y gravedad de la indicación a tratar, la respuesta deseada, la afección del paciente, y así sucesivamente. Típicamente, las composiciones pueden administrarse mediante una diversidad de técnicas, como se ha señalado anteriormente.

Los Ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación.

## Ejemplos

## EJEMPLO 1

## 5 IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS PARA PROTEÍNAS DE UNIÓN A TGF-BETA

Las secuencias polipeptídicas para polipéptidos de unión a TGF-beta conocidos como proteínas esclerostina o Beer se han descrito previamente, al igual que los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, y composiciones y métodos relacionados para preparar proteínas esclerostina o Beer recombinantes aisladas (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.395.511; 6.489.445; 6.495.736). Las interacciones de unión de la proteína esclerostina ("Beer") con los miembros de la superfamilia de TGF-beta BMP-5 y BMP-6 se demostraron previamente como se ha descrito anteriormente.

Este Ejemplo describe la demostración de la asociación específica en complejos de proteína entre una proteína de unión a TGF-beta (esclerostina) y cualquiera de las proteínas antagonistas de proteína morfogenética ósea (BMP; por ejemplo, Schmitt et al., 1999 J. Orthopaed. Res. 17: 269) cordina (por ejemplo, SEC ID N°: 19-20) y nogina (por ejemplo, SEC ID N°: 17-18), usando resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Iemura et al., 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 9337). La cordina (por ejemplo, Reddi et al. 2001 Arthritis Research 3: 1; Oelgeschlager et al., 2000 Nature 405: 757), proteínas de nudo de cistina tales como nogina (por ejemplo, Groppe et al., 2002 Nature 420: 636) y la familia de proteínas de DAN diferente (incluyendo DAN, Cerberus y Gremlin; por ejemplo, Hsu et al., 1998, Mol. Cell 1: 673) representan tres clasificaciones generales de proteínas antagonistas de BMP secretadas que actúan extracelularmente (por ejemplo, Baemans et al., 2002 Dev. Biol. 250: 231). El alineamiento de secuencia de aminoácidos de esclerostina humana (Beer) con Cerberus, DAN y Gremlin mostró que a pesar de un armazón de cisteína altamente similar entre las cuatro proteínas, la esclerostina mostraba de otro modo escasa homología con los miembros de la familia de DAN (Fig. 1; véase también la Patente de Estados Unidos N° 6.395.511).

Análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore) de las interacciones de Esclerostina-BMP. Proteínas BMP recombinantes (R&D Systems, Inc., -Minneapolis, MN) se hidrataron a una concentración de 100 µg/ml en PBS (pH 7,3) con BSA de calidad de RIA 1 mg/ml (Sigma) y carboxil-metil dextrano 1 mg/ml (Fluka). El tampón de procesamiento para el análisis de Biacore era HBS-EP CMD (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, polisorbato 20 al 0,005% y carboxil-metil dextrano 1 mg/ml). Para el análisis cinético, se generaron microplacas detectoras CM5 (Biacore) con 200 y 400 unidades de respuesta de proteína de fusión de esclerostina humana purificada-FLAG® ("FLAG®-Beer", preparada como se describe en el documento U.S. 6.395.511), según se recomendaba por el fabricante de la microplaca. Las proteínas BMP se diluyeron en tampón de procesamiento y se inyectaron sobre la microplaca detectora usando el instrumento Biacore 3000. Los datos se procesaron usando el software Bia-evaluation (Biacore), corrigiendo primero por la unión de fondo en una celda de flujo no funcionalizada y analizando las curvas de unión resultantes para determinar las velocidades de asociación/disociación.

Para experimentos de competición, las BMP se mezclaron con anticuerpos de unión a BMP, proteínas antagonistas de BMP (DAN, Nogina, Cordina o gastrulación retorcida) o proteínas de fusión con Fc de receptor de BMP (todas las proteínas recombinantes excepto la esclerostina de R&D Systems) o con tampón solamente, antes de la inyección sobre la microplaca detectora. Después, estas mezclas se inyectaron sobre microplacas detectoras funcionalizadas con esclerostina (200 UR). Usando el software Bia-evaluation, las curvas de resonancia de plasmón superficial resultantes se compararon con las generadas por BMP inyectadas sin las proteínas competitivas y con BMP inyectadas con proteínas de control irrelevantes.

Interacciones de Esclerostina-Nogina y Esclerostina-Cordina. El tampón de procesamiento para el análisis de Biacore era HBS-EP CMD (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, polisorbato 20 al 0,005% y carboxil-metil dextrano 1 mg/ml). Para el análisis cinético, se generaron microplacas detectoras CM5 (Biacore) con 200 y 400 unidades de respuesta de esclerostina humana purificada-Flag, según se recomendaba por el fabricante de la microplaca. La proteína de fusión de nogina-Fc y la cordina se diluyeron en tampón de procesamiento y se inyectaron sobre la microplaca de esclerostina usando el instrumento Biacore. Los datos se procesaron usando el software Bia-evaluation, corrigiendo primero por la unión de fondo en una celda de flujo no funcionalizada y analizando las curvas de unión resultantes para determinar las velocidades de asociación/disociación.

Se realizó un ensayo de resonancia de plasmón superficial para examinar la unión de esclerostina a nogina por unión de una proteína de fusión de nogina-Fc a una microplaca de Biacore CM5 que estaba funcionalizada con un anticuerpo anti-Fc humano. La unión de esclerostina a nogina en este formato tenía una cinética similar a las observadas cuando la nogina se unía a la microplaca de Biacore CM5 funcionalizada con esclerostina.

Exploración para inhibidores de las interacciones de esclerostina-nogina y esclerostina-cordina usando resonancia de plasmón superficial (Biacore™). El tampón de procesamiento para el análisis de Biacore™ era HBS-EP CMD (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, polisorbato 20 al 0,005% y carboxil-metil dextrano 1 mg/ml). Para el análisis cinético, se generaron microplacas detectoras CM5 (Biacore) con 200 y 400 unidades de respuesta de esclerostina humana purificada-FLAG®, según se recomendaba por el fabricante. El comando de Biacore "coinjectar" se usó para inyectar las cantidades saturantes de una primera proteína de interacción con esclerostina

(BMP, nogina, cordina o anticuerpo anti-esclerostina) antes de la inyección de una segunda proteína de interacción candidata. Para determinar si una proteína de interacción era competitiva con otra, las curvas de unión de la proteína inyectada en segundo lugar (obtenidas restando la unión de la primera proteína de la curva de unión combinada de ambas proteínas) se compararon con la curva de unión de esa segunda proteína cuando se inyectaba en solitario, después de una inyección de tampón de procesamiento. Si las curvas de unión eran similares, las proteínas no se estaban uniendo competitivamente al polipéptido de esclerostina inmovilizado en la microplaca. Si la curva de unión de la segunda proteína se reducía enormemente después de la unión de la primera proteína a la microplaca, las proteínas se consideraban competitivas.

**Inmunoprecipitación.** Perlas de agarosa anti-FLAG® M2 (Sigma, St. Louis, MO) se lavaron tres veces con tampón IP (Tris 20 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM; Tritón-X 100 al 1%, β-mercaptoetanol 1,4 mM, glicerol al 10%) antes de la incubación durante 1 hora en presencia o ausencia de 4 µg de esclerostina-FLAG. Se eliminó la esclerostina-FLAG no unida por lavado con tampón IP. Las perlas y tubos se bloquearon para prevenir la unión inespecífica mediante una incubación de 30 minutos con BSA al 5% en PBS. La proteína de fusión de nogina-Fc se rehidrató de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se diluyó en tampón IP y se centrifugó en una microfuga a 4°C durante 10 minutos para eliminar la proteína agregada. Las soluciones de nogina se añadieron a las perlas con y sin esclerostina-FLAG y se incubaron durante de 2 horas a una noche a 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron 5 veces con tampón IP antes de la adición de tampón de carga de SDS PAGE. Las muestras se analizaron en un gel de SDS PAGE de Tris-glicina de gradiente del 10-20% (Novex), se transfirieron a nitrocelulosa y las transferencias de western se revelaron con anticuerpos anti-Fc humano.

**Resultados.** Usando resonancia de plasmón superficial (SPR) con polipéptido de esclerostina inmovilizado, se detectó la unión a esclerostina de BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6 y BMP-7 con cada interacción de unión que tenía una constante de unión ( $K_D$ ) en el intervalo nanomolar bajo (<10-15 nM), de acuerdo con las interacciones de unión de BMP con esclerostina ("Beer") como se ha determinado previamente (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.395.511). La Figura 6 muestra la demostración de SPR de la unión de BMP-6 humana a proteína de fusión de esclerostina humana inmovilizada en microplaca-FLAG® y a esclerostina de rata marcada con poli-histidina inmovilizada en microplaca. En la Figura 7, las capacidades relativas de varios anticuerpos monoclonales y policlonales anti-BMP-6 para bloquear la unión de BMP-6 a esclerostina inmovilizada en microplaca se compararon usando SPR. El ensayo de SPR para la unión de BMP-6 a esclerostina inmovilizada se usó para explorar para anticuerpos anti-esclerostina que fueran capaces de bloquear la unión de BMP-6 a esclerostina. Un anticuerpo candidato se inyectó primero en el instrumento de SPR en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la unión a la esclerostina inmovilizada en microplaca. La BMP-6 se inyectó posteriormente y su capacidad para unirse a esclerostina se evaluó, como se muestra en la Figura 8.

Cuando se realizó el ensayo de SPR usando esclerostina humana recombinante inmovilizada en microplaca (Beer) e inyecciones de concentraciones graduadas de cordina murina recombinante o nogina murina recombinante, se observó que cada una de las proteínas antagonistas de BMP (cordina y nogina) se unía a esclerostina, como se muestra en la Figura 2. La  $K_D$  para la unión de cordina-esclerostina era de 1,76 nM (Fig. 2A); la  $K_D$  para la unión de nogina-esclerostina era de 2,92 nM (Fig. 2B). La unión a esclerostina por nogina (Fig. 9A) o cordina (Fig. 9B) se inhibió en el ensayo de SPR inyectando primero un anticuerpo policlonal anti-esclerostina en el instrumento de SPR en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la unión a la esclerostina inmovilizada en microplaca.

La confirmación de la unión de nogina a esclerostina mediante una metodología independiente se consiguió por inmunoprecipitación con perlas anti-FLAG® que se precargaron con esclerostina marcada con FLAG®, se lavaron y después se expusieron a proteínas de fusión de nogina-Fc. Como se muestra en la Figura 3, la proteína de fusión de nogina era detectable mediante análisis de inmunotransferencia de western usando anti-Fc en perlas precipitadas que se precargaron con FLAG®-esclerostina, pero la nogina no se detectaba en perlas precipitadas que se precargaron de forma simulada con tampón solamente.

Para determinar si los antagonistas de BMP nogina y cordina compiten con BMP por la unión a esclerostina, se realizaron ensayos de SPR usando esclerostina inmovilizada en microplaca con BMP-6 y exponiéndose los antagonistas de BMP a esclerostina de forma secuencial (Fig 4A) o después de una etapa de premezcla (Fig. 4B). Como se muestra en la Fig 4A, la saturación de esclerostina inmovilizada con BMP-6 en fase fluida antes de la inyección de nogina impedía la unión de nogina a esclerostina, sugiriendo la unión competitiva de BMP-6 y nogina a esclerostina. La Fig. 4B muestra que la nogina en solitario se unía a esclerostina inmovilizada en microplaca, mientras que la preincubación de nogina con BMP-6 antes de la inyección daba como resultado una escasa unión detectable de cualquier proteína a esclerostina. Se obtuvieron resultados similares mediante una comparación de la unión relativa a esclerostina de cordina en solitario, o de forma secuencial después de la inyección de BMP-6, como se muestra en la Fig. 5<sup>a</sup>, donde la inyección previa de cantidades saturantes de BMP-6 impedía la unión a esclerostina de la cordina inyectada posteriormente. La Figura 5B muestra los resultados de un experimento de premezcla. El análisis de inmunoprecipitación con esclerostina inmovilizada en perlas de la cordina murina recombinante que se usó, según se obtuvo del proveedor (R&D Systems), indicó que una variedad de productos de degradación polipeptídicos derivados de cordina, pero aparentemente no el polipéptido de cordina intacto de longitud completa (aproximadamente 100 kDa), podían detectarse (por inmunotransferencia de western usando anticuerpos



anti-cordina) como ligandos de esclerostina unidos específicamente recuperables. Entre los polipéptidos derivados de cordina recuperados estaba una especie que migraba en la electroforesis en gel desnaturalizante con una masa de aproximadamente 25 kDa, así como una variedad de polipéptidos de menor y mayor tamaño. Un análisis de inmunoprecipitación similar para caracterizar polipéptidos de nogina que se unían específicamente a esclerostina inmovilizada en perlas indicó que podía recuperarse nogina no degradada (por ejemplo, longitud completa) como un ligando de esclerostina.

En un ensayo basado en células de la actividad de BMP-6, según se midió por determinación de la actividad de fosfatasa alcalina inducible en células C3H10T o C3H10T $\frac{1}{2}$  (por ejemplo, Ahrens et al., 1993 DNA Cell Biol. 12(10): 871), la cordina era capaz de bloquear la inducción de la fosfatasa por BMP-6. Por separado, se detectó nogina en inmunoprecipitados preparados por reacción de un anticuerpo anti-esclerostina con lisados de una línea celular de osteosarcoma que sobreexpresa esclerostina.

## EJEMPLO 2

### ENSAYOS DE CÉLULAS MESENQUIMALES

Una pequeña población de células mesenquimales/estromales pluripotentes, denominadas células osteoprogenitoras inducibles, puede inducirse para diferenciarse en células osteoblásticas (Pittenger, MF et al., Science, 284: 143 (1999)). Estas células osteoprogenitoras inducibles desarrollan y expresan ciertos marcadores fenotípicos de una forma secuencial definida (Pockwinse, S et al., 1992 J Cell Biochem 49: 310; Lian, JB et al. 1999 en Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 4ª edición, MJ Favus (ed), Lippincott, Philadelphia, pág. 14.). Las células osteoprogenitoras expresan colágeno de tipo I, mientras que los preosteoblastos comprometidos y los osteoblastos expresan muchos de los marcadores fenotípicos que se identifican típicamente con una célula del linaje osteoblástico. Estos marcadores incluyen colágeno de tipo I, fosfatasa alcalina, receptor de hormona paratiroidea (PTHr) y osteopontina. En la fase terminal de la diferenciación de osteoblastos, los osteocitos están rodeados por depósitos de minerales, así como proteínas de la matriz tales como CD44 y osteocalcina. Por lo tanto, el desarrollo, crecimiento y diferenciación de células precursoras osteoblásticas en osteoblastos maduros se produce de una forma definida dependiente del tiempo (Pockwinse, S et al., 1992 J Cell Biochem 49: 310).

Las células mesenquimales humanas primarias, osteoblastos humanos primarios y los medios correspondientes están disponibles en Biowhittaker (Walkersville, MD). Las células C3H10T1/2 mesenquimales de ratón están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) (Nº de Depósito de la ATCC CCL-226). A medida que los osteoblastos inmaduros se diferencian y se vuelven capaces de mineralización, expresan marcadores asociados con el fenotipo de osteoblasto (colágeno de tipo I y receptor de hormona paratiroidea (PTHr)). Estos marcadores se usan para determinar si se ha producido la diferenciación. Las células mesenquimales humanas y los osteoblastos humanos primarios se siembran en placas en medio de cultivo normal que contiene FCS al 2% a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Se añaden reactivos de ensayo individualmente o en combinación al día siguiente. Los cultivos se continúan durante 24 a 120 h, después de las cuales las células se recogen para el aislamiento del ARN. Las células hMSC sin tratar expresarán claramente colágeno de tipo I, con niveles insignificantes de PTHr y SOST. Dichos resultados indican que las células hMSC sin tratar están en una fase temprana de linaje osteoblástico, pero están comprometidas con la osteoblastogénesis. El tratamiento de estas células con DEX, proteínas morfogenéticas óseas, IGF-1 (IGF-1 a 50 ng/ml) o el cultivo a largo plazo en medios de inducción de osteoblastos adelantarán la fase de diferenciación e inducirán la expresión de PTHr.

Para determinar el efecto de un agente identificado en la presente memoria sobre células mesenquimales humanas, se siembran células hMSC en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de inducción de osteoblastos. El agente se prepara en un vehículo apropiado y se añade un volumen equivalente de medios acondicionados de Sf9 (Control) a cultivos de células hMSC a diversos tiempos después de la siembra en placa (1 día, 8 días, 15 días o 21 días). Los efectos del agente sobre la diferenciación osteoblástica se evalúan midiendo la actividad de fosfatasa alcalina (ALP, determinada en capas de células usando tampón de DEAA (Pierce) que contiene NP-40 al 0,5% y p-nitrofenilfosfato 10 mM), síntesis de colágeno de tipo I (ELISA de Prolágeno C) y deposición de calcio para mineralización (ensayo colorimétrico de lisados ácidos de capas de células, Sigma).

Para determinar los efectos de un agente identificado en la presente memoria sobre células C3H10T1/2 mesenquimales de ratón, se siembran células C3H10T1/2 (Nº de Depósito de la ATCC CCL-226) en placas de 96 pocillos a una densidad de 25.000 células por pocillo en medio de cultivo completo (DMEM con alto contenido en glucosa y glutamina complementado con FCS al 10%, penicilina/estreptomycin al 1%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 55  $\mu$ M y HEPES 20 mM, pH 7,3). Las células C3H10T1/2 pueden usarse en un ensayo a corto plazo (72 h) para determinar los efectos de un agente sobre la actividad de ALP inducida por BMP. El agente se prepara en un vehículo apropiado y un volumen equivalente de medios acondicionados de Sf9 (control) se preincuba con BMP-6 500 ng/ml durante 1 h antes de la adición a células. Para una comparación, se llevan a cabo incubaciones similares con anticuerpo anti-BMP-6 y nogina. Las células se recogen 72 h después para la determinación de la actividad de ALP.

LISTADO DE SECUENCIAS

|    |                                                                                                                    |  |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|    | <110> Wilnkler, David G.<br>Latham, John<br>Skonier, John<br>Shpektor, Diana<br>Hayes, Trenton<br>Geoghegan, James |  |
| 5  |                                                                                                                    |  |
| 10 | <120> LIGANDOS PARA PROTEÍNAS DE UNIÓN A TGF-BETA Y USOS DE LOS MISMOS                                             |  |
|    | <130> 60117-42                                                                                                     |  |
|    | <140>                                                                                                              |  |
| 15 | <141> 12-03-2004                                                                                                   |  |
|    | <160> 16                                                                                                           |  |
|    | <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0                                                                             |  |
| 20 | <210> 1<br><211> 2301<br><212> ADN<br><213> Homo sapien                                                            |  |
| 25 | <400> 1                                                                                                            |  |
|    | agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctctcttggc tggtagcatg cagctccac 60                                                |  |
|    | tggccctgtg tctcgtctgc ctgctgttac acacagcctt ccgtgtagtg gagggccagg 120                                              |  |
|    | ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcgga gagtaccocg 180                                              |  |
|    | agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaacgg ggcggagaac ggagggcggc 240                                              |  |
|    | ctcccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact 300                                               |  |
|    | tcaccgccta cgtgaccgat gggccgtgcc gcagcgccaa gcgggtcacc gagctggtgt 360                                              |  |
|    | gctccggcca gtggggcccg gcgcgcctgc tgcccaacgc catcgccgcg ggcaagtggg 420                                              |  |
|    | ggcgacctag tgggcccagc ttccgctgca tccccgaccg ctaccgcgcg cagcgcgctgc 480                                             |  |
|    | agctgctgtg tcccggtggt gaggcgcgcg gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt 540                                              |  |
|    | gcaagtgcaa gcgcctcacc cgtttccaca accagtogga gctcaaggac ttcgggaccg 600                                              |  |
|    | aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccc gcgccggagc gccaaagcca 660                                              |  |
|    | accaggccga gctggagaac gcctactaga gccgcgcgcg gccctcccc accggcgggc 720                                               |  |
|    | gccccggccc tgaaccgcgc cccacattt ctgtcctctg cgcgtgggtt gattgtttat 780                                               |  |
|    | atttcattgt aaatgcctgc aaccagggc agggggctga gaccttccag gccctgagga 840                                               |  |
|    | atcccgggcg ccggcaaggc cccctcagc ccgccagctg aggggtccca cggggcaggg 900                                               |  |
|    | gagggaattg agagtcacag acaactgagc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct 960                                              |  |
|    | ttgctggtcc cacttcagag gaggcagaaa tggaaacatt ttcaccgcc tggggtttta 1020                                              |  |
|    | agggagcggg gtgggagtg gaaagtccag ggactggtta agaaagttgg ataagattcc 1080                                              |  |
|    | cccttgcccc tcgctgcccc tcagaaaagc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg 1140                                             |  |
|    | caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac 1200                                             |  |
|    | tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgaggggt gaggtgggaa 1260                                             |  |
|    | taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg 1320                                             |  |
|    | cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc 1380                                             |  |
|    | caaggtcact tccagaattc agagttgtga tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa 1440                                             |  |
|    | caaacagaaa aaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catattttac gctgacaaac 1500                                             |  |

```

tcttgggaaga agctatgctg cttccagcc ttggttcccc ggatgtttgg ctacctccac 1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggt 1620
gggtgggagg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat ccctcccccg 1680
acccatagcc atgttttaaa gtcaccttc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg 1740
ccttgaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ctttttgaga 1800
caccgcttc tgcaccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc 1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt 1920
gctgtacata tgetgagaaa ctgcagagca taatagctgc caccacaaaa tctttttgaa 1980
aatcatttc agacaacctc ttactttctg ttagtttttt aattgttaaa aaaaaaagt 2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
ttccacgtgg gacttgcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160
atttattttc tcacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatgtt 2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

```

<210> 2  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 2

```

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

```

<210> 3  
 <211> 2301  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapien

<400> 3

```

agagcctgtg ctactggaag gtggcgtgcc ctccctctggc tgggtaccatg cagctcccaac 60
tggccctgtg tctcgtctgc ctgctggtac acacagcctt ccgtgtagtg gagggctagg 120
ggtggcaggc gttcaagaat gatgccacgg aaatcatccc cgagctcgga gactaccccg 180
agcctccacc ggagctggag aacaacaaga ccatgaaccg ggcggagAAC ggagggcggc 240
ctccccacca cccctttgag accaaagacg tgtccgagta cagctgccgc gagctgcact 300
tcacccgcta cgtgaccgat gggcgtgcc gcagcgccaa gccggtcacc gagctggtgt 360
gctccggcca gtggggcccg ggcgcctgc tgcctaacgc catcgccgcg ggcaagtgg 420
ggcgacctag tggggccgac ttccgtgca tccccagccg ctaccgcgcg cagcgcgtgc 480
agctgctgtg tcccgggtgt gaggcgcgcg gcgcgcgcaa ggtgcgcctg gtggcctcgt 540
gcaagtgcaa gcgcctcacc cgtttccaca accagtccga gctcaaggac ttccgggaccg 600
aggccgctcg gccgcagaag ggccggaagc cgcggccccc cgcgcggagc gccaaagcca 660
accaggccga gctggagaac gcctactaga gcccgccccc gccctctccc accggcgggc 720
gccccggccc tgaacccgcg ccccacattt ctgtcctctg cgcgtggttt gattgtttat 780
atttcattgt aaatgcctgc aaccagggc aggggggtga gaccttccag gccctgagga 840
atcccgggcg ccggcaaggc cccctcagc ccgcagctg aggggtccca cggggcaggg 900
gagggaattg agagtacag aactgagcc acgcagcccc gcctctgggg ccgcctacct 960
ttgctggccc cacttcagag gaggcagaaa tggaaagcatt ttcacggccc tggggtttta 1020
atggagcggg gtgggagtg gaaagtcag ggactggtta agaaagttgg ataagattcc 1080
cccttgccac tcgctgccc tcaaaaagcc tgaggcgtgc ccagagcaca agactggggg 1140
caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aacctgaaac 1200
tacacaattc tcttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgagggtg gaggtgggaa 1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg 1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaataatg cagttgcatt gattcagtgc 1380
caaggtcact tccagaattc agagtgtgta tgctctcttc tgacagccaa agatgaaaaa 1440
caaacagaaa aaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac 1500
tcctggaaga agctatgctg ctccccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctccac 1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggt 1620
ggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat cctcccccg 1680
acccatagcc atgtttttaa gtacacttcc gaagagaagt gaaaggttca aggacactgg 1740
ccttgaggc ccgagggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga 1800
caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc 1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt 1920
gctgtacata tgtgagaaa tgcagagca taatagctgc caccacaaaa tctttttgaa 1980
aatcatttcc agacaacctc ttactttctg ttagtgtttt aattgttaaa aaaaaaagt 2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
ttccagtggt gaattgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160
atatttttcc tcaacttaagt tatttatgca aaagtttttc ttgtagagaa tgacaatggt 2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gtttaataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

```

<210> 4  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien  
  
 <400> 4

```

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
  1             5             10             15
Ala Phe Arg Val Val Glu Gly
                20

```

<210> 5  
 <211> 2301  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapien  
  
 <400> 5

|             |            |             |             |            |             |      |
|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| agagcctgtg  | ctactggaag | gtggcgtgcc  | ctcctctggc  | tggtaccatg | cagctccac   | 60   |
| tggccctgtg  | tctcatctgc | ctgctggtac  | acacagcctt  | ccgtgtagtg | gagggccagg  | 120  |
| ggtggcaggc  | gttcaagaat | gatgccacgg  | aatcatccg   | cgagctcgga | gagtaccccg  | 180  |
| agcctccacc  | ggagctggag | aacaacaaga  | ccatgaaccg  | ggcggagaac | ggagggcggc  | 240  |
| ctccccacca  | cccctttgag | accaaagacg  | tgctcgagta  | cagctgccgc | gagctgcaact | 300  |
| tcacccgcta  | cgtgaccgat | gggcccgtgc  | gcagcgccaa  | gccggtcacc | gagctggtgt  | 360  |
| gctccggcca  | gtgcccggcg | gcgcgcctgc  | tgcccaacgc  | catcgccgcg | ggcaagtggg  | 420  |
| ggcgacctag  | tgggcccgcg | ttccgctgca  | tccccgaccg  | ctaccgcgcg | cagcgcgctgc | 480  |
| agctgctgtg  | tcccgggtgt | gaggcgccgc  | gcgcgcgcaa  | ggtgcgcctg | gtggcctcgt  | 540  |
| gcaagtgcaa  | gcccctcacc | cgcttccaca  | accagtgcga  | gctcaaggac | ttcgggaccg  | 600  |
| aggccgctcg  | gccgcagaag | ggccgggaagc | cgccggcccg  | cgcccgagac | gccaaagcca  | 660  |
| accaggccga  | gctggagaac | gcctactaga  | gcccgcgcgc  | gcccctcccc | accggcgggc  | 720  |
| gccccggccc  | tgaacccgcg | ccccacattt  | ctgtcctctg  | cgcggtggtt | gattgtttat  | 780  |
| atttcattgt  | aaatgcctgc | aaccagggc   | agggggctga  | gaccttccag | gccctgagga  | 840  |
| atcccgggcg  | ccggcaaggc | ccccctcagc  | ccgccagctg  | aggggtccca | cggggcaggg  | 900  |
| gaggggaattg | agagtcacag | acactgagcc  | acgcagcccc  | gcctctgggg | ccgcctacct  | 960  |
| ttgctggtcc  | cacttcagag | gaggcagaaa  | tggaaagcatt | ttcaccgccc | tgggggttta  | 1020 |
| agggagcggg  | gtgggagtgg | gaaagtccag  | ggactggtta  | agaaagtggg | ataagattcc  | 1080 |
| cccttgccac  | tcgctgccca | tcagaaagcc  | tgaggcgtgc  | ccagagcaca | agactggggg  | 1140 |
| caactgtaga  | tgtggtttct | agtccctggc  | ctgccactaa  | cttgctgtgt | aaccttgaa   | 1200 |
| tacacaattc  | tccttcggga | cctcaatttc  | cactttgtaa  | aatgagggtg | gaggtgggaa  | 1260 |
| taggatctcg  | aggagactat | tggcatatga  | ttccaaggac  | tccagtgcct | tttgaatggg  | 1320 |
| cagaggtgag  | agagagagag | agaaagagag  | agaatgaatg  | cagttgcatt | gattcagtcg  | 1380 |
| caaggtcact  | tccagaattc | agagttgtga  | tgctctcttc  | tgacagccaa | agatgaaaaa  | 1440 |
| caaacagaaa  | aaaaaaagta | aagagtctat  | ttatggctga  | catatttacg | gctgacaaac  | 1500 |
| tcctggaaga  | agctatgctg | cttcccagcc  | tggcttcccc  | ggatgtttgg | ctacctccac  | 1560 |
| ccctccatct  | caaagaaata | acatcatcca  | ttggggtaga  | aaaggagagg | gtccgagggg  | 1620 |
| ggtgggaggg  | atagaaatca | catccgcccc  | aacttcccaa  | agagcagcat | ccctcccccg  | 1680 |
| acccatagcc  | atgtttttaa | gtcaccttcc  | gaagagaagt  | gaaaggttca | aggacactgg  | 1740 |
| ccttgcaggc  | ccgagggagc | agccatcaca  | aactcacaga  | ccagcacatc | ccttttgaga  | 1800 |
| caccgccttc  | tgcccaccac | tcacggacac  | atttctgcct  | agaaaacagc | ttottactgc  | 1860 |
| tcttacatgt  | gatggcatat | cttactactaa | aagaatatta  | ttgggggaaa | aactacaagt  | 1920 |
| gctgtacata  | tgctgagaaa | ctgcagagca  | taatagctgc  | cacccaaaaa | tctttttgaa  | 1980 |
| aatcatttcc  | agacaacctc | ttactttctg  | tgtagttttt  | aattgttaaa | aaaaaaaagt  | 2040 |
| tttaaacaga  | agcacatgac | atatgaaagc  | ctgcaggact  | ggtcgttttt | ttggcaattc  | 2100 |
| ttccacgtgg  | gacttgtcca | caagaatgaa  | agtagtggtt  | tttaaagagt | taagttacat  | 2160 |
| atttattttc  | tcacttaagt | tatttatgca  | aaagtttttc  | ttgtagagaa | tgacaatgtt  | 2220 |
| aatattgctt  | tatgaattaa | cagtctgttc  | ttccagagtc  | cagagacatt | gttaataaag  | 2280 |
| acaatgaatc  | atgaccgaaa | g           |             |            |             | 2301 |

<210> 6  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien  
  
 <400> 6

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

<210> 7  
 <211> 2301  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapien

<400> 7

|             |            |             |            |            |             |      |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| agagcctgtg  | ctactggaag | gtggcgtgcc  | ctcctctggc | tggtaccatg | cagctcccaac | 60   |
| tggeccctgtg | tctcgtctgc | ctgctgggtac | acacagcctt | ccgtgtagtg | gagggccagg  | 120  |
| gggtggcaggc | gttcaagaat | gatgccacgg  | aaatcatccg | cgagctcgga | gagtaccccg  | 180  |
| agcctccacc  | ggagctggag | aacaacaaga  | ccatgaaccg | ggcggagaac | ggagggcggc  | 240  |
| ctccccacca  | cccctttgag | accaaagacg  | tgtccgagta | cagctgccgc | gagctgcact  | 300  |
| tcaccgcgta  | cgtgaccgat | gggcggtgcc  | gcagcgccaa | gccggtcacc | gagctggtgt  | 360  |
| gctccggcca  | gtgcggcccg | gcgcgcctgc  | tgcccaacgc | catcgccgcg | ggcaagtggg  | 420  |
| ggcgacctag  | tgggcccgcg | ttccgctgca  | tcccgaccg  | ctaccgcgcg | cagcgcgctg  | 480  |
| agctgctgtg  | tcccggtggt | gagggcgccg  | gcgcgcgcaa | ggtgcgcctg | gtggcctcgt  | 540  |
| gcaagtgcaa  | gcgcctcacc | cgcttccaca  | accagtcgga | gctcaaggac | ttcgggaccg  | 600  |
| aggccgctcg  | gccgcagaag | ggccggaagc  | cgcgcccccg | cgcccggagc | gccaaagcca  | 660  |
| accaggccga  | gctggagaac | gcctactaga  | gcccgccegc | gcccctcccc | accggcgggc  | 720  |
| gccccggccc  | tgaaccgcgc | ccccacattt  | ctgtcctctg | cgcgtgggtt | gattgtttat  | 780  |
| atttcattgt  | aatgcctgc  | aaccagggc   | agggggctga | gacctccag  | gccctgagga  | 840  |
| atcccgggcg  | ccggcaaggc | ccccctcagc  | ccgccagctg | aggggtccca | cggggcaggg  | 900  |
| gaggggaattg | agagtcacag | acactgagcc  | acgcagcccc | gcctctgggg | ccgcctacct  | 960  |
| ttgctgggtcc | cacttcagag | gaggcagaaa  | tggaagcatt | ttcaccgccc | tggggtttta  | 1020 |
| agggagcggg  | gtgggagtg  | gaaagtccag  | ggactggtta | agaaagttgg | ataagattcc  | 1080 |

```

cccttgccacc tcgctgcccac tcagaaagccc tgaggcgctgc ccagagcaca agactggggg 1140
caactgtaga tgtggtttct agtcctggct ctgccactaa cttgctgtgt aaccttgaac 1200
tacacaattc tccttcggga cctcaatttc cactttgtaa aatgaggggtg gaggtgggaa 1260
taggatctcg aggagactat tggcatatga ttccaaggac tccagtgcct tttgaatggg 1320
cagaggtgag agagagagag agaaagagag agaatgaatg cagttgcatt gattcagtgc 1380
caaggtcact tccagaattc agagttgtga tgcctctctc tgacagccaa agatgaaaaa 1440
caaacagaaa aaaaaaagta aagagtctat ttatggctga catatttacg gctgacaaac 1500
tcctggaaga agctatgctg cttcccagcc tggcttcccc ggatgtttgg ctacctocac 1560
ccctccatct caaagaaata acatcatcca ttggggtaga aaaggagagg gtccgagggt 1620
ggtgggaggg atagaaatca catccgcccc aacttcccaa agagcagcat ccctcccccg 1680
acccatagcc atgtttttaa gtcaccttc gaagagaagt gaaagggtca aggacactgg 1740
ccttgccaggc ccgaggggagc agccatcaca aactcacaga ccagcacatc ccttttgaga 1800
caccgccttc tgcccaccac tcacggacac atttctgcct agaaaacagc ttcttactgc 1860
tcttacatgt gatggcatat cttacactaa aagaatatta ttgggggaaa aactacaagt 1920
gctgtacata tgctgagaaa ctgcagagca taatagctgc cacccaaaaa tctttttgaa 1980
aatcatttcc agacaacctc ttactttctg tgtagttttt aattgttaaa aaaaaaaagt 2040
tttaaacaga agcacatgac atatgaaagc ctgcaggact ggtcgttttt ttggcaattc 2100
ttccacgtgg gacttgtcca caagaatgaa agtagtggtt tttaaagagt taagttacat 2160
atatttttcc tcacttaagt tatttatgca aaagttttcc ttgtagagaa tgacaatgtt 2220
aatattgctt tatgaattaa cagtctgttc ttccagagtc cagagacatt gttaataaag 2280
acaatgaatc atgaccgaaa g 2301

```

<210> 8  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 642  
 <212> ADN  
 <213> Cercopithecus pygerythrus

5 <400> 9

```

atgcagctcc cactggccct gtgtcttgtc tgcctgctgg tacacgcagc cttccgtgta      60
gtggagggcc aggggtggca ggccttcaag aatgatgcc a cgaaatcat ccccgagctc      120
ggagagtacc ccgagccctcc accggagctg gagaacaaca agaccatgaa ccggggcggag      180
aatggagggc ggccctcccca ccacccttt gagaccaaag acgtgtccga gtacagctgc      240
cgagagctgc acttcaaccg ctacgtgacc gatgggccgt gccgcagcgc caagccagtc      300
accgagttgg tgtgctccgg ccagtgcggc ccggcacgcc tgctgccaa cgcctaccgc      360
cgcggcaagt ggtggcgccc gagtgggccc gacttccgct gcatccccga ccgctaccgc      420
gcgcagcgtg tgcagctgct gtgtcccggt ggtgcgcgcg cgcgcgcgcg caaggtgcgc      480
ctggtggcct cgtgcaagtg caagcgctc acccgcttcc acaaccagtc ggagctcaag      540
gacttcggtc ccgagggcgc tcggccgcag aaggggcggg agccgcggcc ccgcgccggg      600
ggggccaaag ccaatcaggc cgagctggag aacgcctact ag                               642

```

<210> 10  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Cercopithecus pygerythrus

10

<400> 10

15

```

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

```

<210> 11  
 <211> 638  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

20



&lt;400&gt; 11

```

atgcagccct cactagcccc gtgcctcatc tgcctacttg tgcacgctgc cttctgtgct      60
gtggagggcc aggggtggca agccttcagg aatgatgcc aagaggtcat cccagggctt      120
ggagagtacc ccgagcctcc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatgga      180
ggcagacctc cccaccatcc ctatgacgcc aaaggtgtgt ccgagtacag ctgccgcgag      240
ctgcaactaca cccgcttcct gacagacggc ccattgccga ggcgcaagcc ggtcaccgag      300
ttgggtgtgt ccggccagtg cggccccgcg cggctgctgc ccaacgccat cgggcgcgctg      360
aagtgggtggc gcccgaaacgg accggatttc cgctgcatcc cggatcgcta ccgcgcgcag      420
cgggtgcagc tgetgtgccc cgggggcgcg gcgcgcgct cgcgcaaggt gcgtctggtg      480
gcctcgtgca agtgcaagcg cctcaccgcg ttccacaacc agtcggagct caaggacttc      540
gggcgggaga ccgcgcggcg gcagaagggt cgcaagccgc ggcccggcgc ccggggagccc      600
aaagccaacc aggcggagct ggagaacgcc tactagag      638

```

5 <210> 12  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 &lt;400&gt; 12

```

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

```

15 <210> 13  
 <211> 674  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus

20 &lt;400&gt; 13

```

gaggaccgag tgccttcct ccttctggca ccatgcagct ctactagcc ccttgccctg      60
cctgcctgct tgtacatgca gccttcgttg ctgtggagag ccaggggtgg caagccttca      120
agaatgatgc cacagaaatc atcccgggac tcagagagta ccagagacct cctcaggaac      180
tagagaacaa ccagaccatg aaccggggcg agaacggagg cagaccccc caccatcctt      240
atgacaccaa agacgtgtcc gactacagct gccgcgagct gcactacacc cgcttcgtga      300
ccgacggccc gtgccgcagt gccaaagccgg tcaccgagtt ggtgtgctcg ggccagtgcg      360
gccccgcgcg getgctgccc aacgccatcg ggcgcgtgaa gtggtggcgc ccgaacggac      420
ccgacttccg ctgcatcccg gatcgctacc gcgcgcagcg ggtgcagctg ctgtgccccg      480
gcggcgcggc gcgcgcctcg cgcaagggtgc gtctgggtggc ctctgcaag tgcaagcgcc      540
tcaccgcgtt ccacaaccag tcggagctca aggacttcgg acctgagacc gcgcggcgcg      600
agaagggtcg caagccgcgg ccccgcgccc ggggagccaa agccaaccag gcggagctgg      660
agaacgccta ctag                                     674

```

<210> 14  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
  
 <400> 14

```

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

Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
          195          200          205
Leu Glu Asn Ala Tyr
          210

```

<210> 15  
 <211> 532  
 <212> ADN  
 <213> Bos torus  
  
 <400> 15

```

agaatgatgc cacagaaatc atccccgagc tgggcgagta ccccgagcct ctgccagagc      60
tgaacaacaa gaccatgaac cgggcgagga acggagggag acctcccccac caccctttg      120
agaccaaaaga cgctccgag tacagctgcc gggagctgca cttcaccgcg tacgtgaccg      180
atgggcccgtg ccgcagcgcc aagccgggtc cggagctggt gtgctcgggc cagtgcgggc      240
cggcgcgctt gctgcccac gccatcggcc gcggcaagtg gtggcgccca agcggggccc      300
acttccgctg catccccgac cgctaccgcg cgcagcgggt gcagctgttg tgcctggcg      360
gcgcggcgcc gcgcgcgcgc aaggtgcgcc tgggtggcctc gtgcaagtgc aagcgccctca      420
ctcgcttcca caaccagtcc gagctcaagg acttcgggcc cgaggccgcg cggccgcaaa      480
cgggcccggaa gctgcggccc cgcgcccggg gcaccaaagc cagccggggc ga      532

```

<210> 16  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> Bos torus

<400> 16

```

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

```

SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18

MERCPSLGVTLIALVVLGLRATPAGGQHYLHIRPAPSDNLP1V  
DLIEHPDPIFDPKEDLNETLLRSLLGGHYDPGFMATSPPEDRPGGGGGAAGGAEDLA  
ELDQLLRQRPSPGAMPSEIKGLEFSEGLAQGKKQRLSKKLRRKLQMWLWSQTFPCPVLIA  
WNLGSRFPYVVKVGSFCSRSCSVPEGMVCKPSKSVHLTVLWRWCQRGGQRCGWI  
PIQYPIISECKCSC

1 gagctccggc ggtcagccg gactgtccg ttcccgggc atctgggtcc ggcggggcac  
61 agccctggc gctgccgaag ccgcgcgcg ccctccgcg gcgagtacag gcggttccc  
121 cggagcctg tgcagctcca gctcctcggg ggtggagaag tggggggtgg ggtgatgta

181 tggggggaag aagggggagg ggccaacccc gagagagtca gtggtttcca tgggtatgga  
241 gctgaaagtg caggaaatth aaaggcttgg accctgcgag acagacaaac cgtgccaac  
301 gtgcgcggac gccgccgcg ccgcgcgcg tggagtccg cgggcagagc cggccgcgga  
361 gccgggagca ggcggaggga agtgcctcta gaaccagctc agccagcggc gcttgacag  
421 agcggccggn cgaagagcag cgagaggagg aggggagagc ggctcgtcca cgcgcctgc  
481 gccgcgcgcg gcccggaag gcagcgagga gccgcgcct cccgcgcgcc cgggtcgccc  
541 tggagtaatt tcggtgccc agccgcggc gccttcccc gtagaccgg gagaggagt  
601 gcggccaact tgtgtgctt tcttcgcgc cgtgggagc cggcgctgc cgaagggtc  
661 tccgcgcgcg tcatgctgc ggccctgcg ctgccagcc tcgggtgagc ccctccgga  
721 gagacggggg agcgcgcgcg ccgcgcggc tcggcgtgct ctctccggg gacgcgggac  
781 gaagcagcag ccccggcgc gcgcagagg catggagcgc tgcgccagc taggggtcac  
841 cctctacgcc ctggtggtg tctggggct gcggcgaca ccggccggc gccagcacta  
901 tctccacatc cgcgcgcac ccagcgaca cctgcccctg gtggacctca tgaacaccc  
961 agaccctatc tttgaccca aggaaaagga tctgaacgag acgctgctgc gctcgtgct  
1021 cggggggcac tacgaccag gcttcatgg cacctcgcc cccgaggacc ggcccgcg  
1081 ggggggggt gcagctggg gcgcggagg cctggcgag ctggaccagc tgcgcggca  
1141 gcggcgtcg gggccatgc cgagcgagat caaagggcta gatttctcg agggcttggc  
1201 ccagggcaag aagcagcgc taagcaagaa gctgcggagg aagttacaga tgtggctgtg  
1261 gtcgcagaca ttctgcccc gctgtacgc gtggaacgac ctgggagcc gcttttggc  
1321 gcgctacgtg aaggtgggca gctgcttcag taagcgtcg tgcctcgtgc ccgaggcat  
1381 ggtgtgcaag ccgtccaagt ccgtgcact caggtgctg cgggtggcgt gtcagcggc  
1441 cgggggacag cgtgcggct ggattccat ccagtaccc atcatttcc agtgcaagt  
1501 ctgctgctag aactcggggg cccctgcgc gcaccggac acttgatcct cgagctc

SEC ID N°: 19

MPSLPAPPAPLLLLGLLLLGSRPARGAGPEPPVLP1RSEKEPLP  
VRGAAGCTFGGKVYALDETHWPDLEPGVMRCVLCACEAPQWGRTRGPGRVSCNI  
KPECPTPACGQPRQLPGHCCQTCPESSSERQPSGLSFEYPRDPEHRSYSDRGEPGA  
EERARGDGHTDFVALLTGERSQAVARARVSLRSSLRFSISYRRLDRPTRIRFSDSNG  
SVLFEHPAAPTQDGLVCGVWRAVRLSLRLRAEQLHVALVTLTHPSGEVWGPIRHR  
ALAAETFSAILTLEGPPQGGVGGITLLTSLDTEDSLHFLLLFRGLLEPRSGGLTQVPL  
RLQILHQGQLLRELQANVSAQEPGFAEVLPNLTVQEMDWLVLGELQMALENAGRPLR  
ISGHIAARKSCDVLQSVLCADALI PVQTGAAGSASLTLLNGSLIYQVQVVGTSSEV  
VAMTLETKPQRDQRTVLCHMAGLQPGGHTAVGICPGLGARGAHMLLQNELFLNVGTK  
DFPDGELRGHVAALPYCGHSARHDTLPVPLAGALVLPVKSQAAGHAWLSLDTHCHLH

YEVLLAGLGGSEQGTVAHLLGPPGTGPRRLKGFYGSEAQGVVKDLEPELLRHAK  
GMASLLITTKGSRGELRGQVHIANQCEVGGLRLEAAGAEVRLGAPDTASAAPPVV  
PGLPALAPAKPGGPRPRDNTCFEQQORPHGARWAPNYDPLCSLCTCQRRTVICDP  
VVCPPSPCPHPVQAPDQCCFVCPEKQDVRDLPLPRSRDPGEGCYFDGDRSWRAAGTR  
WHPVVPFGLIKCAVCTCKGGTGEVHCEKVQCPLACAQPVVNPTDCKQCPVGS  
HPQLGDPQADGPRGCRFAGQWFPESQSWHPSVPPFGEMSCITCRGAGVPHCERDDC  
SLPLSCGSGKESRCCSRCTAHRRPAPETRTDPELEKEAEGS

SEC ID N°: 20

1 cccgggtcag cgcgcgcgcg cccgcgcctc tccgggcgcg tccctccgcg ccgcccggcc  
 61 cggcgccgac tctgcggcgc cccgacgcgc cctcgcgcgc actgccccgg ccccgccccc  
 121 ggccccggcc cctcctccgc gcacgcgcgc cggcccgccc ctcgcctcgc cgcactcccg  
 181 cctccctccc tccgcgcgcg cccgcgcctc cctcctccc tccctcccag ctgtcccggt  
 241 cgcgtcatgc cgcgcctccc ggccccgcgc gccccgcgtg tgcctcctcg gctgctgctg  
 301 ctccggtccc ggccggcccg cggcgccggc cccgagcccc ccgtgctgcc catccgttct  
 361 gagaaggagc cgtgcccgt tccgggagcg gcaggctgca ccttcggcgg gaaggtctat  
 421 gccttgagc agacgtggca cccggacctc ggggagccat tcgggggtgat gcgctgcgtg  
 481 ctgtgcgcct gcgaggcgc tcaagtgggt cgcctacca cgggcccctg cagggtcagc  
 541 tgcaagaaca tcaaacaga gtgcccaccc cggcctgtg gcgagccgc ccagctgccg  
 601 ggacactgct gccagacctg cccccaggag cgcagcagtt cggagcggca gccgagcggc  
 661 ctgtccttcg agtatccgcg ggaccggag catcgcagtt atagcgaccg cggggagcca  
 721 ggcgctgagg agcgggcccg tggtagcggc cacacggact tcgtggcgct gctgacaggg  
 781 ccgaggtcgc aggcggtggc acgagccoga gtctcgtgc tgcgtctag cctccgcttc  
 841 tctatctcct acaggcggct ggacgcctc accaggatcc gcttctcaga ctccaatggc  
 901 agtgcctgt ttgagcacc tgcagcccc acccaagatg gcctggctcg tgggggtggtg  
 961 cgggcagtc ctcggtgtc tctgcggctc cttagggcag aacagctgca tgtggcactt  
 1021 gtgacactca ctacacctc aggggaggtc tgggggcctc tcatccggca cccggccctg  
 1081 gctgcagaga ccttcagtgc catcctgact ctagaaggcc cccacagca gggcgtaggg  
 1141 ggcacacccc tgcctactct cagtgcacaa gaggactcct tgcatttttt gctgctcttc  
 1201 cgagggtcgc tggaaaccag gagtggggga ctaaccaggg ttcccttgag gctccagatt  
 1261 ctacaccagg ggcagctact gcgagaactt caggccaatg tctcagccca ggaaccaggc  
 1321 tttgctgagg tgcctcccaa cctgacagtc caggagatgg actggctggt gctgggggag  
 1381 ctcagatgg ccttgagtg ggcaggcagg ccagggtgc gcatcagtg acacattgct  
 1441 gccaggaaga gctgcgagct cctgcaaat gtctttgtg gggctgatgc cctgatccca  
 1501 gtccagacgg gtgctgcgg ctcagccagc ctacgcgtgc taggaaatgg ctccctgatc  
 1561 tatcaggtgc aagtgttagg gacaagcagt gaggtggtgg ccatgacact ggagaccaag  
 1621 cctcagcggg gggatcagcg cactgtcctg tgccacatgg ctggactcca gccaggagga  
 1681 cacacggccg tgggtatctg cctgggctg ggtgcccgag gggctcatat gctgctgcag  
 1741 aatgagctct tctgaaatgt gggcaccagg gacttcccag acggagagct tcgggggcac  
 1801 gtggctqccc tgcctactg tgggcataag gcccgccatg acacgctgcc cgtgccccta  
 1861 gcaggagccc tgggtgctacc cctgtgaaag agccaagcag cagggcagcg ctggtcttcc  
 1921 ttggataccc actgtcacct gcactatgaa gtgctgctgg ctgggcttgg ttggtcagaa  
 1981 caaggcactg tcaactgccc cctccttggg cctcctggaa cggcagggcc tcggcggctg  
 2041 ctgaagggat tctatggctc agaggcccag ggtgtggtga aggaactgga gcgggaactg  
 2101 ctgcggcacc tggcaaaagg catggcctcc ctgctgatca ccaccaaggg tagccccaga  
 2161 ggggagctcc gagggcaggg gcacatagcc aaccaatgtg aggttggcgg actgcgctg  
 2221 gaggcggcgc gggccgaggg ggtgcgggct ctgggggtcc cggatacage ctctgctgcg  
 2281 ccccgctgtg tgcctgtgtc cccggcccta gcgcccgcga aacctggtgg tcttggcgcg  
 2341 ccccgagacc ccaacacatg cttcttogag gggcagcagc gccccacgg ggtcgcgtgg  
 2401 gcgcccactc acgaccgcgt ctgctcactc tgcacctgcc agagacgaac ggtgatctgt  
 2461 gacccggtgg tgtgcccacc gccagctgc ccacacccgg tgcaggctcc cgaccagtgc  
 2521 tgcctgtttt gccctgagaa acaagatgtc agagacttgc cagggtgccc aaggagccgg  
 2581 gaccagagg agggctgcta ttttgatggt gaccggagct ggcgggcagc gggtaocgg  
 2641 tggcaccocg ttgtgcccc ctttgctta attaatgtg ctgtctgcac ctgcaagggg  
 2701 ggcactggag aggtgactg tgagaagggt cagtgtccc ggtggcctg tgcccagcct  
 2761 gtgcgtgtca accccaccga ctgctgcaaa cagtgtccag tggggtcggg ggccccccc  
 2821 cagctggggg accccatgca ggcgtatggg ccccggggt cccgttttgc tgggcagtgg  
 2881 ttccagagga gtcagagctg gcacccctca gtgccccct tggagagat gagctgtatc  
 2941 acctgcagat gtggggcagg ggtgcctcac tgtgagcggg atgactgttc actgccactg  
 3001 tcctgtggct cggggaaggga gagtccgatg tgttcccgct gcacggccca ccggcgggca  
 3061 gccccagaga ccagaactga tccagagctg gagaagaag ccgaaggctc ttagggagca  
  
 3121 gccagagggc caagtgacca agaggatggg gcctgagctg ggaaggggg ggcactcagg  
 3181 accttcttgc atttctctgt ggaagccca gtgcctttgc tctctgtcc tgcctctact  
 3241 cccaccccca ctacctctgg gaaccacagc tccacaaggg ggagaggcag ctgggcccaga  
 3301 ccgaggtcac agccactcca agtccctgcc tgccaccctc ggcctctgtc ctggaagccc  
 3361 cacccttttc ctcctgtaca taatgtcact ggcttgttgg gatttttaac ttatcttcac  
 3421 tcagcaccaa gggcccccga cactccactc ctgctgcccc tgagctgagc agagtcatta  
 3481 ttggagagtt ttgtatttat taaaaattt ctttttcagt caaaaaaaa aaaaaaaa  
 3541 aaaaaaa

## REIVINDICACIONES

1. Un complejo aislado que comprende:

- (i) un polipéptido de esclerostina que es capaz de unirse específicamente a BMP-5 y/o BMP-6, y
- (ii) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido de cordina y un polipéptido de nogina, siendo dicho polipéptido capaz de unirse específicamente a BMP-2 y/o BMP-4 y/o BMP-7, en el que el complejo es incapaz de unirse a un polipéptido miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-5 y BMP-6.

2. Un complejo aislado que comprende un polipéptido de esclerostina y un polipéptido de cordina en asociación específica, en el que:

- (a) el polipéptido de esclerostina es capaz de unirse a un primer miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6 y BMP-7; y
- (b) el polipéptido de cordina es capaz de unirse a un segundo miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4 y BMP-7; en el que el complejo es incapaz de unirse al primer miembro de la superfamilia de TGF-beta.

3. Un complejo aislado que comprende un polipéptido de esclerostina y un polipéptido de nogina en asociación específica, en el que:

- (a) el polipéptido de esclerostina es capaz de unirse a un primer miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-5 y BMP-6; y
- (b) el polipéptido de nogina es capaz de unirse a un segundo miembro de la superfamilia de TGF-beta seleccionado del grupo que consiste en BMP-2, BMP-4, BMP-7 y GDF-5; en el que el complejo es incapaz de unirse al primer y segundo miembros de la superfamilia de TGF-beta.

4. Un método para identificar un agente que module la unión entre un polipéptido de esclerostina y un segundo polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos de nogina y cordina, que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto, en ausencia y presencia de un agente candidato, el polipéptido de esclerostina y el segundo polipéptido en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la asociación específica de un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
- (b) determinar un nivel de complejo que está presente, en el que una diferencia en el nivel de complejos en presencia del agente candidato respecto al nivel en ausencia del agente candidato indica que el agente modula la unión entre el polipéptido de esclerostina y el segundo polipéptido.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el método es para identificar un agente que disminuya la asociación específica de proteínas para formar un complejo.

6. El método de la reivindicación 4, en el que el método es para identificar un agente que aumente la asociación específica de proteínas para formar un complejo.

7. El método de la reivindicación 4, en el que el método es para identificar un agente que establezca la asociación específica de proteínas para formar un complejo.

8. El método de la reivindicación 4, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en una molécula orgánica, un producto natural, un péptido, un oligosacárido, un ácido nucleico, un lípido, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo y una célula.

9. El método de la reivindicación 4, en el que el agente candidato se obtiene a partir de una biblioteca de compuestos.

10. El método de la reivindicación 9, en el que la biblioteca se selecciona del grupo que consiste en una biblioteca de péptidos aleatoria, una biblioteca de productos naturales, una biblioteca combinatoria, una biblioteca de oligosacáridos y una biblioteca de presentación en fago.

11. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento modula la formación de un complejo entre:

- (i) esclerostina; y
- (ii) Cordina o Nogina.

12. El fragmento de anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 11, que es un F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab o Fv.

13. El anticuerpo monoclonal o fragmento de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, que es humano o está humanizado.

- 5 14. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

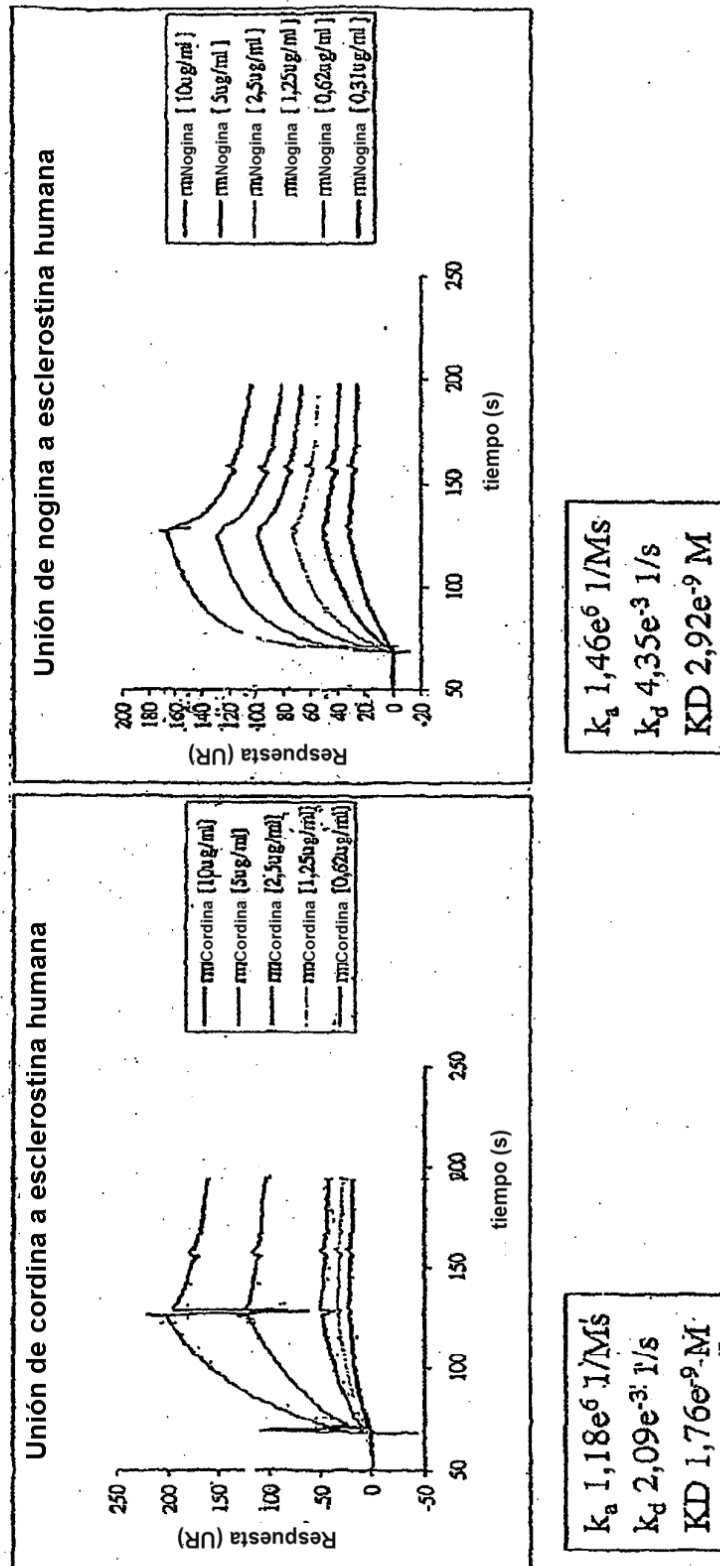
Cadena principal de cisteína común

|                     |                                                       |
|---------------------|-------------------------------------------------------|
| 1                   | 50                                                    |
| gremlin humana.pro  | _____                                                 |
| cerberus humana.pro | MIILLFQLLV LLPLGKTRH QQGRNQSSL SPVLLPNQR ELPTGNHEEA   |
| dan humana. pro     | _____                                                 |
| beer humana.pro     | _____                                                 |
| 51                  | 100                                                   |
| gremlin humana.pro  | _____M SRTAYTVGAL LLLLGTLPA AEGKKKESQG                |
| cerberus humana.pro | EEKPDLFVAV PHLVAT SPA GEGQGRQEKH LSRFGFHWK PERQHPSPRD |
| dan humana. pro     | _____                                                 |
| beer humana.pro     | _____MQLPLA LCLVCLLVHT                                |
| 101                 | 150                                                   |
| gremlin humana.pro  | AI PPDKAQ INDSEQTSP QQGRNRGR GQGRGTAMPG EEVLESSQEA    |
| cerberus humana.pro | SDSEFPFGT QSLIQPID G MMEKSPLE EAKKFWHHM FRKTPASQGV    |
| dan humana. pro     | _____MLRVLVGAVL PAMLLAAPPP                            |
| beer humana.pro     | AFRVVEGQH QAFKDATEI IPELGEYPEP PPELENNKM NRAENGSRPP   |
| 151                 | 200                                                   |
| gremlin humana.pro  | LHVTERKYLK RDWCKTQPLK QTIHEEGNS RTTINRF CY GQNSFYIPR  |
| cerberus humana.pro | ILPIKSHEVH WETCRVPFS QTIHEGCEK VVQNIL CF GKCGSVHFP    |
| dan humana. pro     | INKLALFPK SAWCEAKWLT QIVGHSGEA KSTQRA CL GQCFSYSYPN   |
| beer humana.pro     | HPFETKVS EYSCRELHFT RYVTDGPRS AKPVTELVCS GQGPARLLP    |
| 201                 | 250                                                   |
| gremlin humana.pro  | HIRKEGSFQ SCSE...CKP KQFTTMNTL NCPLOPPTK K.KRVTRVQ    |
| cerberus humana.pro | ..GAQHSHT SCSE...CLP AKFTTMHLPL NCTELSSVIK V...VHLVEE |
| dan humana. pro     | TFPOSTESLV HDS...CMP AQSMETVTL ECPGHEEVR VOKLVEKILH   |
| beer humana.pro     | NAIGRGMNR PSGPDFRCIP DRYTRARVQL LCPGGEAPRA RKVRLVAS.. |
| 251                 | 300                                                   |
| gremlin humana.pro  | CRG ISIDLD                                            |
| cerberus humana.pro | QCKVKTEHE DGHILHAGSQ DSFTPGVSA                        |
| dan humana. pro     | CSQDACEKEP SHEGLSVVVO GEDPGSQPG THPHPHPHH PGQITPEPED  |
| beer humana.pro     | CKCKRLTRFH NQELKDFGT EAPRQKGRK PRPRARSACA NQAELENAY   |
| 301                 | 314                                                   |
| gremlin humana.pro  | _____                                                 |
| cerberus humana.pro | _____                                                 |
| dan humana. pro     | PPGAPHTEEE GAED                                       |
| beer humana.pro     | _____                                                 |

Fig. 1



FIGURA 2



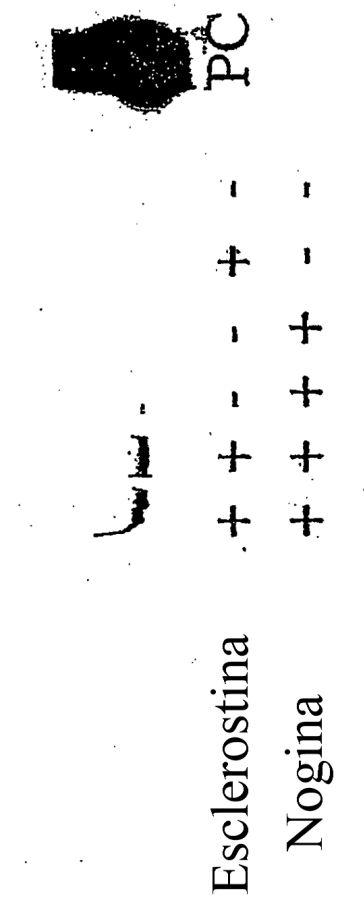


FIGURA 3

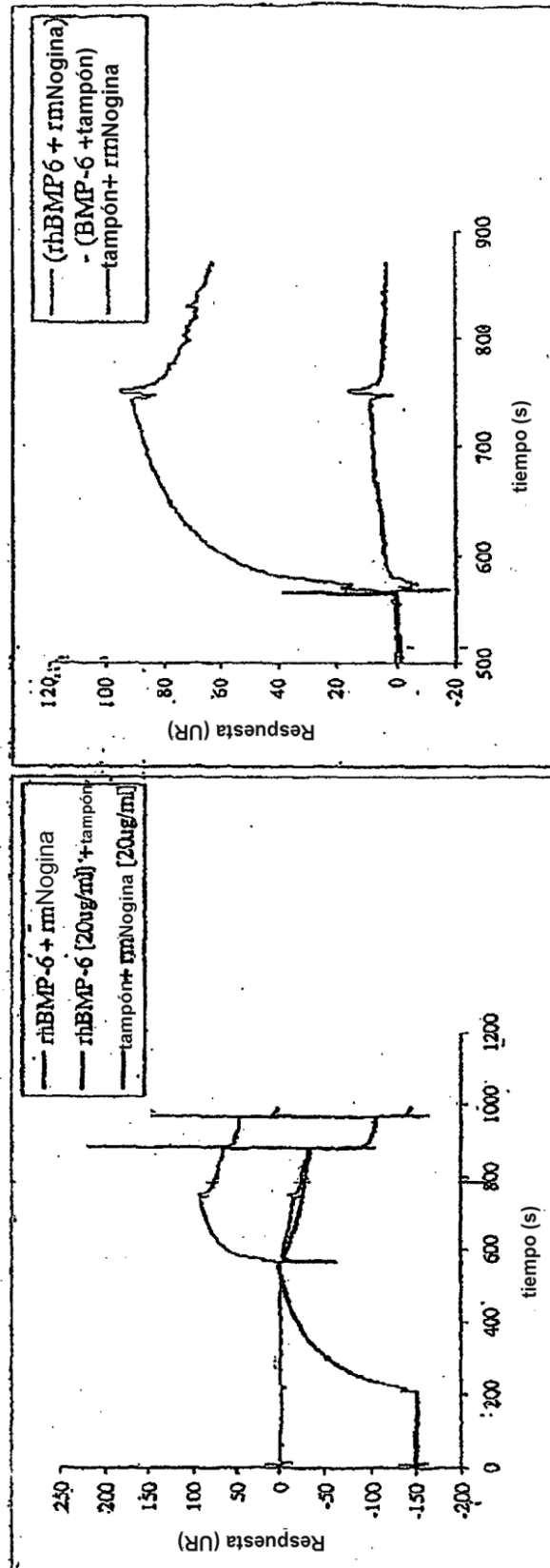


FIGURA 4

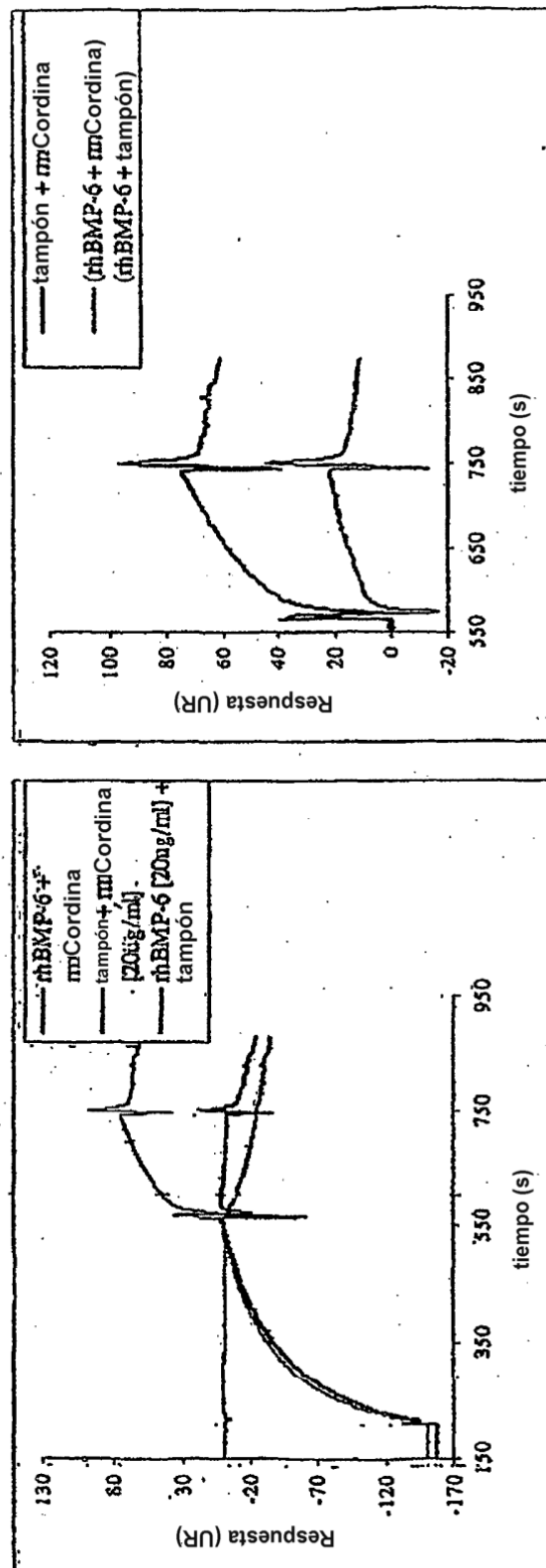


FIGURA 5

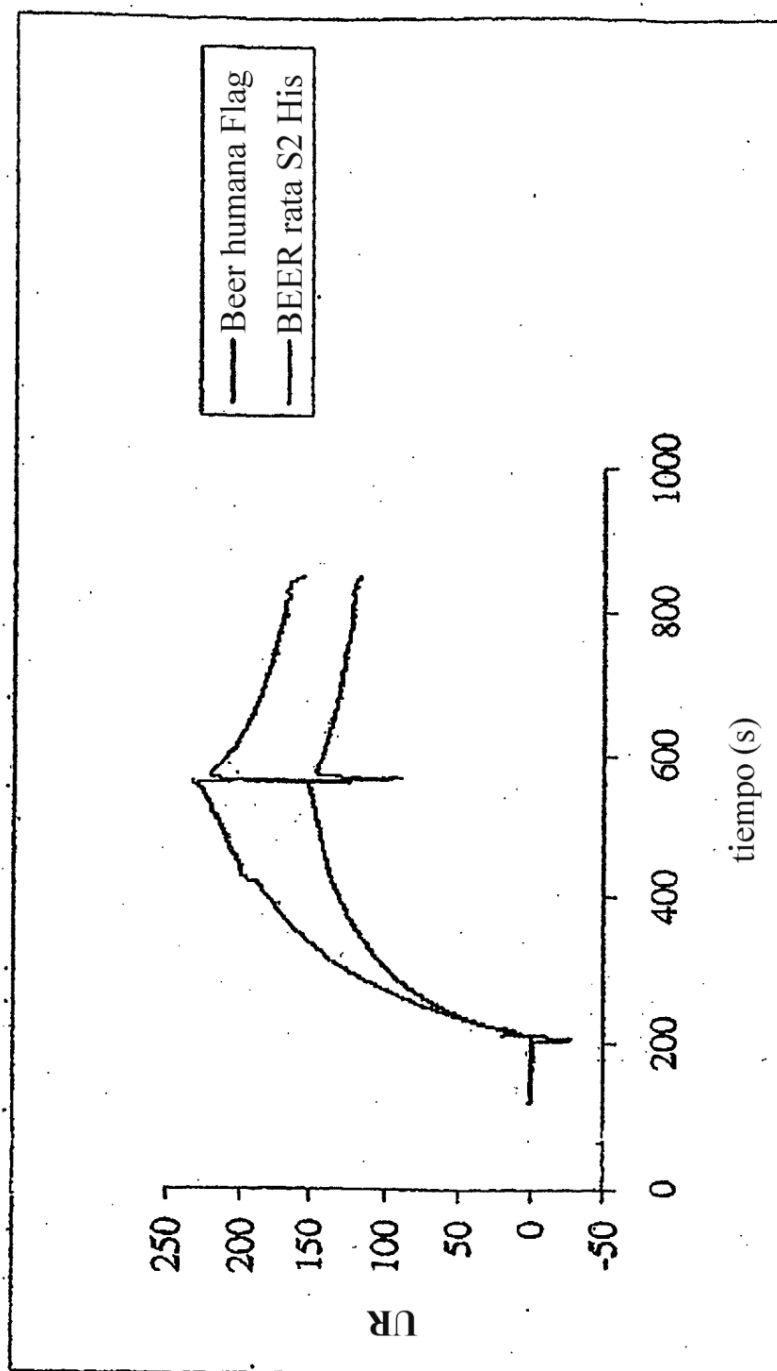


FIGURA 6

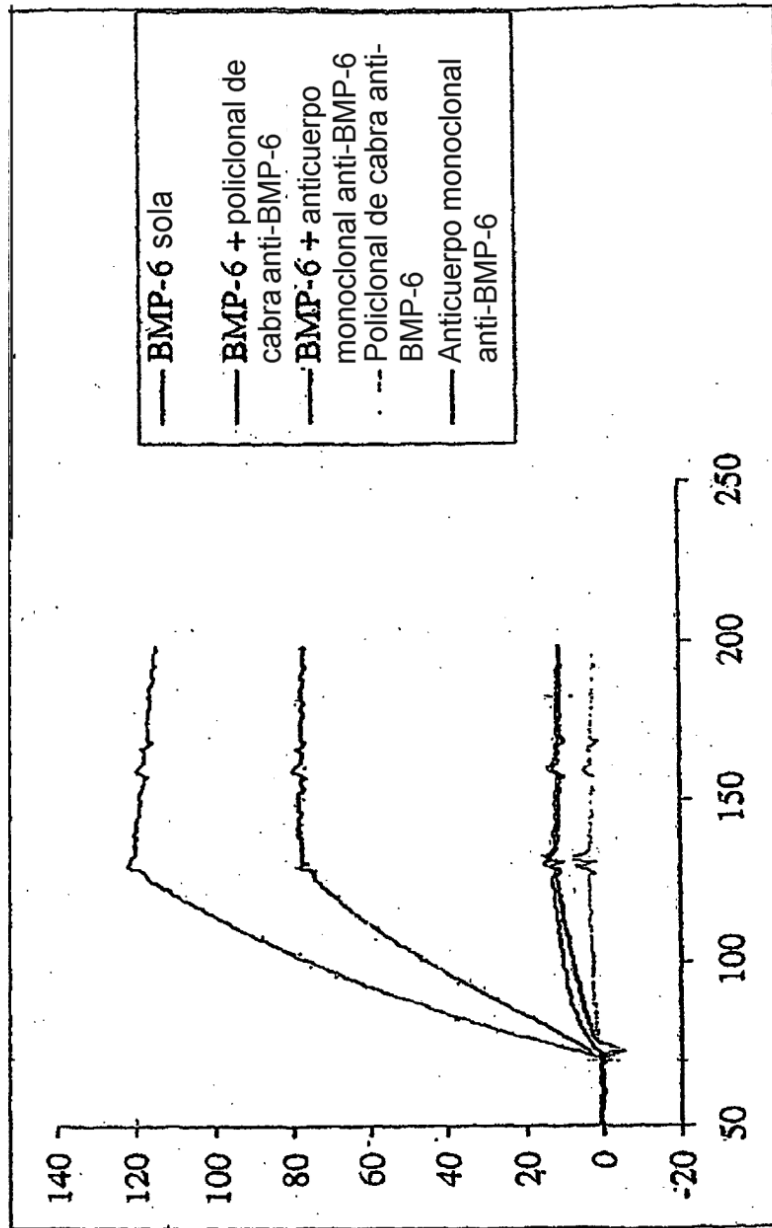


FIGURA 7

\* Policlona de cabra anti-hBMP-6; R&D n° cat. AF507  
Monoclonal de ratón anti-BMP-6; R&D Clon 742219.11

FIGURA 8

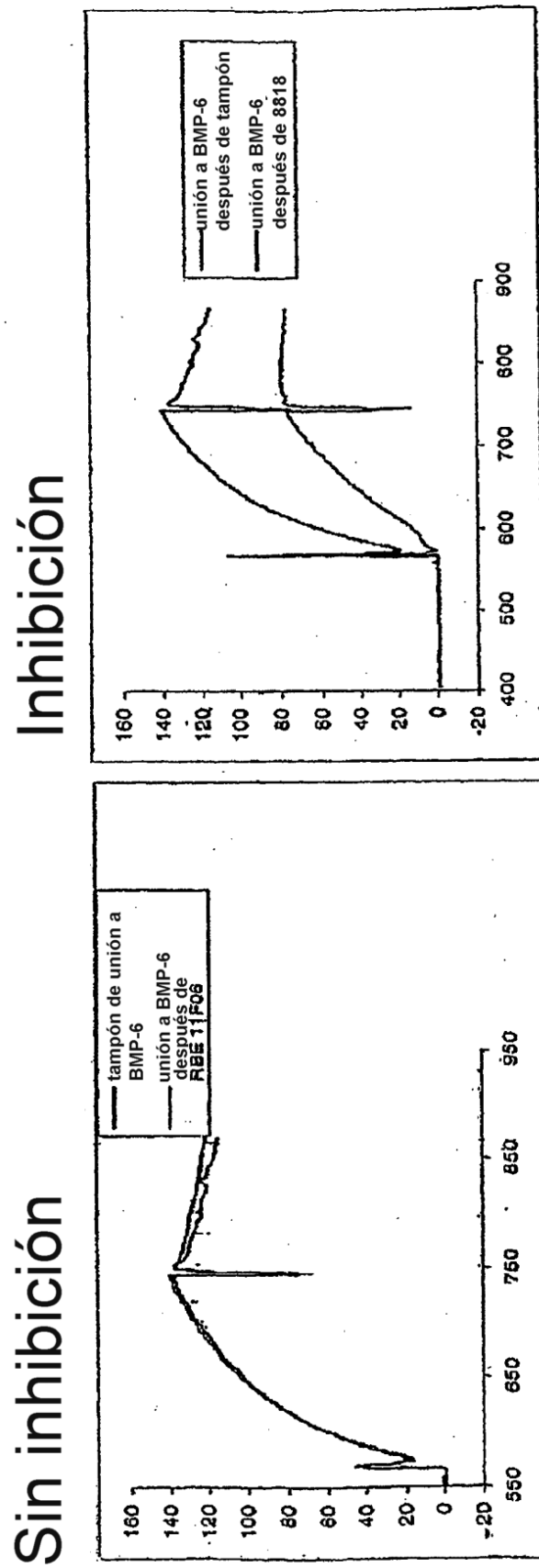


FIGURA 9

