

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 791**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2005 E 05710273 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1715038**

54 Título: **Anticuerpo dirigido contra una proteína asociada a los osteoclastos**

30 Prioridad:

12.02.2004 JP 2004035216

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.11.2013

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku
Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**NOMIYAMA, HISAYUKI;
KUKITA, TOSHIO y
HIRUMA, YOSHIHARU**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 428 791 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo dirigido contra una proteína asociada a los osteoclastos

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo útil para el tratamiento y/o prevención de trastornos óseos metabólicos y a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico,

Técnica anterior

10 Se sabe que los huesos son un órgano dinámico que cambia constantemente entre los ciclos de formación y resorción para la reconstrucción, con el fin de cambiar su propia morfología y de mantener los niveles de calcio en sangre. El hueso sano mantiene un equilibrio entre la formación de hueso por los osteoblastos, la resorción ósea por los osteoclastos y su masa ósea constante. Por el contrario, cuando el equilibrio entre la formación de hueso y la resorción ósea se pierde, se puede desarrollar un trastorno óseo metabólico tal como osteoporosis (Endocrinological Review 13, 66-80, 1992; and Principles of Bone Biology pp. 87-102, 1996, Academic Press, New York).

15 Se han notificado muchos factores implicados en la regulación del metabolismo óseo, incluyendo hormonas sistémicas y citoquinas locales, y sirven para formar y mantener el hueso (Endocrinological Review 13, 66-80, 1992; and Endocrinological Review 17, 308-332, 1996). Un cambio en el tejido óseo con el envejecimiento está ampliamente reconocido como una causa de osteoporosis, pero el mecanismo de su desarrollo abarca varios factores, por ejemplo una secreción menor de hormonas sexuales y una anomalía de los receptores de las hormonas, expresión de los genes en envejecimiento, fracaso en la diferenciación en osteoclastos y/u osteoblastos y disfunción de dichas células, y, por tanto, todavía se conoce poco un acontecimiento fisiológico debido al envejecimiento. La osteoporosis se divide en términos generales entre la osteoporosis tras la menopausia debido a una secreción menor de estrógenos y la osteoporosis senil debido al envejecimiento, pero los avances en las investigaciones básicas sobre los mecanismos de regulación de la formación de huesos y la resorción ósea son esenciales para aclarar el mecanismo de su desarrollo y desarrollar agentes terapéuticos.

20 Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de células madre hematopoyéticas, liberan iones cloruro e hidrógeno sobre la superficie del hueso al que se adhieren para acidificar el espacio entre la superficie ósea y las propias células (American Journal of Physiology 260, C1315-C1324, 1991). Esto produce la descomposición del fosfato cálcico y la activación de las proteasas ácidas, lo que conduce a la resorción ósea.

25 Se ha encontrado que las células precursoras de los osteoclastos se diferencian en osteoclastos mediante estimulación con RANKL (activador del receptor del ligando NF- κ B) que se expresa en la membrana celular de las células osteoblastos/estromales presentes en la superficie del hueso (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 95, 3597-3602, 1998; and Cell 93, 165-176, 1998). Se ha demostrado que RANKL es un factor unido a la membrana producido por células osteoblastos/estromales, su expresión está regulada por un factor de resorción ósea; RANKL induce la diferenciación de las células preosteoclasticas en osteoclastos multinucleados (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 95, 3597-3602, 1998; and Journal of Bone and Mineral Research 23, S222, 1998). Además, se ha encontrado que ratones defectivos desprovistos de RAKL desarrollan una osteopetrosis típica que ha verificado que el RANKL es un inductor fisiológico de la diferenciación en osteoclastos (Nature 397, 315-323, 1999).

30 Para tratar un trastorno óseo o acortar la duración del tratamiento, actualmente se usan bisfosfonatos, vitamina D₃ activada, calcitonina y sus derivados, preparados hormonales tales como estradiol, SERM (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos), ipriflavona, vitamina K₂ (menatetrenona), preparados de calcio y similares. No obstante, estos fármacos no siempre han exhibido un efecto terapéutico satisfactorio y, por tanto, se ha deseado desarrollar fármacos más potentes.

35 Las células dendríticas (denominadas en lo sucesivo en el presente documento "CD" son células presentadoras de antígeno especializadas del sistema inmunológico y se distribuyen por todo el organismo. La proteína transmembrana específica de células dendríticas (denominada en lo sucesivo en el presente documento "DC-STAMP" es una proteína que se extiende a través de la membrana celular de las células dendríticas que se ha clonado a partir de la biblioteca de ADNc de CD derivadas de monocitos (European Journal of Immunology 30, 3585-3590, 2000). Se ha notificado un ADNc de DC-STAMP humano (Nº de acceso en GenBank: NM_030788) y se han notificado dos ADNc de DC-STAMP murinos que son un ADNc de secuencia larga que contiene el tercer exón (Nº de acceso en GenBank: AB109560) y una variante de corte y empalme que tiene un tercer exón corto (Nº de acceso en GenBank: AB109561), respectivamente. Se ha identificado una homología en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente un 74% entre la DC-STAMP humana y la DC-STAMP murina. Como resultado del análisis de hidrofobicidad para las secuencias de aminoácidos, se prevé que las DC-STAMP tienen siete dominios transmembranales. Se considera que la variante de corte y empalme murina que tiene un tercer exón corto tiene el séptimo dominio transmembranal delecionado y, por tanto, en lo sucesivo en el presente documento se indica mediante DC-STAMP Δ T7.

Rho, J et al. DNA and Cell Biology, vol. 21, no. 8, August 2002, pág. 541-549 divulgan datos que demuestran que la

DC-STAMP se expresa, preferentemente, en los osteoclastos maduros.

Se ha indicado que la DC-STAMP se expresa más tras la inactivación de fagocitos mononucleares con IL-4, pero se expresa menos tras su activación con dexametasona (Immunogenetics 53, 105-113, 2001). No obstante, todavía no se ha aclarado la asociación de DC-STAMP con la diferenciación en osteoclastos.

5 Divulgación de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar una sustancia para inhibir las actividades osteoclásticas o un agente para prevenir y/o tratar trastornos óseos metabólicos, tal como la destrucción ósea que se observa en la osteoporosis, la artritis reumatoide, la metástasis de las células cancerosas en el hueso y similares. Los presentes inventores han intentado aclarar las funciones de diferenciación en osteoclastos y su maduración y activación con el fin de identificar un agente eficaz para tratar y/o prevenir los trastornos óseos metabólicos. Como resultado, se ha encontrado que la DC-STAMP está implicada en la diferenciación en osteoclastos y su maduración y activación, y que una expresión menor de DC-STAMP conduce a una menor diferenciación de los osteoclastos. La presente invención se realiza sobre la base de estos hallazgos.

Específicamente, la presente invención comprende:

- (1) un anticuerpo capaz de unirse específicamente a DC-STAMP y suprimir la formación de osteoclastos;
- (2) un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en: Una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2 en el Listado de secuencias, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 4 y una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 6 en el Listado de secuencias, y que suprime la formación de osteoclastos.
- (3) el anticuerpo de acuerdo con (1) o (2), que se caracteriza por que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- (4) el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), que se caracteriza por que el anticuerpo es humanizado.
- (5) anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4), que se caracteriza por que el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano;
- (6) el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5), que se caracteriza por que el anticuerpo es un anticuerpo de tipo IgG.
- (7) una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico, que se caracteriza por que la composición farmacéutica contiene al menos uno de los anticuerpos de acuerdo con (1) a (6):
- (8) una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico, que se caracteriza por que la composición farmacéutica contiene al menos uno de los anticuerpos de acuerdo con (1) a (6) y al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en: bisfosfonatos, vitamina D₃ activada, calcitonina y sus derivados, preparados hormonales tales como estradiol, SERM (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos), ipriflavona, vitamina K₂ (menatetrenona), preparados de calcio, preparados de PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpos anti-PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea), antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos anti-RANKL y OCIF (factor inhibidor de la osteoclastogénesis);
- (9) una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico, que comprende un oligonucleótido antisentido que comprende de 15 a 30 meros complementario de una porción de una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias nucleotídicas proporcionadas en las SEC ID N°: 1, 3 y 5, en la que el oligonucleótido antisentido es capaz de suprimir la formación de osteoclastos;
- (10) la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico de acuerdo con una cualquiera de (7) a (9), que se caracteriza por que el trastorno óseo metabólico es osteoporosis, artritis reumatoide o hipercalcemia cancerosa;
- (11) la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico de acuerdo con una cualquiera de (7) a (9), que se caracteriza por que el trastorno óseo metabólico es osteoporosis;
- (12) la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico de acuerdo con una cualquiera de (7) a (9), que se caracteriza por que el trastorno óseo metabólico es artritis reumatoide;
- (13) la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico de acuerdo con una cualquiera de (7) a (9), que se caracteriza por que el trastorno óseo metabólico es hipercalcemia cancerosa;

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 es un gráfico que muestra la diferenciación de cada tipo de células RAW264 subclonadas en osteoclastos mediante estimulación con RANKL;
- La Figura 2 es un diagrama que muestra la expresión del ARNm de DC-STAMP asociada con la diferenciación de las células RAW-D en osteoclastos;
- La Figura 3 es un diagrama que muestra la expresión del ARNm de DC-STAMP en células RAW-D estimuladas con RANKL, TNF α Y MIP-1 α , respectivamente;

La Figura 4 es un diagrama que muestra la expresión del ARNm de DC-STAMP e células primarias de médula ósea estimuladas con vitamina D3 activada;

La Figura 5 proporciona gráficos que muestran niveles menores de diferenciación de las células RAW-D en osteoclastos causados por ARNs contra DC-STAMP;

5 La Figura 6 es un gráfico que muestra la formación potenciada de osteoclastos a partir de células RAW-D debido a la expresión forzada de la proteína DC-STAMP;

La Figura 7 es un gráfico que muestra la formación suprimida de osteoclastos a partir de células RAW-D debido a un anticuerpo anti-DC-STAMP;

10 La Figura 8 es un gráfico que muestra la formación suprimida de osteoclastos a partir de células de médula ósea murinas debido a un anticuerpo anti-DC-STAMP;

La Figura 9 es un gráfico que muestra la formación suprimida de cavidades de resorción debido a un anticuerpo anti-DC-STAMP;

La Figura 10 proporciona gráficos que muestran perfiles de expresión de genes para RANK, RANKL, catepsina K y TRAP humanos, en tumores de células gigantes;

15 La Figura 11 es un gráfico que muestra un perfil de expresión del gen de la DC-STAMP humana en un tumor de células gigantes; y

La Figura 12 es un gráfico que muestra la formación suprimida de osteoclastos a partir de células mononucleares de sangre periférica humana, debido a un anticuerpo anti-DC-STAMP;

Mejor modo para llevar a cabo la invención

20 La expresión "hibridación en condiciones rigurosas" significa hibridación en una solución de hibridación disponible comercialmente, Solución de hibridación ExpressHyb (fabricada por Clontech Laboratories Inc.) a 68°C o hibridación en condiciones de hibridación en un filtro inmovilizado con ADN en presencia de NaCl 0,7 – 1,0M a 68°C, seguida de lavado con una solución de 0,1-2 x SSC (una solución 1 x SSC contiene NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM) a 68 °C o hibridación en condiciones equivalentes a estas.

25 1. DC-STAMP

Los presentes inventores han encontrado que DC-STAMP se expresa específicamente en tumores de células gigantes. Además, los presentes inventores también han encontrado que DC-STAMP se expresa a un nivel más alto cuando una cepa de células derivadas de monocitos se diferencia en osteoclastos.

30 La DC-STAMP usada en la presente invención puede ser un producto purificado directamente de monocitos, células dendríticas o células de médula ósea de origen humano o de mamíferos no humanos (p. ej., cobaya, rata, ratón, pollo, conejo, cerdo, oveja, vaca, mono etc.), una fracción de membrana celular preparada a partir de las células anteriores, una DC-STAMP sintética elaborada *in vitro* o un producto de ingeniería genética formado en células huésped. Específicamente, en la manipulación génica, se puede obtener una proteína DC-STAMP integrando primero un gen de DC-STAMP en un vector capaz de expresarla, sintetizando después DC-STAMP a partir del
35 vector en una solución que contiene las enzimas necesarias para la transcripción y la traducción, sustratos y materiales que suministran energía o transformando el vector en varias especies de células huésped de origen procariótico o eucariótico para expresar DC-STAMP.

40 La secuencia de nucleótidos del ADNc de la DC-STAMP humana está registrada con el N° de acceso: NM_030788 en GenBank y que se muestra en la SEC ID N°: 1 en el Listado de secuencias; su secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N°: 2 en el listado de secuencias. La secuencia de nucleótidos larga que contiene el tercer exón del ADNc para la DC-STAMP murina está registrada con el N° de acceso: AB 109560 en GenBank y se muestra en la SEC ID N°: 3 en el Listado de secuencias; su secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N°: 4 en el listado de secuencias. La secuencia de nucleótidos que contiene el tercer exón corto del ADNc variante de corte y empalme para la DC-STAMP murina está registrada con el N° de acceso: AB109561 en GenBank y que se
45 muestra en la SEC ID N°: 5 en el Listado de secuencias; su secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N°: 6 en el listado de secuencias. Se puede producir un ADNc para DC-STAMP, por ejemplo, realizando una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo en el presente documento denominada "PCR") usando una biblioteca de ADNc que expresa DC-STAMP como molde y cebadores capaces de amplificar específicamente el ADNc de la DC-STAMP (Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, 487-49), que se denomina la técnica de la PCR.

50 Además, el ADNc para la DC-STAMP incluye un polinucleótido que puede hibridar en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria con al menos una secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N°: 1, 3 y 5 en el listado de secuencias y que codifica una proteína con una actividad biológica comparable a la de la DC-STAMP. Además, el ADNc para DC-STAMP Incluye un polinucleótido que es una variante de corte y empalme transcrita del locus para la DC-STAMP humana o murina o un polinucleótido capz
55 de hibridar con el mismo en condiciones rigurosas y que codifica una proteína con una actividad biológica comparable con la DC-STAMP.

Asimismo, la DC-STAMP incluye una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos formada mediante sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en al menos una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID N°: 2, 4 y 6 en el listado de secuencias y que tiene una actividad biológica comparable a la de la DC-

STAMP. Además, la DC-STAMP incluye una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de corte y empalme transcrita a partir del locus de la DC-STAMP murina o humana o una secuencia de aminoácidos formada mediante sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en el mismo y que tiene una actividad biológica comparable a la DC-STAMP.

5 2. Detección de trastornos óseos metabólicos

El análisis de un grupo de muestras de ensayo procedentes de varios tejidos humanos para determinar el nivel de expresión del gen de DC-STAMP muestra que el gen se expresa a un nivel significativamente mayor en los tumores de células gigantes (TCG), que es un tumor óseo abundante en las células gigantes multinucleares osteoclasticas que se caracteriza por hallazgos clínicos de destrucción ósea osteolítica (Bullough et al., Atlas of Orthopedic Pathology 2nd edition, págs. 17.6-17.8, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1992)).

También se ha encontrado que DC-STAMP se expresa a un nivel más alto cuando una cepa de células derivadas de monocitos se diferencia en osteoclastos.

De acuerdo con esto, se cree que la DC-STAMP está asociada con afecciones humanas, tales como el TCG, que aumentan la resorción ósea. En otras palabras, la medición del nivel de expresión de DC-STAMP en diferentes tipos de células y/o diferentes tejidos permite la determinación del estado de trastornos óseos metabólicos que se pueden desarrollar debido a la sobreexpresión de DC-STAMP. En el presente documento, los trastornos óseos metabólicos incluyen, entre otros, osteoporosis (osteoporosis tras menopausia, osteoporosis senil, osteoporosis secundaria debido al uso de un esteroide o inmunosupresor y osteoporosis asociada con artritis reumatoide), destrucción ósea causada por artritis reumatoide, hipercalcemia cancerosa, destrucción ósea causada por mieloma múltiple o metástasis de cáncer en el hueso, pérdida de dientes debido a periostitis dental, osteolisis alrededor de las articulaciones artificiales, destrucción ósea debido a osteomielitis crónica, enfermedad de Paget de los huesos, osteodistrofia renal y osteogénesis imperfecta.

La "muestra de ensayo" usada para examinar el nivel de expresión de DC-STAMP hace referencia a una muestra de un tejido, tal como sangre, médula ósea, fluidos corporales, próstata, testículo, pene, vejiga urinaria, riñón, cavidad oral, faringe, labios, lengua, encía, nasofaringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, colon, hígado, vesícula biliar, páncreas, nariz, pulmones, tejidos blandos, piel, mama, útero, ovarios, cerebro, tiroides, ganglios linfáticos, músculo, tejido graso o similares, de una excreción o similar, pero, en la presente invención, preferentemente es sangre o médula ósea.

(1) El procedimiento de detección de un trastorno óseo metabólico que usa el nivel de expresión del gen de DC-STAMP

es, específicamente, un procedimiento que comprende las etapas de:

- (1) extraer la fracción de ARN total de una muestra de ensayo obtenida de un sujeto;
- (2) extraer una fracción de ARN total de una muestra de ensayo obtenida de una persona sana;
- 35 3) medir el nivel de expresión del gen de DC-STAMP en la fracción de ARN total de la etapa 1) y en la fracción ARN total de la etapa 2), respectivamente; y
- 4) analizar una diferencia en el nivel de expresión del gen medida de acuerdo con la etapa 3) entre la fracción de ARN total de la etapa 1) y la fracción ARN total de la etapa 2), para detectar un trastorno óseo metabólico en el sujeto de acuerdo con la etapa 1).

40 Las etapas se describirán específicamente a continuación.

a) La etapa 1) de extraer la fracción de ARN total de una muestra de ensayo obtenida de un sujeto

En la extracción de la fracción de ARN total de la muestra de ensayo, un tejido humano (obtenido de acuerdo con un procedimiento que cumple una norma de laboratorio ética adecuada) se puede suspender directamente en un disolvente para la extracción de ARN (por ejemplo, fenol o similar, que contiene un componente para inactivar las ribonucleasas) o sus células se pueden recuperar mediante un procedimiento de raspado de tejido cuidadosamente para dejar las células de tejido intactas, o tratar el tejido con una proteasa tal como tripsina para extraer las células suavemente y, después, someterlas a la etapa de extracción de ARN.

El ARN se puede extraer mediante cualquier procedimiento, incluida ultracentrifugación en tiocianato de guanidina/cloruro de cesio, tiocianato de guanidina/fenol caliente, guanidina clorhidrato y tiocianato de guanidina ácida/fenol/cloroformo (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987), 162, 156-159), pero, preferentemente, mediante tiocianato de guanidina ácida/fenol/cloroformo. Adicionalmente, un reactivo disponible comercialmente, tal como un reactivo para la extracción de ARN (por ejemplo, ISOGEN (fabricado por Nippon Gene Co., Ltd.) o reactivor TRIZOL (fabricado por Gibco BRL)), se puede usar de acuerdo con el protocolo proporcionado con el reactivo.

55 Preferentemente, la fracción de ARN total resultante se puede purificar adicionalmente en el ARNm solo en caso

necesario. La elección del procedimiento de purificación no es limitada, pero el ARNm se puede purificar mediante, por ejemplo, adsorción del ARNm en una sonda oligo(dT) biotinilada, captura del ARNm sobre partículas paramagnéticas unidas a estreptavidina mediante unión de biotina a estreptavidina, lavado de las partículas y, después, elución del ARNm. Se puede usar otro procedimiento en el que el ARNm se adsorbe en una columna de celulosa unida a oligo(dT) y, después, se eluye. No obstante, la etapa de purificación del ARNm no es esencial para el procedimiento, la fracción del ARN total se puede usar en una etapa posterior si se puede detectar la expresión de un polinucleótido de interés.

b) La etapa 2) de extraer la fracción de ARN total de una muestra de ensayo obtenida de una persona sana

Como se usa en el presente documento, una persona sana significa una persona que no está afectada por un trastorno óseo metabólico. Se puede determinar si una persona es sana o no midiendo el nivel de DC-STAMP en la persona y viendo si el nivel está o no dentro de un intervalo numérico predeterminado del nivel normal de DC-STAMP. Asimismo, se puede determinar si un sujeto es sano o no mediante examen preliminar de la correlación entre los niveles de DC-STAMP y el nivel de formación de un trastorno óseo metabólico y midiendo el nivel de expresión de DC-STAMP en una muestra de ensayo tomada del sujeto. Una fracción de ARN total de una persona sana se puede preparar de acuerdo con la etapa 1) mencionada anteriormente.

c) La etapa 3) de medir el nivel de expresión del gen de DC-STAMP en la fracción de ARN total de la etapa 1) y en la fracción ARN total de la etapa 2), respectivamente

En el presente documento, el nivel de expresión del gen de DC-STAMP está representado por el nivel de expresión de un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 1 en el Listado de secuencias o de un polinucleótido capaz de hibridar en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N°: 1 en el listado de secuencias.

El nivel de expresión del gen de DC-STAMP se puede medir mediante un procedimiento usando una muestra inmovilizada o mediante uno de varios otros procedimientos, como se describe más adelante.

(a) Mediciones usando muestras inmovilizadas

(i) Muestras inmovilizadas

La muestra inmovilizada incluye, por ejemplo, lo siguiente:

(i-1) Circuitos génicos

Se pueden usar circuitos génicos que se forman inmovilizando oligonucleótidos antisentido sintetizados en base a las secuencias esta (marcador de secuencia expresado) o secuencias de ARNm. Estos circuitos incluyen, entre otros, circuitos génicos fabricados por Affymetrix Inc. (Lipshutz, R. J. et al., *Nature Genet.* (1999) 21, suplemento, 20-24), y se pueden preparar en base a cualquier procedimiento conocido, Si se va a analizar el ARNm de células humanas, el circuito génico es, preferentemente, de origen humano, tal como U95 o U133 humano fabricados por Affymetrix Inc. No obstante, no se limita a estos, pero puede obtenerse de, por ejemplo, una especie animal estrechamente relacionada.

(i-2) Matrices o filtros de membrana formados por inmovilización de ADNc o productos de RT-PCR preparados a partir de ARN total humano o ARN total específico de tejido:

Estos ADNc o productos de RT-PCR son productos clonados obtenidos mediante transcripción inversa o PCR con cebadores preparados en base a la información de la secuencia, tal como de una base de datos de EST humanos. Los ADNc o productos de RT-PCR se pueden preparar a partir de ARN total, que se expresa a diferentes niveles en personas que sufren un trastorno óseo metabólico y personas sin el trastorno y se pueden seleccionar con antelación por medio de la técnica de sustracción (Diatchenki, L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1996) 93, 6025-6030), la técnica de expresión diferencial (Liang, P. et al., *Nucleic Acids Res.*, (1992) 23, 3685-3690) o similares. Las matrices o filtros de membrana pueden ser productos comerciales (por ejemplo, IntelliGene fabricados por Takara Bio Inc.), o se pueden preparar inmovilizando los ADNc o los productos de RT-PCR descritos anteriormente con un localizador disponible comercialmente (por ejemplo, GMS417 Arrayer fabricado por Takara Bio Inc.).

(ii) Preparación y análisis de sondas

Las sondas marcadas se preparan no marcando un clon de ARNm concreto sino marcando todos los ARNm expresados. El material de partida para la preparación de sondas puede ser ARNm no purificados, pero, deseablemente, es ANR poli(A) + purificados mediante un procedimiento descrito anteriormente. La preparación, detección y análisis de sondas marcadas se describe más adelante, de modo que la elección del procedimiento depende de las diferentes muestras inmovilizadas.

(ii-1) Circuitos génicos fabricados por Affymetrix Inc.

Las sondas de ARNc marcadas con biotina se preparan de acuerdo con un protocolo (un manual técnico para el análisis de expresión por Affymetrix Inc.) provisto de un circuito génico fabricado por Affymetrix Inc. Después, las sondas se hibridan y analizan usando un instrumento analítico (GeneChip Fluidics Station 400) fabricado por Affymetrix Inc. de acuerdo con un protocolo (el manual técnico para el análisis de expresión) provisto del circuito génico fabricado por Affymetrix Inc., mediante la detección y el análisis de la emisión de luz desde avidina.

(ii-2) Matrices

En la preparación de ADNc de ARN poli(A)⁺ mediante transcripción inversa, es necesario marcar los ADNc para detectarlos. Si se tienen que marcar con un pigmento fluorescente, a la mezcla se añade d-UTP o similares marcados con el pigmento fluorescente (por ejemplo, Cy3 or Cy5) para marcar los ADNc. En este momento, si los ARN poli(A)⁺ de una muestra de ensayo tomada de un sujeto y los ARN poli(A)⁺ de una muestra de ensayo tomada de una persona sana se marcan con diferentes pigmentos, respectivamente, los ARN poli(A)⁺ de ambas muestras de ensayo se pueden mezclar en una hibridación posterior. Si se usa una matriz comercialmente disponible de Takara Bio Inc. se llevan a cabo, por ejemplo, hibridación y labado de acuerdo con un protocolo proporcionado por la empresa y después se detectan las señales fluorescentes mediante un detector de señal fluorescente (por ejemplo, un escáner de matriz GMS418 fabricado por Takara Bio Inc. o similares) y se analizan. No obstante, la elección de la matriz usada en el presente documento no está limitada a productos comerciales, sino que puede ser propia o encargarse especialmente.

(ii-3) Filtros de membrana

Para preparar ADNc de ARN poli(A)⁺ con una transcriptasa inversa, se preparan sondas marcadas añadiendo un isótopo radiactivo (por ejemplo, d-CTP o similar), después se hibrida del modo habitual usando, por ejemplo, un Atlas System (made by Clontech Laboratories Inc.) que es una micromatriz de filtro disponible comercialmente, y se lava; a esto le sigue detección y análisis usando un instrumento analítico (por ejemplo, un Atlas Image fabricado por Clontech Laboratories Inc.).

En cualquier procedimiento de acuerdo con los puntos (ii-1) a (ii-3) anteriores, las sondas derivadas de cada tejido humano se hibridan con el mismo lote de muestras inmovilizadas. Las condiciones de hibridación son las mismas, a excepción del uso de sondas diferentes. Si las sondas diferentes se marcan con diferentes pigmentos fluorescentes, una mezcla de las dos sondas diferentes se puede hibridar con la misma muestra inmovilizada en seguida para leer las intensidades de la fluorescencia ((Brown, P. O. et al., Nature Genet., (1999) 21, suplemento, 33-37).

(b) Otros procedimientos de medición

Otros procedimientos de medición incluyen, entre otros, clonación por sustracción (Experimental Medicine, Separate Volume, New Handbook on Genetic Engineering, Yodosha Co; Ltd. (1996), 32-35), expresión diferencial (Basic Experimental Biochemistry No. 4, Nucleic Acids and Genes II; Applications, Tokyo Kagaku Dozin Co., Ltd. (2001), 125-128), y procedimientos que usan un gen indicador (cloranfenicol acetiltransferasa, por ejemplo pCAT3-Basic Vector from Promega Corporation; β -galactosidasa, por ejemplo, p β gal-Basic de Promega Corporation; fosfatasa alcalina secretora, por ejemplo pSEAP2-Basic de Clontech; y proteína verde fluorescente, por ejemplo pEGFP-1 de Clontech Laboratories Inc.).

d) La etapa 4) de analizar una diferencia en el nivel de expresión del gen medida de acuerdo con la etapa 3) entre la fracción de ARN total de la etapa 1) y la fracción ARN total de la etapa 2), para detectar un trastorno óseo metabólico en el sujeto de acuerdo con la etapa 1).

Cuando se examina una diferencia en el nivel de expresión de DC-STAMP entre una muestra de ensayo de una persona sana y la de un sujeto, y si este último tiene un nivel de expresión significativamente mayor, es probable que el sujeto sufra un trastorno óseo metabólico, que, por consiguiente, se puede detectar. La expresión "nivel de expresión significativamente mayor" significa que la muestra de ensayo del sujeto tiene un valor de la diferencia media para el gen de DC-STAMP significativamente mayor que para la muestra de ensayo de la persona sana, por ejemplo cuando se usa un circuito génico de Affymetrix Inc. junto con una micromatriz Suite Ver. 3.0 de Affymetrix Inc. como herramienta analítica. Asimismo, para detectar un trastorno óseo metabólico, se puede medir el nivel de expresión del gen DC-STAMP en un sujeto para comprobar si el nivel está o no dentro de un intervalo numérico predeterminado del nivel normal y si el nivel está por encima del intervalo normal, se puede determinar que el sujeto sufre un trastorno óseo metabólico. Además, se puede determinar si un sujeto es sano o no realizando un examen preliminar de la correlación entre los niveles de expresión del gen de DC-STAMP y el nivel de formación de un trastorno óseo metabólico en personas sanas y midiendo el nivel de expresión del gen de DC-STAMP en una muestra de ensayo tomada del sujeto.

(2) El procedimiento de detección de un trastorno óseo metabólico que usa el nivel de expresión del gen de DC-STAMP (nivel de expresión de la proteína)

Un procedimiento de detección de un trastorno óseo metabólico que usa el nivel de expresión de DC-STAMP es, específicamente, un procedimiento que comprende las etapas de:

- 1) medir el nivel de expresión de DC-STAMP en una muestra de ensayo tomada de un sujeto;
- 2) medir el nivel de expresión de la proteína de acuerdo con la etapa 1) en una muestra de ensayo tomada de una persona sana; y
- 3) analizar una diferencia en el nivel de expresión entre la proteína medida en la etapa 1) y la proteína medida en la etapa 2) para detectar un trastorno óseo metabólico en el sujeto.

Las etapas se describirán específicamente a continuación.

1) La etapa 1) de medir el nivel de expresión de DC-STAMP en una muestra de ensayo tomada de un sujeto

(a) Preparación de una muestra para el ensayo de proteínas de una muestra de ensayo

Opcionalmente, una muestra de ensayo se puede centrifugar a velocidad alta para eliminar la materia insoluble y después usarse para preparar una muestra para ELISA/RIA o transferencia de tipo Western.

La muestra para ELISA/RIA puede ser, por ejemplo, un extracto obtenido de sangre o médula ósea u, opcionalmente, una dilución de la misma en un tampón. Una muestra para transferencia de tipo Western (para electroforesis) se puede preparar mezclando, por ejemplo, un extracto obtenido de sangre o médula ósea u, opcionalmente una dilución de la misma, en un tampón con un tampón de muestra que contiene 2-mercaptoetanol (fabricado por, por ejemplo, Sigma Co.) para electroforesis en SDS-poliacrilamida. En la transferencia puntual/por ranuras, la muestra puede ser, por ejemplo, un extracto obtenido de sangre o médula ósea u, opcionalmente, una dilución de la misma en un tampón, y se adsorbe directamente sobre una membrana con un dispositivo de transferencia o similar.

(b) Inmovilización de una muestra

Para detectar específicamente la proteína en una muestra preparada como se ha descrito anteriormente, la muestra puede no estar inmovilizada pero puede precipitarse mediante inmunoprecipitación, un procedimiento de unión a ligando o similar o puede inmovilizarse como tal. Las membranas que se pueden usar para inmovilizar la proteína usada en la transferencia de tipo Western o la transferencia puntual incluyen una membrana de nitrocelulosa (fabricada por, por ejemplo, Bio-Rad Laboratories Inc.), membrana de ailon (por ejemplo Hibond-ECL de Amersham Pharmacia Biotech), membrana de algodón (por ejemplo Blot Absorbent Filter de Bio-Rad Laboratories Inc.) o membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (fabricada por, por ejemplo, Bio-Rad Laboratories Inc.).

Para detectar y cuantificar la proteína mediante la técnica de ELISA/RIA, la muestra o una dilución de la misma (por ejemplo, diluida con solución salina tamponada con fosfato (denominada "PBS") que contiene 0,05% de azida sódica) se introduce en una placa especial de 96 pocillos (por ejemplo, Immunoplate Maxisorp de Nalge Nunc International) y se deja reposar de 4°C a temperatura ambiente durante la noche o a 37 °C durante 1-3 horas, de modo que la proteína se adsorbe en el fondo de los pocillos para su inmovilización.

Se puede obtener un anticuerpo contra DC-STAMP inmunizando un animal con DC-STAMP o con cualquier polipéptido que forma parte de una secuencia de aminoácidos de DC-STAMP, recogiendo el anticuerpo producido *in vivo* u purificándolo de acuerdo con un procedimiento convencional (véase, por ejemplo, Experimental Biochemistry New Lecture Series 1: Proteins 1, pág. 389-397, 1992). Además, se puede obtener un anticuerpo monoclonal fusionando células formadoras de anticuerpos capaces de producir un anticuerpo anti-DC-STAMP con células de mieloma para establecer un hibridoma de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler and Milstein, Nature, (1975) 256, 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody, (1980) 365-367, Penum Press, N.Y.).

La DC-STAMP usada como antígeno se puede obtener mediante expresión del gen de DC-STAMP en células huésped mediante ingeniería genética. Específicamente, se puede crear un vector capaz de expresar el gen de DC-STAMP y transfectar en células huésped para expresar el gen y, después, DC-STAMP, que a continuación se puede purificar. Como alternativa, se pueden usar como antígeno as propias células huésped en las que se ha expresado DC-STAMP, o fragmentos de membrana de las mismas.

(c) Mediciones del nivel de expresión de DC-STAMP

El nivel de expresión de DC-STAMP viene indicado por el nivel de expresión de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2 en el listado de secuencias.

Este nivel de expresión se puede medir usando el anticuerpo anti-DC-STAMP descrito anteriormente mediante un procedimiento conocido, ta como transferencia de tipo Western o transferencia puntual/por ranuras.

2) La etapa 2) de medir el nivel de expresión de la proteína de acuerdo con la etapa 1) en una muestra de ensayo tomada de una persona sana

El nivel de expresión de DC-STAMP en una muestra de ensayo tomada de una persona sana se mide mediante un procedimiento similar al de la etapa 1).

3) La etapa 3) de analizar una diferencia en los niveles de expresión entre la proteína medida en la etapa 1) y la

proteína medida en la etapa 2) para detectar un trastorno óseo metabólico en el sujeto

Se analiza una diferencia en los niveles de expresión de DC-STAMP entre una muestra de ensayo de una persona sana y muestra de ensayo de un sujeto, para ver si la muestra de ensayo del sujeto expresa DC-STAMP a un nivel significativamente mayor; se determinaría que una muestra de ensayo con un nivel de expresión de DC-STAMP
5 procede de un sujeto que es probable que sifra o que esté sufriendo un trastorno óseo metabólico.

Asimismo, para comprobar si el nivel de DC-STAMP está o no dentro de un intervalo numérico predeterminado normal se puede medir un nivel de DC-STAMP en un sujeto, y si el nivel está por encima del intervalo normal, se puede determinar que el sujeto sufre un trastorno óseo metabólico para detectar el trastorno óseo metabólico. Además, se puede determinar si un sujeto es sano o no realizando un examen preliminar de la correlación entre los
10 niveles de expresión del gen de DC-STAMP y los niveles del metabolismo óseo en personas sanas y midiendo el nivel de expresión de DC-STAMP en una muestra de ensayo tomada del sujeto.

3. Ensayo del gen de DC-STAMP y DC-STAMP

El gen de DC-STAMP y DC-STAMP se expresan específicamente en los tumores de células gigantes y a un nivel mayor cuando una cepa de células derivadas de monocitos se diferencia en osteoclastos.

15 (1) Análisis funcional del gen de DC-STAMP y DC-STAMP usando sobreexpresión de DC-STAMP

Para examinar a función de DC-STAMP, primero se obtiene un ADNc de longitud completa a partir de una biblioteca de ADNc derivada de células que expresan DC-STAMP de acuerdo con un procedimiento conocido, tal como hibridación de colonias. El ADNc de longitud completa se introduce en células humanas o células de mamífero no humanas (por ejemplo, células de cobaya, rata, ratón, pollo, conejo, cerdo, oveja, vaca, mono o similar) para
20 expresarlo a un nivel elevado y, por tanto, examinar el efecto del nivel de expresión alto en las células.

Para expresar el ADNc en animales individuales, el ADNc de longitud completa resultante se integra en un vector viral y se les administra. El ADNc se integra en un vector viral, por ejemplo un virus de ADN, tal como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, virus vacunales, virus de viruela o poliovirus, o un virus de ARN para la transferencia génica a los animales. Virus particularmente preferidos incluyen retrovirus, adenovirus, virus
25 adenoasociados, virus vacunales.

Una transferencia génica no mediada por virus puede incluir la inyección directa de un plásmido de expresión en un músculo (vacunación con ADN), el procedimiento del liposoma, lipofección, microinyección, transfección con fosfato cálcico y electroporación, particularmente preferida es la vacunación del ADN y el procedimiento del liposoma.

El ADNc de longitud completa se puede transferir a células cultivadas, tales como células derivadas de monocitos, células derivadas de ganglios linfáticos, miocitos, hepatocitos, adipocitos o células dérmicas que son de origen humano o de mamífero no humano (p. ej., cobayas, cerdos, ratas, ratones, pollos, conejos, ovejas, vacas, monos etc.) para la expresión a un nivel elevado y examinar el efecto de la expresión de alto nivel sobre las funciones de cada tipo de células, tal como sobre la función del metabolismo óseo, incluida la diferenciación y maduración de los osteoclastos, o sobre la morfología celular.

En la transferencia del ADNc de longitud completa al animal o las células, un promotor adecuado y una secuencia asociada con la expresión fenotípica se integran en el vector, que después se usará para transformar las células huésped. Los promotores de expresión usados para células animales de vertebrados tienen un promotor localizado cadena arriba del gen que se va a expresar, uniones de corte y empalme para ARN, un sitio de poliadenilación, una secuencia de terminación de la transcripción y otros, y, opcionalmente, un origen de replicación. Ejemplos de
40 vectores de expresión incluyen, entre otros, pSV2dhfr que tiene el promotor temprano de SV40 (Subramani, S. et al., Mol. Cell Biol., (1981) 1, 854-864), y pCI-neo (from Promega Corporation), vectores retrovirales pLNCX, pLNSX, pLXIN, pSIR (de Clontech Laboratories Inc.), y vectores cósmidos (Takara Bio Inc.) cada uno de los cuales tiene el promotor temprano del CMV. El vector de expresión se puede transferir a células RAW264.7 derivadas de monocitos murinos (ATCC, N° Cat. TIB-71), células RAW264 (ECACC, n° cat. 85062803), células RAW-D (Watanabe et al., J. Endocrinol., (2004) 180, 193-201); una cepa deficiente en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4126-4220) de células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, 175-182; ATCC: CRL-1650) o células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61); células 293 derivadas de riñón de feto humano (ATCC: CRL-1573) o similares, por medio de un procedimiento que incluye, entre otros, el procedimiento de dietilaminoetil(DEAE)-dextrano (Luthman, H. and Magnusson, G., Nucleic Acids Res., (1983) 11, 1295-1308), coprecipitación en fosfato cálcico-ADN (Graham, F. L. and van der Eb, A. J., Virology, (1973) 52, 456-457) y electroporación por pulsos (Neumann, E. et al., EMBO J., (1982) 1,841-845). Por tanto, se puede obtener un transformante deseado.

Además, se pueden crear animales transgénicos que expresan un gen diana a un nivel elevado de animales sanos mediante manipulación genética para examinar los efectos de la expresión a nivel alto sobre la morfología celular.

55 (2) Análisis funcional del gen de DC-STAMP usando un nivel más bajo de expresión de DC-STAMP

La función de DC-STAMP también se puede analizar suprimiendo la expresión de DC-STAMP y examinar los efectos de un nivel más bajo de expresión sobre la diferenciación y maduración de los osteoclastos o sobre la morfología celular.

5 Un supresor de la expresión de DC-STAMP puede ser un ácido nucleico antisentido, un ARNsi o similar que actúa contra el gen de DC-STAMP. Un inhibidor de la función de DC-STAMP puede ser un anticuerpo capaz de unirse específicamente a DC-STAMP.

10 La supresión de la expresión de DC-STAMP o inhibición de la función de DC-STAMP se puede aplicar para examinar los efectos de la misma sobre la función de cada tipo de células, específicamente la función relacionada con el metabolismo óseo, tal como la diferenciación y la maduración de los osteoclastos o sobre la morfología celular. Además, se pueden crear animales defectivos a partir de animales que sufre, o no, un trastorno óseo metabólico, para examinar el estado resultante de las células o el tejido.

4. Un kit para la detección del gen de DC-STAMP y/o DC-STAMP

El gen de DC-STAMP y/o DC-STAMP se pueden detectar con un kit que contiene al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 1) un cebador oligonucleotídico que tiene una longitud de 15 a 30 nucleótidos contiguos para la amplificación específica de al menos un polinucleótido seleccionado de: un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 en el Listado de secuencias, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 3, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 5;
- 20 2) una sonda polinucleotídica que tiene 15 o más nucleótidos contiguos capaces de hibridar en condiciones rigurosas con al menos un polinucleótido seleccionado de: un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 en el Listado de secuencias, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 3, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 5, para la detección del polinucleótido;
- 25 3) una muestra en fase sólida con al menos un polinucleótido seleccionado de: un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1 en el Listado de secuencias, un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 3, y un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 5, inmovilizada;
- 30 4) un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos una proteína seleccionada de: una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2 en el Listado de secuencias, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 4 y una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 6, para la detección de la proteína; y
- 5) un anticuerpo secundario capaz de unirse a un anticuerpo de acuerdo con 4).

35 El cebador de acuerdo con el punto 1) anterior se puede diseñar fácilmente en un procedimiento convencional, usando, por ejemplo, software disponible comercialmente para diseño de cebadores (por ejemplo, paquete Wisconsin GCG Versión 10.2) y usarse para amplificación basada en una secuencia de nucleótidos del gen de DC-STAMP (una o más secuencias de nucleótidos tal como se proporciona mediante las SEC ID N°: 1, 3 y/o 5 en el listado de secuencias). La sonda de acuerdo con el punto 2) anterior es un polinucleótido capaz de hibridar específicamente con DC-STAMP que tiene una longitud de nucleótidos de 100-1.500, preferentemente de 300-600.

40 El cebador y la sonda se pueden marcar con un marcador adecuado (por ejemplo, un marcador enzimático, un marcador radiactivo, un marcador fluorescente o similar) y se puede añadir a un ligador.

45 La muestra en fase sólida de acuerdo con el punto 3) anterior se puede preparar inmovilizando la sonda de acuerdo con el punto 2) anterior en una fase sólida, tal como una placa de vidrio, membrana de nailon y similares. Los procedimientos para preparar la muestra en fase sólida ya se han descrito en la subsección "(1) El procedimiento de detección de un trastorno óseo metabólico usando el nivel de expresión del gen de DC-STAMP" en la sección "2. Detección de trastornos óseos metabólicos", y dichas muestras inmovilizadas incluyen circuitos génicos, matrices de ADNc, matrices de oligos y filtros de membrana.

50 El kit divulgado en el presente documento puede además contener una ADN polimerasa termoestable, dNTP (un cóctel de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y un tampón. Puede ser un ejemplo de la ADN polimerasa termoestable la ADN polimerasa de Tac, ADN polimerasa de LA (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.), ADN polimerasa de Tth y ADN polimerasa de Pfu DNA polymerase El tampón se puede seleccionar en función de la ADN polimerasa usada en el presente documento y opcionalmente puede contener Mg^{2+} y similares.

55 Los anticuerpos de acuerdo con los puntos 4) y 5) anteriores se pueden preparar mediante un procedimiento descrito en la subsección "(2) El procedimiento de detección de un trastorno óseo metabólico usando el nivel de expresión del gen de DC-STAMP (nivel de expresión de la proteína)" en la sección "2. Detección de trastornos óseos metabólicos", o en la sección "6. Producción de anticuerpos anti-DC-STAMP que se describen más adelante. Los anticuerpos se pueden marcar con un marcador adecuado (por ejemplo, un marcador enzimático, un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, o similares).

El kit divulgado en el presente documento se puede usar para la detección del gen de DC-STAMP y/o DC-STAMP, así como la determinación de la presencia o ausencia de un trastorno óseo metabólico y para la detección selectiva con el fin de identificar un supresor del progreso patológico de un trastorno óseo metabólico.

5. El procedimiento de detección selectiva de un supresor de la diferenciación en osteoclastos

- 5 Como se divulga en el presente documento, se proporciona un procedimiento de detección selectiva de un supresor de la diferenciación en osteoclastos midiendo el nivel de expresión del gen de DC-STAMP y/o DC-STAMP.

Como se divulga en el presente documento, se proporciona un procedimiento de detección selectiva de una sustancia terapéutica y/o preventiva de trastornos óseos metabólicos identificando una sustancia capaz de inhibir la actividad de DC-STAMP de potenciar la diferenciación en osteoclastos.

- 10 Una "sustancia de ensayo" se refiere a una sustancia a analizar su actividad como supresora de la diferenciación en osteoclastos. La sustancia de ensayo puede ser un compuesto, metabolito microbiano, un extracto de tejidos de plantas o animales, derivados de los mismos o una mezcla de los mismos. Los ácidos nucleicos o derivados de los mismos diseñados para disminuir el nivel de expresión de DC-STAMP (incluidos oligonucleótidos antisentido, ribozimas, ARNds y ARNsi) se pueden usar como sustancia de ensayo. La sustancia de ensayo se puede
- 15 administrar a cualquier dosis adecuada o a cualquier concentración adecuada, o a múltiples dosis preparadas, por ejemplo mediante dilución en serie. Se puede administrar en cualquier fase adecuada, tal como sólido o líquido, o como solución en un tampón adecuado o en una forma combinada con un aditivo, tal como un estabilizante. Si se usan cultivos celulares para la detección selectiva, las células se pueden cultivar en un medio. Las células se pueden añadir al medio al principio del cultivo o durante el cultivo, y también en varios alícuotas. El periodo durante
- 20 el cual el cultivo se expone a la sustancia de ensayo se puede fijar según sea adecuado pero es, preferentemente, de 30 minutos a 2 semanas, más preferentemente de 30 minutos a 48 horas. Si la sustancia de ensayo se administra a animales individuales, se puede administrar por vía oral, mediante inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, infusión transdérmica, inyección subcutánea o mediante otras vías, dependiendo de las propiedades físicas y/o de otro tipo de la sustancia de ensayo. El intervalo de tiempo desde la administración de la sustancia de
- 25 ensayo hasta la obtención de la muestra de ensayo se puede fijar según sea adecuado.

- Las células cultivadas usadas en un procedimiento de detección selectiva como se ha divulgado en el presente documento pueden ser células de mamífero sanas o células capaces de proliferar de forma anormal, tales como células cancerosas, siempre que pueda expresar DC-STAMP, incluidas, por ejemplo, entre otras, células RAW264.7
- 30 derivadas de monocitos (ATCC, n° de cat. TIB-71), células RAW264 (ECACC n° de cat. . 85062803) y células RAW-D (Watanabe et al., J. Endocrinol., (2004) 180, 193-201); y células de cultivo primario de médula ósea murina. Las células cultivadas se pueden originar de especies de mamífero, incluyendo, preferentemente, entre otros, seres humanos, ratones u otros animales (p. ej., cobayas, ratas, pollos, conejos, cerdos, ovejas, vacas, monos etc.). Es más preferible que las células cultivadas sean células de mamífero que sobreexpresan DC-STAMP, tales como células RAW264.7, células RAW264 y células RAW-D, teniendo todas ellas el gen de DC-STAMP introducido junto
- 35 con una región promotora para sobreexpresar DC-STAMP.

- El procedimiento de detección selectiva divulgado en el presente documento también incluye un procedimiento de administrar una sustancia de ensayo a animales mamíferos individuales, en lugar de cultivar células con la sustancia de ensayo, extrayendo un órgano o tejido de los animales y detectando la expresión del gen de DC-STAMP en las
- 40 células del animal. El órgano o tejido en el que se ha de detectar la expresión del gen solo tiene que expresar DC-STAMP, pero preferentemente es un tejido que está desarrollando un trastorno óseo metabólico, más preferentemente médula ósea. Una especie de mamífero usada en el presente documento puede ser un animal no humano, preferentemente ratón, rata o cobaya, más preferentemente ratón o rata. Un modelo animal que tenga un trastorno óseo metabólico puede ser un animal al que se le ha extirpado un ovario, un animal al que se le ha extirpado un testículo, un animal portador de cáncer que tiene células tumorales implantadas en la hipodermis,
- 45 intradermis, ventrículo izquierdo, médula ósea, vena, peritoneo o en otro lugar, un animal al que se le ha extirpado el nervio ciático, un modelo animal de artritis adyuvante, un modelo animal de artritis inducida por colágeno, modelo animal de osteoporosis inducida por glucocorticoides, ratones con senescencia acelerada (ratones SAM P6, Matsushita et al., Am. J. Pathol. 125, 276-283 (1986)), animal al que se le ha extirpado la glándula tiroidea/paratiroides, un animal al que se le administra infusión continua de péptidos relacionados con la hormona paratiroidea (PTHrP), ratones defectivos que han perdido el factor inhibidor de osteoclastos (OCIF) (Mizuno et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1998) 247, 610-615) o similares. Adicionalmente, se puede usar un modelo animal que ha perdido los dientes por enfermedad periodontal o un animal creado para que sobreexpresen DC-
- 50 STAMP. Las sustancias de ensayo seleccionadas mediante detección selectiva se pueden administrar a los modelos animales descritos anteriormente para medir los parámetros que varían con el trastorno óseo metabólico, tal como el número de osteoclastos, la densidad ósea y la fuerza ósea en el tejido óseo o el nivel de Ca^{2+} y, de este modo, se evalúan sus efectos terapéuticos y/o preventivos sobre el trastorno óseo metabólico.
- 55

- Las células para cultivo usadas como se divulga en el presente documento se pueden cultivar en cualquier condición siempre que puedan expresar DC-STAMP además de RANKL y TNF- α en ausencia de una sustancia de ensayo. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en condiciones conocidas siempre que puedan expresar DC-STAMP. Los
- 60 animales usados para detectar la expresión de DC-STAMP en un órgano o tejido extraído de los mismos también se

pueden criar en cualquier condición en la que el órgano o tejido exprese DC-STAMP en ausencia de una sustancia de ensayo.

El efecto de una sustancia de ensayo sobre la expresión de DC-STAMP se puede estudiar midiendo el nivel de expresión del gen de DC-STAMP o midiendo el nivel de expresión de DC-STAMP que es el producto de la traducción del gen de DC-STAMP. Una sustancia de ensayo capaz de suprimir la expresión del gen de DC-STAMP y/o de DC-STAMP puede considerarse una sustancia que tiene un efecto terapéutico y/o preventivo sobre los trastornos óseos metabólicos, preferentemente osteoporosis, artritis reumatoide y/o hipercalcemia cancerosa,

La extracción del ARN total de las células cultivadas, la medición del nivel de expresión del gen de DC-STAMP o la medición del nivel de expresión de DC-STAMP se pueden llevar a cabo de acuerdo con un procedimiento descrito en la sección "2. Detección de trastornos óseos metabólicos". Al cultivar células de mamífero, opcionalmente se pueden añadir niveles adecuados de RANKL and TNF- α al medio con la sustancia de ensayo o incluso sin la sustancia en el caso de un cultivo control.

(1) Procedimientos que usan el gen de DC-STAMP

Este procedimiento de detección selectiva incluye procedimientos que usan células de mamífero cultivadas y los que usan sujetos mamíferos que se describirán más adelante, respectivamente.

(a) Procedimientos que usan células de mamífero cultivadas

(i) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (i-1) a (i-3):

- (i-1) extraer el ARN total de un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio que contiene una sustancia de ensayo;
- (i-2) detectar una diferencia en el nivel de expresión del gen de DC-STAMP entre el ARN total en la etapa (i-1) y el ARN total de un cultivo de células de mamífero cultivadas en ausencia de la sustancia de ensayo; y
- (i-3) analizar la diferencia en nivel de expresión del gen descrito en la etapa (i-2) para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(ii) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (ii-1) a (ii-4):

- (ii-1) extraer el ARN total de un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio que contiene una sustancia de ensayo;
- (ii-2) extraer el ARN total de un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio sin sustancia de ensayo;
- (ii-3) medir el nivel de expresión del gen de DC-STAMP en el ARN total de la etapa ii-1) y en el ARN total de la etapa ii-2), respectivamente; y
- (ii-4) analizar una diferencia en el nivel de expresión del gen medido de acuerdo con la etapa (ii-3) entre el ARN total en la etapa (ii-1) y el ARN total en la etapa (ii-2) para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(b) Procedimientos que usan sujetos mamíferos

(i) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (i-1) a (i-3):

- (i-1) extraer un ARN total de una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que se ha administrado una sustancia de ensayo;
- (i-2) medir una diferencia en el nivel de expresión del gen de DC-STAMP entre el ARN total en la etapa (i-1) y un ARN total de una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que no se le ha administrado una sustancia de ensayo; y
- (i-3) analizar la diferencia en nivel de expresión del gen descrito en la etapa (i-2) para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(ii) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (ii-1) a (ii-4):

- (ii-1) extraer un ARN total de una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que se ha administrado la sustancia de ensayo;
- (ii-2) extraer un ARN total de una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que no se le ha administrado la sustancia de ensayo;
- (ii-3) medir el nivel de expresión del gen de DC-STAMP en el ARN total de la etapa (ii-1) y en el ARN total de la etapa (ii-2), respectivamente; y
- (ii-4) analizar la diferencia en el nivel de expresión del gen descrito en la etapa (ii-3) para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo

metabólico.

(2) Procedimientos que usan DC-STAMP

Un procedimiento de detección selectiva basado en la medición del nivel de expresión de DC-STAMP incluye procedimientos que usan células de mamífero cultivadas y los que usan sujetos animales, que incluirán las etapas siguientes, respectivamente.

(a) Procedimientos que usan células de mamífero cultivadas

(i) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (i-1) y (i-2):

(i-1) medir el nivel de expresión de DC-STAMP en un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio que contiene una sustancia de ensayo; y

(i-2) analizar una diferencia en el nivel de expresión entre la proteína medida en la etapa (i-1) y la proteína en un cultivo de células de mamífero en un medio sin la sustancia de ensayo para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(ii) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (ii-1) a (ii-3):

(ii-1) medir el nivel de expresión de la proteína DC-STAMP en un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio que contiene una sustancia de ensayo;

(ii-2) medir el nivel de expresión de la proteína de acuerdo con la etapa (ii-1) en un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio sin la sustancia de ensayo; y

(ii-3) detectar una diferencia en el nivel de expresión entre la proteína medida en la etapa (ii-1) y la proteína medida en la etapa (ii-2) para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(iii) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (iii-1) a (iii-3):

(iii-1) inmovilizar la proteína total obtenida de un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio que contiene una sustancia de ensayo;

(iii-2) medir el nivel de expresión de la proteína DC-STAMP en la proteína inmovilizada; y

(iii-3) analizar una diferencia en el nivel de expresión entre DC-STAMP detectada en la etapa (iii-2) y la proteína en una proteína total tomada de un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio sin la sustancia de ensayo para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(iv) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (iv-1) a (iv-5):

(iv-1) inmovilizar la proteína total obtenida de un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio que contiene una sustancia de ensayo;

(iv-2) inmovilizar la proteína total obtenida de un cultivo de células de mamífero cultivadas en un medio sin la sustancia de ensayo;

(iv-3) medir el nivel de expresión de la proteína DC-STAMP en la proteína inmovilizada descrita en la etapa (iv-1) usando un anticuerpo o un ligando capaz de unirse específicamente a la proteína;

(iv-4) medir el nivel de expresión de DC-STAMP en la proteína inmovilizada descrita en la etapa (iv-2) usando un anticuerpo o un ligando capaz de unirse específicamente a la proteína;

(iv-5) analizar una diferencia en el nivel de expresión entre la proteína medida en la etapa (iv-3) y la proteína medida en la etapa (iv-4) para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(b) Procedimientos que usan sujetos mamíferos

(i) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (i-1) y (i-2):

(i-1) medir el nivel de expresión de la proteína DC-STAMP en una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que se ha administrado una sustancia de ensayo; y

(i-2) analizar una diferencia en el nivel de expresión entre la DC-STAMP medida en la etapa (i-1) y la proteína en una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que no se le ha administrado la sustancia de ensayo para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(ii) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (ii-1) a (ii-3):

(ii-1) medir el nivel de expresión de la proteína DC-STAMP en una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que se ha administrado una sustancia de ensayo, usando un anticuerpo o un ligando capaz de unirse específicamente a la proteína;

(ii-2) medir el nivel de expresión de la proteína en una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que no se le ha administrado una sustancia de ensayo; y
 (ii-3) analizar una diferencia en el nivel de expresión entre la proteína DC-STAMP medida en la etapa (ii-1) y la proteína medida en la etapa (ii-2) para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(iii) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (iii-1) a (iii-3):

(iii-1) inmovilizar la proteína total en una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que se ha administrado una sustancia de ensayo;
 (iii-2) medir el nivel de expresión de la proteína DC-STAMP en la proteína inmovilizada; y
 (iii-3) analizar una diferencia en el nivel de expresión entre la proteína DC-STAMP detectada en la etapa (iii-2) y la proteína en una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que no se le ha administrado la sustancia de ensayo para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(iv) Un procedimiento que comprende las siguientes etapas de (iv-1) a (iv-5):

(iv-1) inmovilizar la proteína total en una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que se ha administrado una sustancia de ensayo;
 (iv-2) inmovilizar la proteína total en una muestra de ensayo tomada de un sujeto mamífero al que no se le ha administrado la sustancia de ensayo;
 (iv-3) detectar el nivel de expresión de la proteína DC-STAMP en la proteína inmovilizada descrita en la etapa (iv-1) usando un anticuerpo o un ligando capaz de unirse específicamente a la proteína;
 (iv-4) detectar el nivel de expresión de la proteína DC-STAMP en la proteína inmovilizada descrita en la etapa (iv-2) usando un anticuerpo o un ligando capaz de unirse específicamente a la proteína; y
 (iv-5) analizar una diferencia en el nivel de expresión entre la proteína detectada en la etapa (iv-3) y la proteína detectada en la etapa (iv-4) para determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el tratamiento y/o la prevención de un trastorno óseo metabólico.

(3) Otros procedimientos

Se puede administrar una sustancia de ensayo a sujetos animales que sobreexpresan DC-STAMP para medir, en el tiempo, la incidencia de trastornos óseos metabólicos, la gravedad de los mismos y/o la tasa de supervivencia etc. para compararlos con los homólogos para animales que sobreexpresan DC-STAMP pero a los que no se ha administrado una sustancia de ensayo. Si los animales que sobreexpresan DC-STAMP y a los que se ha administrado la sustancia de ensayo tienen una incidencia significativamente menor, una gravedad significativamente menor y/o una tasa de supervivencia superior a aproximadamente un 10%, preferentemente aproximadamente un 30% o más y, más preferentemente aproximadamente un 50% o más, la sustancia de ensayo se puede seleccionar como compuesto eficaz para tratar y/o prevenir el trastorno óseo metabólico.

6. Producción de anticuerpos anti-DC-STAMP

(1) Preparación de antígenos

Un antígeno para la preparación de un anticuerpo anti-DC-STAMP puede ser DC-STAMP o un polipéptido que tenga una secuencia parcial de al menos 6 aminoácidos contiguos de los mismos o un derivado de los mismos que además tiene una secuencia de aminoácidos o un vehículo añadido.

La DC-STAMP usada en el presente documento se puede purificar directamente de células sanguíneas o de células de médula ósea o puede estar en forma de una fracción de membrana celular preparada a partir de las mismas. Asimismo, la DC-STAMP se puede sintetizar *in vitro* o producirse en células huésped mediante manipulación genética.

Los huéspedes procariotas para esta finalidad incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. La transformación de las células huésped con un gen diana requiere un vector plasmídico que contiene un replicón, es decir un origen de replicación de una especie compatible con el huésped, y un elemento regulador. Preferentemente, el vector tiene una secuencia que permite seleccionar al transformante mediante un rasgo de expresión (fenotipo).

Por ejemplo, a menudo se usa una cepa K12 o similar, como una cepa de *E. coli*, y generalmente se usa una línea pBR322 o pUC como vector. No obstante, la cepa bacteriana y el vector usados en el presente documento no se limitan a estos, sino que pueden incluir varias cepas y vectores conocidos.

El promotor de *E. coli* usado en el presente documento puede ser el promotor de triptófano (*trp*), el promotor de lactosa (*lac*), el promotor de triptófano-lactosa (*tac*), el triptófano de lipoproteína (*lpp*), el factor de elongación de la cadena polipeptídica Tu (*tufb*) o similares, y uno cualquiera de estos se puede usar para la producción de la proteína.

Un *B. subtilis* preferido es, por ejemplo, la cepa 207-25, un vector que se puede usar con ella es pTUB228 (Ohmura, K. y col., (1984) J. Biochem. 95, 87-93) o similares. Si un ADN que codifica el péptido señal de una α -amilasa de *B. subtilis* está unido al vector, la proteína se puede excretar fuera de las células.

5 Las células huéspedes eucariotas incluyen células de animales vertebrados, insectos, levaduras y etc., y las células de vertebrados usadas a menudo incluyen, entre otras, células RAW264.7 derivadas de monocitos murinos (ATCC, N° Cat. TIB-71), células RAW264 (ECACC, n° cat. 85062803), células RAW-D (Watanabe et al., J. Endocrinol., (2004) 180, 193-201); cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. and Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4126-4220) células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, 175-182; ATCC: CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (N° ATCC CRL-1658) y células de ovario de hámster chino (CHO cells; ATCC CCL-61); y similares.

10 Los promotores de expresión usados para células animales de vertebrados tienen un promotor localizado cadena arriba del gen que se va a expresar, uniones de corte y empalme para ARN, un sitio de poliadenilación, una secuencia de terminación de la transcripción etc., y, opcionalmente, un origen de replicación. Ejemplos del vector de expresión incluyen, entre otros, pCDNA3.1 (from Invitrogen) que tiene el promotor temprano de citomegalovirus y pSV2dhfr que tiene el promotor temprano de SV40 (Subramani, S. et al., Mol. Cell Biol., (1981) 1, 854-864).

15 Dadas las células COS o NIH3T3 como células huésped, por ejemplo, el vector de expresión usado en el presente documento tendrá el origen de replicación de SV40, la capacidad de autorreplicación en las células COS o NIH3T3 y, también un promotor de la transcripción, una señal de terminación de la transcripción y uniones de corte y empalme para ARN. El vector de expresión se puede incorporar en las células COS o NIH3T3 por medio del procedimiento de dietilaminoetil(DEAE)-dextrano (Luthman, H. and Magnusson, G., Nucleic Acids Res., (1983) 11, 1295-1308), coprecipitación en fosfato cálcico-ADN (Graham, F. L. and van der Eb, A. J., Virology, (1973) 52, 456-457) y electroporación por pulsos (Neumann, E. et al., EMBO J., (1982) 1,841-845) o similares para crear las células transformadas deseadas. Si se usan células CHO como células huéspedes, se pueden cotransfectar, junto con el vector de expresión, con un vector que puede expresar el gen neo para funcionar como marcador de resistencia a antibiótico G418, tal como pRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) o pSV2neo (Southern, P. J. and Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., (1982) 1, 327-341) y, después, se somete a detección selectiva para seleccionar colonias resistentes a G418 para obtener células transformadas capaces de producir de forma estable un polipéptido deseado.

20 El transformante resultante se puede cultivar de acuerdo con un procedimiento estándar para producir de este modo el polipéptido deseado dentro de las células, sobre la membrana celular o excretarse fuera de las células. El medio usado para el cultivo se puede seleccionar de forma adecuada de diferentes medios de uso habitual para las células huésped usadas y, por ejemplo, en el caso de las células COS, medio RPMI1640 o medio Eagle modificado de Dulbecco (denominado en lo sucesivo en el presente documento "DMEM"), que opcionalmente se puede suplementar con un componente sérico como suero bovino fetal.

25 La proteína recombinante producida dentro de las células transformantes, sobre la membrana celular de las mismas o excretada fuera de las células se puede aislar y purificar mediante varias técnicas de separación conocidas que aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de la proteína. Específicamente, estas técnicas pueden incluir, por ejemplo, tratamiento proteico convencional con un precipitante, ultrafiltración, varios tipos de cromatografía líquida tal como cromatografía en tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), diálisis y combinaciones de los mismos. Adicionalmente, la fusión de la proteína recombinante expresada con 6 residuos de histidina permite una purificación eficiente de la misma sobre una columna de afinidad de níquel. Se puede producir fácilmente una gran cantidad del polipéptido deseado con un rendimiento elevado y con una pureza elevada mediante una combinación de estas técnicas. Si la proteína se produce sobre la membrana celular, se puede separar y purificar en bruto mediante preparación de una fracción de membrana celular.

(2) Producción de anticuerpos monoclonales anti-DC-STAMP

Los anticuerpos capaces de unirse específicamente a DC-STAMP incluye anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a DC-STAMP, que se obtienen como se describe más adelante.

La producción de un anticuerpo monoclonal generalmente requiere la siguientes etapas de:

- 50 (a) purificación de un biopolímero para usar como antígeno.
 (b) inmunización de un animal mediante inyección del antígeno, la posterior obtención de muestras de sangre para analizar su título de anticuerpos y establecer el momento de la extracción del bazo y la preparación de las células formadoras de anticuerpos;
 (c) preparación de células de mieloma (en lo sucesivo en el presente documento denominadas "mieloma");
 55 (d) fusión celular entre las células formadoras de anticuerpos y el mieloma;
 (e) detección selectiva de un grupo de hibridomas productores del anticuerpo de interés;
 (f) división en un solo clon celular;
 (g) cultivo del hibridoma o crianza de un animal al que se le ha implantado el hibridoma, opcionalmente, con el

fin de la producción a escala de un anticuerpo monoclonal; y

(h) examen del anticuerpo monoclonal producido de este modo para la bioactividad y, por tanto especificidad, o análisis del mismo según sus propiedades como reactivo marcado y similares.

5 El procedimiento de preparación del anticuerpo monoclonal se describirá más adelante en detalle siguiendo las etapas anteriores, pero puede comprender una versión modificada, no estando limitada a la descripción dada. Por ejemplo, con el mieloma se pueden usar células formadoras de anticuerpos aparte de las células de bazo.

(a) Purificación de un antígeno

10 El antígeno puede ser una DC-STAMP preparada como se ha descrito anteriormente, o un fragmento de la misma. También puede ser una fracción de membrana celular preparada a partir de células somáticas recombinantes que expresan DC-STAMP o células somáticas recombinantes que expresan DC-STAMP, o un péptido parcial de la proteína de la invención sintetizada químicamente mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica.

(b) Preparación de células formadoras de anticuerpos

15 El antígeno proporcionado en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o alúmina potásica, y después se usa como inmunógeno para inmunizar un animal experimental. Cualquier animal que se sabe que se usa para crear un hibridoma idóneamente se puede usar como animal experimental. Específicamente, el animal puede ser un ratón, rata, cabra, oveja, vaca, caballo o similar. No obstante, se prefiere un ratón o una rata como animal para inmunización, por motivos tales como la mayor disponibilidad de células de mieloma para condensarse con células formadoras de anticuerpos extraídas de dichos animales. La
20 elección de una línea de ratón o de rata usada realmente no está particularmente limitada, las líneas de ratón incluyen A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BR, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, y 129, mientras que las líneas de rata incluyen Low, Lewis, Sprague, Daweley, ACI, BN y Fischer. Estos ratones y ratas están disponibles comercialmente en criadores/distribuidores de animales experimentales, por ejemplo CLEA Japan, Inc., Charles River Laboratories Japan, Inc., Japan SLC, Inc., or The Jackson Laboratories.
25 Líneas particularmente preferidas de animales para inmunización son el ratón BALB/c o la rata Low, teniendo en cuenta que son adecuadas para fusión con células de mieloma, como se describe más adelante. Asimismo, se prefieren los ratones que tienen una biofunción menor para eliminar autoanticuerpos, es decir ratones afectados por una enfermedad autoinmunitaria, teniendo en cuenta la homología antigénica entre seres humanos y ratones. Los ratones o ratas tienen, preferentemente, de 5 a 12 semanas de edad, más preferentemente de 6 a 8 semanas de
30 edad en el momento de la inmunización.

El animal se puede inmunizar con DC-STAMP o una versión recombinante de la misma mediante cualquier procedimiento conocido descrito con detalle en, por ejemplo, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental
35 Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964); y así sucesivamente. Un procedimiento de inmunización adecuado usado en la presente invención se ejemplifica más adelante. En primer lugar, una fracción de membrana celular como antígeno, o células que expresan el antígeno, se administra al animal por vía intradérmica o intraperitoneal. No obstante, preferentemente, se puede conseguir un nivel de inmunidad mayor mediante una combinación de ambas vías de dosificación. Específicamente, la dosificación intradérmica en las primeras etapas y la dosificación intraperitoneal en las últimas etapas, o solo como última dosis, son especialmente
40 eficaces para conseguir un nivel de inmunidad mayor. El programa de dosificación del antígeno puede variar en función de las diferentes especies de animales que se van a inmunizar, diferentes animales individuales y similares, pero se puede establecer, preferentemente, de 3 a 6 dosis de antígeno a un intervalo entre dosis de 2 a 6 semanas, más preferentemente de 3 a 4 dosis a un intervalo entre dosis de 2 a 4 semanas. Si el número de dosis es demasiado alto, el antígeno se desperdiciará y si el intervalo entre dosis es demasiado largo, el animal envejecerá y tendrá una actividad celular menor, ninguna de estas situaciones es preferible. El nivel de dosis de antígeno puede
45 variar en función de las diferentes especies de animales, diferentes animales individuales y similares, pero en general puede ser de 0,05 a 5 ml, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml. Se puede administrar un refuerzo de 1 a 6 semanas después de la dosificación de antígeno anterior, preferentemente de 2 a 4 semanas después y, más preferentemente, de 2 a 3 semanas después. Si el refuerzo se administra tras 6 semanas
50 o antes de 1 semana, su efecto será escaso. La dosis de refuerzo del antígeno puede variar en función de las diferentes especies de animales, diferentes animales individuales y similares, pero, en ratones, por ejemplo, puede ser, en general, de 0,05 a 5 ml, preferentemente de 0,1 a 0,5 ml y, más preferentemente, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 ml. Una dosis innecesariamente alta no solo disminuirá el efecto inmunitario sino que también será dañina para el animal inmunizado.

55 Los esplenocitos o los linfocitos que incluye células formadoras de anticuerpos se extraen asépticamente del animal inmunizado de 1 a 10 días después del refuerzo, preferentemente de 2 a 5 días y, más preferentemente, de 2 a 3 días. En este punto, si se analizan muestras de sujetos animales seleccionados para determinar el título de anticuerpos para seleccionar un animal individual con un título de anticuerpos potenciados adecuadamente como suministrador de las células formadoras de anticuerpos, el siguiente procedimiento se puede llevar a cabo con más
60 eficiencia.

El procedimiento de analizar los títulos de anticuerpos usados en el presente documento incluye varias técnicas conocidas tales como RIA, ELISA, anticuerpos fluorescentes y técnicas de hemaglutinación pasiva. Las técnicas de RIA o ELISA son más preferibles en términos de sensibilidad de la detección, rapidez, exactitud, capacidad de realizar operaciones automáticas y similares.

- 5 El ensayo de los títulos de anticuerpos, por ejemplo mediante ELISA, se puede realizar según un procedimiento como se describe más adelante. En primer lugar, un antígeno puro o parcialmente puro se adsorbe en una superficie sólida, tal como una placa de 96 pocillos para ELIS; la porción expuesta restante de la superficie sólida se bloquea después con una proteína, por ejemplo seroalbúmina bovina (en lo sucesivo en el presente documento denominada "BSA"), que no está relacionada con el antígeno; se enjuaga la superficie sólida y se pone en contacto con muestras diluidas en serie de un primer anticuerpo (por ejemplo, suero murino) para unir el anticuerpo monoclonal en las muestras al antígeno. En segundo lugar, un anticuerpo marcado con enzima como segundo anticuerpo contra el anticuerpo murino mencionado anteriormente se añade para unir el anticuerpo murino; se enjuaga la superficie sólida; se añade un sustrato para la enzima para producir un cambio de color debido a la descomposición del sustrato; se determina un cambio de la densidad óptica causada por el cambio de color y se calcula el título de anticuerpos a partir del cambio de la densidad óptica.

El aislamiento de las células formadoras de anticuerpos de esplenocitos y linfocitos se puede llevar a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido (por ejemplo, Kohler et al., Nature, (1975) 256, 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol., (1977) 6, 511, ; Milstein et al., Nature, (1977) 266, 550; Walsh, Nature, (1977) 266, 495). Por ejemplo, en cuanto a los esplenocitos, se puede usar un procedimiento general en el que se rompen las células, se filtran a través de una malla inoxidable y se suspenden en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) para aislar las células formadoras de anticuerpos.

(c) Preparación de células de mieloma (en lo sucesivo en el presente documento denominadas "mieloma")

La elección de las células de mieloma para uso en la fusión de células no está particularmente limitada, pero puede seleccionarse adecuadamente de entre las cepas de células conocidas. No obstante, por comodidad en la selección del hibridoma de células fusionadas, es preferible usar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa) para la cual se establece un procedimiento de selección. Las cepas deficientes en HGPRT incluyen X63-Ag8(X63), NS1-Ag4/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, BU.1 derivadas de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) derivadas de ratas; y U266AR(SKO-007), GM1500.GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) and 8226AR/NIP4-1(NP41) derivadas de seres humanos. Estas cepas se pueden obtener de, por ejemplo, la Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC) y similares.

La cepa de células se subcultiva en un medio adecuado, por ejemplo un medio de 8-azaguanina (un medio preparado mediante la adición de glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina y suero bovino fetal, en lo sucesivo en el presente documento denominado "FCS", en medio RPMI-1640, para preparar un medio intermedio en el que después se añade 8-azaguanina), medio modificado de Dulbecco de Iscove (en lo sucesivo en el presente documento denominado "IMDM") o medio Eagle modificado de Dulbecco (en lo sucesivo en el presente documento denominado "DMEM"), y después se subcultiva en un medio normal (por ejemplo, medio ASF104 que contiene 10% de FCS de Ajinomoto Co., Inc.) durante 3 a 4 días antes de la fusión celular, para obtener un recuento celular de al menos 2×10^7 el día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

La fusión entre las células formadoras de anticuerpos y las células de mieloma se puede llevar a cabo en condiciones tales que mantienen las células por encima de una tasa de supervivencia extremadamente bajo de acuerdo con un procedimiento conocido (Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. ILL., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964); y otros). Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, un procedimiento químico de fusión mezclando las células formadoras de anticuerpos y las células de mieloma en una solución altamente concentrada de un polímero, tal como polietilenglicol, y un procedimiento físico de fusión por medio de estimulación eléctrica. Un ejemplo específico del procedimiento químico se describe a continuación. Si se usa polietilenglicol en la solución de polímero altamente concentrada, puede tener un peso molecular de 1.500-6.000, preferentemente 2.000-4.000. En una solución de este polímero, las células formadoras de anticuerpo y las células de mieloma pueden mezclarse a una temperatura de 30 a 40° C, preferentemente de 35 a 38° C, durante de 1 a 10 minutos, preferentemente de 5 a 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

Los procedimientos de seleccionar hibridomas producidos mediante la fusión celular no están particularmente limitados, pero normalmente se usa selección con HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) (Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975); Milstein et al., Nature 266, 550 (1977)) Este procedimiento es eficaz para obtener hibridomas de una cepa deficiente en HGPRT de células de mieloma incapaces de sobrevivir en presencia de aminopterina. Por tanto, las células no fusionadas y los hibridomas se cultivan en medio HAT para permitir que solo los hibridomas

resistentes a aminopterina sobrevivan y crezcan de forma selectiva.

(f) División en un solo clon celular (clonación)

Los procedimientos de clonación de un hibridoma incluyen procedimientos conocidos, tales como la técnica de metilcelulosa, la técnica de agarosa blanda y dilución límite (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). El procedimiento de clonación incluye la dilución límite, en la que se cultiva una dilución realizada de modo que contenga células de hibridoma en un pocillo de una placa de múltiples pocillos, la técnica del agar blando en la que las células se cultivan en un medio de agar blando para recolectar las colonias resultantes; una técnica en la que las células únicas se retiran de forma individual usando un micromanipulador y después se cultiva cada una; y "clonación por clasificación" en la que células únicas se separan usando un separador de células- De estas técnicas, la dilución límite es particularmente adecuada. En esta técnica, primero se siembra un alimentador en la microplaca, el alimentador puede ser una cepa de fibroblastos derivada de feto de rata o células de bazo, células de timo o células ascíticas, todas de ratones normales. Una dilución de las células de hibridoma a de 0,2 a 0,5 células/0,2 ml del medio se prepara con antelación. Esta dilución de las células de hibridoma suspendidas se coloca en cada pocillo a 0,1 ml/pocillo y se cultiva durante aproximadamente dos semanas, mientras que aproximadamente un tercio del volumen del medio se sustituye con medio fresco después de intervalos de tiempo concretos (por ejemplo, cada tres días), para permitir el crecimiento del clon de hibridoma.

En los pocillos en los que hay un título detectable de anticuerpos, el hibridoma se clona repetidamente de dos a cuatro veces, por ejemplo mediante dilución límite y si el hibridoma en un pocillo tiene un título de anticuerpos estable y detectable, se selecciona como cepa de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP.

(g) Cultivo del hibridoma para preparar un anticuerpo monoclonal

El hibridoma seleccionado de este modo se puede cultivar para proporcionar un anticuerpo monoclonal de un modo eficiente. No obstante, es deseable realizar la detección selectiva del hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales de interés antes del cultivo. La detección selectiva se puede realizar mediante un procedimiento de detección selectiva conocido.

El ensayo de los títulos de anticuerpos, por ejemplo mediante ELISA, se puede realizar según un procedimiento como se describe más adelante. En primer lugar, la DC-STAMP pura o parcialmente pura, o células que expresan DC-STAMP, se adsorben en una superficie sólida, tal como una placa de 96 pocillos para ELIS; la porción expuesta restante de la superficie sólida se bloquea después con una proteína, por ejemplo seroalbúmina bovina (en lo sucesivo en el presente documento denominada "BSA"), que no está relacionada con el antígeno; se enjuaga la superficie sólida y se pone en contacto con muestras diluidas en serie de un primer anticuerpo (por ejemplo, un sobrenadante del cultivo de hibridoma) para unir el anticuerpo anti-DC-STAMP en las muestras al antígeno. En segundo lugar, un anticuerpo marcado con enzima como segundo anticuerpo contra el anticuerpo murino se añade para unir el anticuerpo murino; se enjuaga la superficie sólida; se añade un sustrato para la enzima para producir un cambio de color debido a la descomposición del sustrato; se determina un cambio de la densidad óptica causada por el cambio de color y se calcula el título de anticuerpos a partir del cambio de la densidad óptica. Esta detección selectiva se puede realizar después o antes de la clonación descrita anteriormente del hibridoma.

El hibridoma obtenida siguiendo el procedimiento anterior se puede almacenar en un estado congelado en nitrógeno líquido o en ultracongelación a una temperatura por debajo de -80°C.

El hibridoma clonado se transfiere del medio HT a un medio normal para cultivar. Se cultiva a gran escala mediante cultivo rotatorio en un frasco de cultivo grande o mediante cultivo rotatorio. El sobrenadante del cultivo a gran escala se somete a un tratamiento de purificación conocido por los expertos en la técnica, tal como filtración en gel, para obtener anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a la proteína diana. Además, el hibridoma se puede inyectar en el peritoneo de la misma línea de ratones (por ejemplo, BALB/c como se ha descrito anteriormente) o de ratones Nu/Nu y se cultivan para producir una ascitis que contiene una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de una realización de la invención. Se puede administrar un aceite mineral tal como 2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano (pristano) de 3 a 7 días antes de la inyección intraperitoneal para producir una cantidad mayor de ascitis. Por ejemplo, con antelación se puede inyectar un inmunosupresor en el peritoneo de la misma línea de ratones que el hibridoma para inactivar las células T y 20 días después se puede administrar una suspensión de 10^6 - 10^7 células del hibridoma clonado en medio sin suero (0,5 ml) en el peritoneo para dejar que el abdomen normalmente se hinche y acumule ascitis y las ascitis se pueden extraer del ratón. Este procedimiento puede proporcionar el anticuerpo monoclonal a una concentración aproximadamente 10 veces mayor que la conseguida en cultivo.

El anticuerpo monoclonal proporcionado por uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente se puede purificar de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos descritos en Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978). Los procedimientos incluyen desalado usando sulfato amónico, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. Uno de

los procedimientos, el desalado usando sulfato amónico, se puede repetir de 3 a 4 veces, preferentemente de 3 a 6 veces, para purificar el anticuerpo monoclonal. No obstante, este procedimiento proporciona un rendimiento muy bajo del anticuerpo monoclonal purificado. Por tanto, el anticuerpo monoclonal se puede purificar primero en bruto mediante desalado usando sulfato amónico una o dos veces y tratarse después con al menos un procedimiento, preferentemente dos procedimientos, seleccionados de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad etc., para proporcionar el anticuerpo monoclonal a una pureza elevada en un alto rendimiento. Una combinación de desalado usando sulfato amónico con otro procedimiento y su orden se puede ilustrar mediante: (i) desalado usando sulfato amónico - cromatografía de intercambio iónico - filtración en gel, (ii) desalado usando sulfato amónico - cromatografía de intercambio iónico - cromatografía de afinidad, (iii) desalado usando sulfato amónico - filtración en gel - cromatografía de afinidad y similares, pero la combinación (iii) es la más preferible para proporcionar el anticuerpo monoclonal a una pureza elevada en un alto rendimiento.

Para purificar fácilmente el anticuerpo monoclonal también se dispone de un kit de purificación de anticuerpo monoclonal comercial (por ejemplo, el kit MabTrap GII de Amersham Pharmacia Biotech).

El anticuerpo monoclonal resultante tiene una elevada especificidad antigénica por DC-STAMP.

15 (h) Ensayo del anticuerpo monoclonal

El isotipo y la subclase del anticuerpo monoclonal resultante se pueden determinar como se ha descrito más adelante. Estos se pueden identificar mediante las técnicas Ouchterlony, ELISA o RIA. La técnica de Ouchterlony es simple, pero si la muestra de anticuerpo monoclonal está en una concentración baja, debe concentrarse para el ensayo. Por otro lado, la técnica de ELISA o RIA, el sobrenadante del cultivo sin tratar se puede hacer reaccionar con un antígeno adsorbido sobre fase sólida, que después se puede tratar con un anticuerpo secundario correspondiente a un isotipo o subclase individual de inmunoglobulina para identificar el isotipo o la subclase del anticuerpo monoclonal. También se puede realizar un ensayo más simple usando un kit de identificación comercial (por ejemplo, el kit Mouse Typer de Bio-Rad Laboratories Inc.).

Además, la proteína de anticuerpo se puede cuantificar mediante ensayo de Folin-Lowry o mediante el cálculo de la densidad óptica a 280 nm (1,4 de DO_{280} es equivalente a la inmunoglobulina a 1 mg/ml).

25 (3) Creación de un anticuerpo anti-DC-STAMP humanizado

La inmunoglobulina G (simplemente denominada "IgG" en lo sucesivo en el presente documento) está compuesta por dos cadenas polipeptídicas ligeras (en lo sucesivo en el presente documento denominadas "cadenas ligeras") con un peso molecular de aproximadamente 23.000 y dos cadenas polipeptídicas pesadas (en lo sucesivo en el presente documento denominadas "cadenas pesadas") con un peso molecular de aproximadamente 50.000. Tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas tienen una estructura consistente en dominios repetidos que tienen una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 110 residuos conservados, en los que los dominios son unidades básicas (en lo sucesivo en el presente documento denominados "dominios") que forman una estructura tridimensional de la IgG. Las cadenas pesadas y ligeras están compuestas por cuatro y dos dominios contiguos, respectivamente. Tanto en las cadenas pesadas como en las ligeras, el dominio amino terminal tiene una secuencia de aminoácidos que es más variable entre diferentes moléculas de anticuerpo que en los demás dominios, y, por tanto, se denomina dominio variable (en lo sucesivo en el presente documento denominado "dominio V"). En el amino terminal de IgG, ambos dominios V de las cadenas pesadas y ligeras están asociados de forma complementaria para formar una región variable. Los otros dominios forman la región constante como un todo. La región constante tiene una secuencia característica de una especie animal individual. Por ejemplo, la región constante de la IgG murina es diferente de la de la IgG humana y, por tanto, la IgG murina es reconocida como extraña por el sistema inmunológico humano que induce una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (en lo sucesivo en el presente documento denominada "HAMA") (Schloff et al., Cancer Res., (1985) 45, 879-85). En consecuencia, un anticuerpo murino se no puede dar de nuevo a dicho ser humano. Para administrar dicho anticuerpo a un ser humano debe modificarse de modo que no induzca una respuesta HAMA, al tiempo que mantenga la especificidad del anticuerpo.

Los resultados de los análisis cristalográficos de rayos x revelan que dicho dominio generalmente toma una estructura cilíndrica alargada que tiene láminas β antiparalelas y bicapa, cada una compuesta por de tres a cinco cadenas β . En la región variable, los dominios V de las cadenas pesadas y ligeras tienen tres bucles en racimo, respectivamente, para formar un sitio de unión al antígeno. Cada bucle se denomina región determinante de la complementariedad (en lo sucesivo en el presente documento denominada "CDR") que es la región más variable en la secuencia de aminoácidos. La porción de la región variable fuera de las CDR generalmente sirve para mantener la estructura de las CDR y, por tanto, se denomina el "armazón". Kabatt *et al.* Recogieron una gran cantidad de datos sobre las secuencias primarias en la región variable de las cadenas pesadas y ligeras e hicieron una lista para dividir las respectivas secuencias primarias en CDR y armazón en función de cómo se conservan (Sequences Of Immunological Interest, 5ª edición, NIH publication, N° 91-3242, E. A. Kabatt *et al.*). Los armazones también se dividieron en subgrupos que tienen características comunes en la secuencia de aminoácidos, respectivamente. Además, se identificaron los correspondientes armazones entre seres humanos y ratones.

Algunos procedimientos de creación de un anticuerpo humanizado se han ideado como se describe más adelante según estos estudios sobre las características estructurales de IgG.

5 En una etapa temprana del estudio se propuso un anticuerpos quimérico en el que una región variable de una anticuerpo murino estaba unido a una región constante de un anticuerpo humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984)). No obstante, dicho anticuerpo quimérico todavía tiene muchos residuos de aminoácidos no humanos y, por tanto, la respuesta se puede inducir si el anticuerpo se administra a un ser humano durante un largo periodo de tiempo (Begent et al., Br. J. Cancer, (1990) 62, 48 7).

10 Con el fin de disminuir más el número de residuos de aminoácidos de mamífero no humano que pueden inducir la respuesta HAMA, se propuso un procedimiento para integrar únicamente la porción CDR de mamífero en un anticuerpo humano (véase Nature, 321, 522-525, (1986)), pero, en general, se ha encontrado que el injerto de solo CDR es inadecuado para mantener la actividad de la inmunoglobulina contra el antígeno.

En 1987, Chothia *et al.* encontraron, a partir de los datos del análisis cristalográfico de rayos X, que:

- 15 (a) la secuencia de aminoácidos de una CDR comprende un sitio para su unión directa del antígeno y un sitio para mantener la estructura de la CDR y las posibles estructuras tridimensionales tomadas mediante CDR se clasifican en una pluralidad de patrones típicos (estructuras canónicas); y
 (b) la clase de una estructura canónica viene determinada por la propia CDR, así como por el tipo de aminoácido localizado en una posición específica en la porción armazón (J. Mol. Biol., (1987) 196, 901-917).

20 En base a los hallazgos, se sugirió que el injerto de CDR en un anticuerpo humano puede requerir la secuencia de la CDR y los residuos de aminoácidos del armazón (véase la Publicación Nacional de la solicitud de patente internacional n° 1992-502408).

En general, un anticuerpo de mamífero no humano que tiene CDR para injertar se define como "donante", mientras que un anticuerpo humano que va a recibir el injerto con las CDR se define como "aceptor", y estas definiciones también se usarán en el presente documento.

25 Al llevar a cabo el injerto de CDR, la estructura de las CDR debe conservarse lo máximo posible para mantener la actividad de las moléculas de inmunoglobulina. Para conseguir este propósito, se deben considerar los siguientes dos puntos:

- (a) a qué subgrupo pertenece el aceptor que a seleccionar, y
 (b) ¿qué residuo de aminoácido se debe eliminar del armazón del donante?

30 Queen *et al.*, presentaron un procedimiento diseñado mediante el cual un residuo de aminoácido en el armazón del donante deberá injertarse en el aceptor junto con las secuencias de CDR y el residuo de aminoácido satisface al menos uno de los criterios siguientes (véase la Publicación Nacional de la solicitud de patente internacional n° 1992-502408):

- 35 (a) un aminoácido en el armazón del aceptor rara vez se ve en la posición y el correspondiente aminoácido en el donante se suele ver en la misma posición en el aceptor;
 (b) el aminoácido está muy cerca a uno de las CDR;
 (c) se espera que el aminoácido tenga un átomo de cadena lateral aproximadamente a 3Å o menos de la CDR en el modelo de inmunoglobulina tridimensional y cabe esperar que sea capaz de interactuar con el antígeno o la CDR en el anticuerpo humanizado que se va a crear.

40 El ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP de acuerdo con realizaciones de la presente invención se puede obtener preparando ARNm de las células de hibridoma productivas del anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP, convirtiendo el ARNm en ADNc con una transcriptasa inversa y aislando el ADN que codifica cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo.

45 El ARNm se puede extraer mediante tiocianato de guanidina-fenol caliente, tiocianato de guanidina-clorhidrato de guanidina o similares, pero, preferentemente tiocianato de guanidina-cloruro de cesio. El ARNm de las células se puede preparar preparando primero ARN total y purificándolo después a partir del ARN total usando un vehículo para purificación de ARN poli(A)⁺, tal como esferas de oligo(dT) celulosa o de oligo(dT) látex, o purificándolo directamente del lisado celular usando el vehículo. El ARN total se puede preparar mediante técnicas tales como centrifugación por gradiente de densidades con sacarosa alcalina (Dougherty, W. G. and Hiebert, E., Virology, (1980) 101, 466-474), tiocianato de guanidina-fenol, tiocianato de guanidina-trifluoro de cesio y fenol-SDS, pero,
 50 preferentemente, mediante la técnica usando tiocianato de guanidina y cloruro de cesio (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299).

55 Usando el ARN poli(A)⁺ resultante como molde se puede sintetizar un ADNc monocatenario mediante transcripción inversa enzimática y, después, se puede sintetizar un ADNc bicatenario a partir del ADNc monocatenario. El procedimiento de sintetizar el ADNc bicatenario puede incluir un procedimiento con la nucleasa S1 (Efstratiadis, A., et al., Cell, (1976) 7, 279-288), Gubler-Hoffman process (Gubler, U. and Hoffman, B. J., Gene, (1983) 25, 263-269),

y el proceso de Okayama-Berg (Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., (1982) 2, 161-170), pero, preferentemente se usa la reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo en el presente documento denominada "PCR") usando ADNc monocatenario como molde, el procedimiento denominado RT-PCR (Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, 487-49)

- 5 El ADNc bicatenario producido de este modo se puede integrar en un vector de clonación para producir un vector recombinante que después se puede introducir en un microbio tal como *E. coli* para transformarlo y el transformante se puede seleccionar usando resistencia a tetraciclina, resistencia a ampicilina o similares como marcador. *E. coli* se puede transformar mediante el procedimiento De Hanahan (Hanahan, D., J. Mol. Biol., (1983) 166, 557-580), es decir mediante la adición del vector de ADN recombinante a las células competentes, que se preparan a partir de
- 10 *E. coli* en presencia de cloruro cálcico, cloruro de magnesio o cloruro de rubidio. Si el plásmido es un vector, es necesario que tenga un gen de resistencia a un fármaco. Además, se pueden usar vectores de clonación que no son plásmidos, por ejemplo el fago λ o similares.

- Se pueden usar diferentes procedimientos como se describen más adelante para, por ejemplo, seleccionar una cepa que tenga ADNc que codifica cada subunidad del anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP de interés del
- 15 transformante obtenido como se ha descrito anteriormente. Si el ADNc de interés se ha amplificado específicamente mediante el procedimiento de RT-PCR anterior, dicho procedimiento del método se puede omitir.

(3-1) El procedimiento usando la reacción en cadena de la polimerasa

- Si se conoce la totalidad secuencia de aminoácidos de la proteína de interés o una parte de la misma, se pueden sintetizar los cebadores oligonucleotídicos que tienen una hebra sentido y una hebra antisentido, respectivamente,
- 20 correspondiente a una parte de la secuencia de aminoácidos, y, después, se pueden usar juntos para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, 487-49) para amplificar un fragmento de ADN que codifica la subunidad de la cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-DC-STAMP de interés. El ADN molde usado en el presente documento puede ser, por ejemplo, ADNc sintetizado mediante transcripción inversa enzimática del ARN, de un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP.

- 25 El fragmento de ADN resultante se puede integrar directamente en un vector plasmídico usando un kit comercialmente disponible o similar o se puede marcar con ^{32}P , ^{35}S , o biotina o similar, y usarse como sonda en la hibridación de colonias o hibridación de placas para seleccionar un clon diana.

- La secuencia parcial de aminoácidos de cada subunidad en el anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se puede examinar aislando la subunidad mediante un procedimiento conocido tal como electroforesis o cromatografía en columna y analizando la secuencia de aminoácidos en N-terminal de la subunidad con un secuenciador automático de proteínas (por ejemplo, PPSQ-10 fabricado por Shimadzu Corporation) o similares.
- 30

- Un ADNc que codifica cada subunidad en la proteína anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP de la cepa transformante de interés obtenida de este modo se puede recoger según un procedimiento conocido (Maniatis, T., et al. (1982) en "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.). El procedimiento se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, separación de una fracción correspondiente al ADN del vector de las células y cortando la región de ADN que codifica la subunidad de interés del ADN plasmídico.
- 35

(3-2) Procedimiento de detección selectiva usando sondas oligonucleotídicas sintéticas

- Si se conoce la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés o una parte de la misma (la secuencia parcial puede ser para cualquier región de la proteína si es una secuencia específica que tiene múltiples aminoácidos contiguos), se puede sintetizar un oligonucleótido correspondiente a la secuencia de aminoácidos (el oligonucleótido puede tener una secuencia de nucleótidos prevista haciendo referencia a la frecuencia de uso de los codones o incluir múltiples secuencias de nucleótidos compuestas por varias posibles secuencias de nucleótidos en combinación, en este último caso, se necesitan menos secuencias de nucleótidos si se incorpora inosina) y se hibridan como una sonda (marcada ^{32}P , ^{31}S , o biotina o similar) en un filtro de nicrocelulosa sobre el cual se ha inmovilizado el ADN de la cepa transformante mediante desnaturalización para la detección selectiva de las cepas positivas resultantes.
- 40
- 45

- Las secuencia del ADN obtenida de este modo se puede determinar mediante, por ejemplo, modificación química de Maxam-Gilbert (Maxam, A. M. and Gilbert, W., Methods in Enzymology, (1980) 65, 499-576), terminación de cadena con dideoxinucleótido (Messing, J. and Vieira, J., Gene (1982)19, 269-276) o similares.
- 50

Recientemente, también se han usado ampliamente sistemas de determinación de la secuencia de nucleótidos usando pigmentos fluorescentes (por ejemplo, los secuenciadores de ADN Sequence Robot "CATALYST 800" y Model 373A, ambos fabricados por Perkin Elmer Japan Co., Ltd.)

- La secuencia de nucleótidos de ADN se puede determinar en un procedimiento seguro y eficiente usando dicho sistema. La secuencia de nucleótidos de un ADN, que se determina como se ha descrito anteriormente, y los datos concernientes a las secuencias de aminoácidos en N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras se pueden usar
- 55

para determinar la totalidad de la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras en un anticuerpo monoclonal de una realización de la invención.

5 Las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina constan de una región variable y una región constante, y la región variable consiste además en regiones determinantes de la complementariedad (en lo sucesivo en el presente documento denominadas "CDR", tres regiones cada una de ellas para las cadenas pesadas y ligeras) y regiones armazón (cuatro regiones cada una de ellas para las cadenas pesadas y ligeras) adyacentes.

De estas regiones, la región constante tiene una secuencia de aminoácidos independiente del tipo de antígeno y común a los anticuerpos que pertenecen a la misma subclase de inmunoglobulina. En contraste con ello, la región variable, especialmente en las CDR, tiene una secuencia de aminoácidos única para cada tipo de antígeno, pero un estudio comparativo de los datos sobre secuencias de aminoácidos de muchos anticuerpos diferentes ha revelado que tanto la posición de las CDR como la longitud de la secuencia del armazón son muy similares en las subunidades de diferentes anticuerpos que pertenecen al mismo subgrupo (Kabat, E. A. et al., in "Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol. II": Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., (1991)). Por tanto, si las respectivas secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras, por ejemplo, en el anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP, se comparan con los datos para las correspondientes secuencias de aminoácidos conocidas se pueden localizar las CDR y los armazones, además de la región constante en las respectivas secuencias de aminoácidos. En este contexto, se sabe que FRH₁, la región armazón más cercana al extremo N de la cadena pesada, tiene una longitud de secuencia que puede ser más corta que la longitud habitual (30 aminoácidos), por ejemplo, puede ser tan corto como de 18 aminoácidos (Kabat *et al.* descrito anteriormente). De acuerdo con esto, en el anticuerpo de la presente invención, siempre que se conserve la función como anticuerpos anti-DC-STAMP, la región armazón más cercana al extremo N de la cadena pesada puede tener una longitud de secuencia de 18 aminoácidos a 30 aminoácidos, preferentemente de 30 aminoácidos.

Además, un péptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la CDR en las cadenas pesadas o ligeras, que se determina como se ha descrito anteriormente, o que tiene una secuencia de aminoácidos parcial con aminoácidos contiguos se puede modificar artificialmente para que adopte sustancialmente una conformación que la CDR forma en la molécula del anticuerpo anti-DC-STAMP para proporcionar un único péptido con la capacidad de unirse a DC-STAMP (véase, por ejemplo, USP 5,331,573). Por tanto, dicho péptido modificado que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una CDR o que tiene una secuencia de aminoácidos parcial con aminoácidos contiguos se incluye en las moléculas de la presente invención.

30 Con el fin de crear una variante que tenga una secuencia de aminoácidos con una delección de uno o más aminoácidos en la misma se puede usar mutagénesis por casete (Kishimoto Toshimitsu, Ed., New Experimental Biochemistry Lecture Series No. 2, Nucleic Acids III: Recombinant DNA Technology, 242-251) o similares.

Estos diversos ADN también se pueden producir mediante síntesis química de ácidos nucleicos de acuerdo con un procedimiento estándar, por ejemplo procedimiento de fosfito triéster (Hunkapiller, M. et al., Nature (1984) 310, 105-111) o similares. Se conocen los propios codones para un aminoácido deseado y se pueden seleccionar de forma arbitraria. Se pueden seleccionar de forma convencional, por ejemplo teniendo en cuenta su frecuencia usada en el huésped. Dichos codones en la secuencia de nucleótidos se puede modificar parcialmente de un modo habitual mediante mutagénesis específica de sitio (Mark, D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666) o similares, en el que los oligonucleótidos sintéticos que codifican una modificación deseada se usan como cebador.

40 La capacidad de un ADN para hibridar o no con ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP de la invención se puede examinar usando una sonda de ADN marcada con [α -³²P]dCTP o similares, por ejemplo de acuerdo con la técnica del cebador aleatorio (Feinberg, A.P. and Vogelstein, B., Anal. Biochem. (1983) 132, 6-13), nick translation (Maniatis, T. et al., in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. (1982)) o similares. El procedimiento experimental se seguirá como se describe a continuación.

El ADN a examinar se adsorbió en, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o de nailon o similar, se desnaturalizó opcionalmente con una base o similar y se inmovilizó con calor, luz UV o similar. La membrana se sumergió en una solución pre-hidridación que contiene 6 × SSC (1 × SSC contiene cloruro sódico 0,15M y citrato trisódico 0,015M), 5% de solución de Denhart y 0,1% de dodecilsulfato sódico (SDS) y se mantiene a 55 °C durante al menos 4 horas, y la sonda preparada como se eha descrito anteriormente se añade a la solución pre-hidridación de modo que la actividad específica final es 1 × 10⁶ cpm/ml, la membrana se incuba a 60 °C durante la noche. Después, la membrana se lava con 6 × SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos varias veces y después con 2 × SSC durante 20 minutos y se somete a autorradiografía.

De este modo se puede aislar un ADN capaz de hibridar con el ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo anti-DC-STAMP humanizado de una realización de la invención a partir de cualquier biblioteca de ADNc o biblioteca de genomas (Maniatis, T. et al., in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY., (1982)).

Cada uno de los ADN obtenidos de este modo se puede integrar en un vector de expresión y el vector de expresión

se puede introducir en células huésped procariotas y eucariotas para expresar el gen de interés en las células huésped. La expresión del gen se puede conseguir mediante un procedimiento descrito en "(1) Preparación de antígenos" en "6. Producción de anticuerpos anti-DC-STAMP".

5 Una fracción que contiene la proteína anticuerpo anti-DC-STAMP producida dentro de o exportado de las células transformantes se puede separar y purificar mediante varios procedimientos de separación de proteínas conocidos que aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de la proteína o similares. Estos procedimientos se pueden ejemplificar específicamente mediante un tratamiento habitual con un precipitante, ultrafiltración, varios tipos de cromatografía líquida tal como cromatografía en tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), diálisis y combinaciones de los mismos.

Con el fin de humanizar un anticuerpo monoclonal anti-DC-STAMP, la secuencia de aminoácidos de la región variable que se va a humanizar se debe diseñar de un modo tal que la totalidad de la secuencia de CDR predeterminada y los residuos de aminoácidos que forman parte de la secuencia FR se pueden injertar en el anticuerpo humano. El diseño puede seguir cualquiera de los procedimientos descritos más adelante.

15 En el diseño convencional para humanización, los principios que guían la selección de subgrupos para el aceptor es seleccionar:

(a) usar las combinaciones nativas en las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo humano conocido que tiene una secuencia de aminoácidos nativa; o

20 (b) usar las cadenas pesadas y ligeras que derivan de diferentes anticuerpos humanos, mientras que las cadenas pesadas y ligeras conservan las respectivas combinaciones en los subgrupos a los que pertenecen y tienen identidades altas de las secuencias de aminoácidos con las de las cadenas pesadas y ligeras del donante o de las cadenas pesadas y ligeras que tienen secuencias consenso. En realizaciones de la presente invención se pueden seguir los principios de guía anteriores pero se puede usar un enfoque diferente, que comprende:

25 (c) seleccionar FR en las cadenas pesadas y ligeras que tienen las identidades más altas con las FR en el donante de la biblioteca de las secuencias primarias en un anticuerpo humano, sin considerar las combinaciones en los subgrupos a los que pertenecen. Este enfoque de la elección permite que el donante y el aceptor tenga una identidad de aminoácidos del 70% en las porciones de FR. De este modo, se pueden injertar menos residuos de aminoácidos del donante y la respuesta HAMA puede inducirse de este modo en menor grado.

30 La estructura tridimensional de una molécula de anticuerpo se puede predecir con una precisión limitada a partir de su secuencia primaria (después, esta predicción se denomina "modelado molecular"). Esta predicción no puede identificar bien el papel de los residuos de aminoácidos que se producen rara vez en el subgrupo al que pertenece el donante. Generalmente es difícil determinar, de acuerdo con el método de Queen *et al.*, cuál de los residuos de aminoácidos en el donante y el aceptor se deben seleccionar para estas posiciones. Usando un enfoque de selección (c), se puede evitar la necesidad de realizar estas determinaciones.

Los presentes inventores proporcionan un nuevo procedimiento de identificar aminoácidos derivados de FR en el donante, que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la estructura y la función de la CDR en el donante y han mejorado más el procedimiento de humanización de anticuerpos.

40 Una vez que se ha seleccionado la especie molecular aceptora humana par las cadenas ligeras y pesadas, respectivamente, los residuos de aminoácidos que se van a injertar de la FR en el donante se pueden seleccionar como se ha descrito más adelante.

45 Cuando estas secuencias de aminoácidos del donante y el aceptor se alinean y hay diferentes residuos de aminoácidos en las correspondientes posiciones del FR en el donante y el aceptor, es necesario determinar qué residuos de aminoácido se deben seleccionar para estas posiciones. En esta selección, es necesario no variar la estructura tridimensional de las CDR derivadas del donante.

Queen *et al.*, sugirieron en la la Publicación Nacional de la solicitud de patente internacional nº 1992-502408 que un residuo de aminoácido en el FR del donante deberá injertarse en el aceptor junto con las secuencias de CDR y el residuo de aminoácido satisface al menos uno de los siguientes requisitos:

50 1) un aminoácido en la región FR humana del aceptor rara vez se ve en la posición y el correspondiente aminoácido en el donante se suele ver en la misma posición en el aceptor;
2) el aminoácido está muy cerca a uno de las CDR;
3) se espera que el aminoácido tenga un átomo de cadena lateral aproximadamente a 3Å o menos de la CDR en el modelo de inmunoglobulina tridimensional y que sea capaz de interactuar con el antígeno o la CDR en el anticuerpo humanizado que se va a crear.

Dado que el residuo descrito en 2) muestra con frecuencia la propiedad descrita en 3), el requisito 2) se omite en las realizaciones de la presente invención, pero se establecen dos requisitos adicionales. Por tanto, en realizaciones de

la presente invención, un residuo de aminoácido en la FR del donante que se va a injertar junto con las secuencias de CDR deberán satisfacer al menos uno de los siguientes requisitos:

- 5 a) un aminoácido en la región FR Del aceptor rara vez se ve en la posición y el correspondiente aminoácido en el donante se suele ver en la misma posición;
 b) cabe esperar que el aminoácido interaccione con un átomo constituyente de un aminoácido de la CDR en la estructura tridimensional y, también, con el antígeno o el bucle de CDR que se va a injertar.
 c) la posición está ocupada por un residuo que determina la clase canónica; o
 d) la posición está en la superficie de contacto entre las cadenas pesadas y ligeras.

10 En el requisito a), un aminoácido que se encuentra a una frecuencia del 90% o más en la posición en los anticuerpos de la misma subclase se define como "habitual" y un aminoácido que se encuentra a una frecuencia de menos del 10% se define como "raro" de acuerdo con la tabla de Kabat como se ha descrito anteriormente.

En el requisito c), si "la posición está ocupada o no por un residuo que determina la clase canónica" se puede determinar de un modo no ambiguo de acuerdo con la tabla de Chothia como se ha descrito anteriormente.

15 Para comprobar los requisitos b) y d), es necesario realizar un modelo molecular con antelación para la región variable del anticuerpo. En este caso se puede usar cualquier software comercial para el modelo molecular, pero preferentemente se usa AbM (Oxford Molecular Limited).

20 La precisión de la predicción estructural proporcionada por el modelo molecular se puede determinar con referencia a los resultados experimentales del análisis cristalográfico por rayos X en las regiones variables de varios anticuerpos, ya que la precisión de la predicción mediante el por el modelo molecular está limitada dentro de un intervalo determinado.

25 Si la distancia diatómica en la estructura tridimensional de la región variable, que se ha construido mediante el software de modelo molecular tal como AbM, es más corta que la suma del radio de van der Waals de cada uno de los dos átomos más 0,5 Å, se puede asumir que los átomos están en contacto entre sí mediante fuerzas de van der Waals. Si la distancia diatómica entre dos átomos polares en las cadenas principal y lateral, tal como el nitrógeno de la amida, el oxígeno del carbonilo y similares, es más corta que 2,9 Å, es decir, la distancia media el puente de hidrógeno más 0,5 Å, se puede asumir que tienen un puente de hidrógeno entre ellos. Además, si distancia diatómica entre dos átomos de cargas opuestas es más corta que 2,85 Å más 0,5 Å, se puede asumir que se forma un par de iones entre ellos.

30 Por otro lado, los resultados experimentales del análisis cristalográfico por rayos X en las regiones variables de varios anticuerpos demuestran que las posiciones en la FR que se ve que están en contacto con la CDR con una frecuencia alta con independencia del subgrupo implicado son los nº 1, 2, 3, 4, 5, 23, 35, 36, 46, 48, 49, 58, 69, 71 y 88 en la cadena ligera, y los nº 2, 4, 27, 28, 29, 30, 36, 38, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 69, 71, 73, 78, 92, 93, 94 and 103 en la cadena pesada (las cifras representan número de localización de los respectivos aminoácidos como se define en la publicación de Kabat *et al.*, y estas cifras se usarán más adelante en el presente documento). Si los mismos patrones que se usan en el modelo molecular se aplican a estas posiciones, los residuos de aminoácidos en estas posiciones se reconocen en contacto con los residuos de aminoácidos en las CDR en dos tercios de las regiones variables de anticuerpos conocidos. Según estos hallazgos, el requisito b) "cabe esperar que el aminoácido interaccione con un átomo constituyente de un aminoácido de la CDR en la estructura tridimensional y, también, con el antígeno o el bucle de CDR que se va a injertar" significa el siguiente requisito.

40 Si la posición de la FR en la cual la FR se ha predicho que entra en contacto con la CDR en el modelo molecular coincide con una cualquiera de las posiciones en las que la FR se observa en contacto con la CDR con una frecuencia alta en el análisis cristalográfico por rayos X experimental, los residuos de aminoácidos en la posición del donante se deberán injertar preferentemente. En otros casos, el requisito b) no se considera.

45 El requisito d) "la posición está en la superficie de contacto entre las cadenas pesadas y ligeras" significa el requisito siguiente. Los resultados experimentales del análisis cristalográfico por rayos X en las regiones variables de varios anticuerpos demuestran que los residuos de aminoácidos en las posiciones 36, 38, 43, 44, 46, 49, 87 y 98 en la cadena ligera y los residuos de aminoácidos en las posiciones 37, 39, 45, 47, 91, 103 y 104 en la cadena pesada hacen contacto entre las cadenas pesadas y ligeras con una frecuencia alta. Si una posición que se ha predicho que entra en contacto entre las cadenas pesadas y ligeras en el modelo molecular coincide con una cualquiera de las posiciones descritas con anterioridad, el residuo de aminoácidos en la posición del donante se deberá injertar preferentemente. En otros casos, el requisito d) no se considera.

50 Un ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en el anticuerpo anti-DC-STAMP humanizado de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se puede producir mediante los procedimientos que se describen más adelante.

55 Por ejemplo, muchos fragmentos de polinucleótidos que constituyen secuencias parciales de nucleótidos del ADN y que tienen una longitud de 60 a 70 nucleótidos se pueden sintetizar químicamente de un modo tal que se alinean de forma alterna en los lados sentido y antisentido, después cada una hibrida y se une usando ADN ligasa para

producir un ADN deseado que comprende ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en anticuerpo anti-DC-STAMP humanizado.

También se dispone de otro procedimiento en el que un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos total de las región variable del aceptor se aísla de linfocitos humanos, y una región que codifica la CDR se sustituye con nucleótidos mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica para incorporar secuencias de sitios de restricción. Después, la región se escinde con enzimas de restricción adecuadas, se sintetiza una secuencia de nucleótidos que codifica la CDR en el donante y se liga usando ADN ligasa para producir un ADN deseado que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en el anticuerpo anti-DC-STAMP humanizado.

Además, el procedimiento de PCR con extensión por solapamiento (véase see Holton et al., Gene, 77, 61-68 (1989)) descrito más adelante puede usarse, preferentemente, para producir un ADN deseado que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en el anticuerpo anti-DC-STAMP humanizado.

Específicamente, dos ADN diferentes que codifican dos secuencias de aminoácidos diferentes que se van a conectar entre sí se denominan (A) y (B) por comodidad. Un cebador sentido (en lo sucesivo en el presente documento denominado (C)), de 20 a 40 nucleótidos a hibridar en el lado 5' de (A) y un cebador antisentido (en lo sucesivo en el presente documento denominado (D)) de 20 a 40 nucleótidos a hibridar en el lado 3' de (B) se sintetizan químicamente. Además, de 20 a 30 nucleótidos en el lado 3' de (A) y de 20 a 30 nucleótidos a hibridar en el lado 5' de (B) se ligan para sintetizar un cebador sentido quimérico (en lo sucesivo en el presente documento denominado (E)) y un cebador antisentido complementario al del cebador (en lo sucesivo en el presente documento denominado (F)). Un ADN del vector adecuado que contiene (A) como sustrato se somete a PCR usando el cebador sentido (C) y el cebador antisentido quimérico (F) para producir un ADN que contiene (A) con de 20 a 30 nucleótidos en 5'-terminal de (B) añadidos el extremo 3' de (A) (el ADN resultante se denomina (G)). De un modo similar, un ADN del vector adecuado que contiene (B) como sustrato se somete a PCR usando el cebador antisentido (D) y el cebador sentido quimérico (E) para producir un ADN que contiene (B) con de 20 a 30 nucleótidos en 3'-terminal de (A) añadidos el extremo 5' de (B) (el ADN resultante se denomina (H)). En los (G) and (H) resultantes, los 40 a 60 nucleótidos en 3' de (G) y los 40 a 60 nucleótidos en 5' de (H) tienen secuencias de nucleótidos complementarias. Cuando (G) y (H) se amplifican, respectivamente, y después se mezclan para realizar la PCR, la primera desnaturalización da lugar a una sola hebra de (G) y (H) en combinación, y la posterior hibridación recupera la mayoría del ADN de partida, pero la porción del ADN se hibrida en las regiones de la secuencia de nucleótidos complementaria para formar un heteroADN bicatenario. La extensión posterior lleva la porción monocatenaria sobresaliente para proporcionar un ADN quimérico en el que (A) y (B) están conectados (el ADN se denomina a continuación en el presente documento (I)). Además (I) como sustrato se somete a PCR usando el cebador sentido (C) y el cebador antisentido (D) para amplificar (I). La unión descrita anteriormente se puede llevar a cabo usando un ADN que codifica las regiones de CDR de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo monoclonal murino anti-DC-STAMP humana, un ADN que codifica las regiones FR de una inmunoglobulina IgG humana y un ADN que codifica la señal de secreción para una inmunoglobulina IgG humana como (A) y (B) como puede ser el caso.

Se conocen los codones para un aminoácido deseado y se pueden seleccionar de forma arbitraria. Se pueden seleccionar de forma convencional, por ejemplo, teniendo en cuenta su frecuencia de uso en el huésped. Dichos codones en la secuencia de nucleótidos se puede modificar parcialmente de un modo habitual mediante mutagénesis específica de sitio (Mark, D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666) o similares, en el que los oligonucleótidos sintéticos que codifican una modificación deseada se usan como cebador. De acuerdo con lo anterior, en la síntesis química de los cebadores, se pueden diseñar con antelación para introducir después una mutación puntual para proporcionar un ADN deseado que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en el anticuerpo anti-DC-STAMP.

La integración de uno cualquiera de los ADN obtenidos de este modo en un vector de expresión permitirá la transformación de células huésped procariontas o eucariotas. Además, la introducción de un promotor adecuado y una secuencia para un rasgo seleccionable en el vector permitirá que las células huésped expresen el gen.

Los anticuerpos anti-DC-STAMP recombinantes se pueden producir sin dificultades con un rendimiento elevado y con una pureza alta mediante los procedimientos descritos anteriormente.

(4) Creación de anticuerpos anti-DC-STAMP humanos completos

Un anticuerpo humano completo significa un anticuerpo humano que tiene secuencias génicas de un anticuerpo derivado únicamente de un cromosoma humano. Un anticuerpo humano completo anti-DC-STAMP se puede crear mediante un procedimiento usando ratones productores de anticuerpos humanos en los que se han transferidos fragmentos cromosómicos humanos que contienen genes para las cadenas H y L de anticuerpo humano (Tomizuka, K. et al., Nature Genetics, (1977) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nuc. Acids Res., (1998) 6, 3447-3448; Yoshida, H et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, (1999) 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000) 97, 722-727), y mediante un procedimiento para obtener un anticuerpo humano derivado por expresión en fagos sometido a detección selectiva

en una biblioteca de anticuerpos humanos (Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*, (2002) 43 (7), 2301-8; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, (2002) 1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology*, (2002) 109 (3), 427-431; etc.).

5 La unión específica del anticuerpo humano anti-DC-STAMP a DC-STAMP se puede verificar adecuadamente, por ejemplo mediante la técnica ELISA como se suia en la evaluación de títulos de anticuerpos cuando se inmunizan ratones.

7. Agentes farmacéuticos que contienen un anticuerpo anti-DC-STAMP

10 Un anticuerpo capaz de neutralizar la bioactividad de DC-STAMP se puede obtener de anticuerpos anti-DC-STAMP producidos mediante el procedimiento descrito en la sección "6. Producción de anticuerpos anti-DC-STAMP" que se ha descrito anteriormente. Un anticuerpo capaz de neutralizar la bioactividad de DC-STAMP se puede usar como agente terapéutico para trastornos óseos metabólicos causados por la diferenciación anormal en osteoclastos, dado que el anticuerpo inhibe la bioactividad *in vivo* de DC-STAMP, es decir la diferenciación en, y/o maduración de, osteoclastos.

15 La actividad neutralizante del anticuerpo anti-DC-STAMP para la bioactividad *in vivo* de DC-STAMP se puede analizar mediante, por ejemplo, su capacidad para suprimir la diferenciación en osteoclastos de las células que sobreexpresan DC-STAMP. Por ejemplo, una cepa de células derivadas de monocitos murinos, como las células RAW264.7, las células RAW264, las células RAW-D que sobreexpresan DC-STAMP se pueden cultivar, después suministrar con diferentes niveles del anticuerpo anti-DC-STAMP y estimular con RANKL y TNF- α para medir la supresión de la diferenciación de las células en osteoclastos. Asimismo, un cultivo celular primario de médula ósea se puede suministrar con diferentes niveles del anticuerpo anti-DC-STAMP y estimular con RANKL y TNF- α para medir la supresión de la diferenciación de las células en osteoclastos. Además, en un experimento de ensayo en pozo (Takada et al., *Bone and Mineral*, (1992) 17, 347-359) usando células de fémur y/o tibia, las células del fémur y/o la tibia se pueden suministrar con diferentes niveles del anticuerpo anti-DC-STAMP y la formación de hoyos en trozos de marfil observados para medir la supresión de la resorción ósea osteoclástica. El efecto terapéutico *in vivo* del anticuerpo anti-DC-STAMP sobre los trastornos óseos metabólicos en animales de laboratorio se puede examinar mediante, por ejemplo, administración del anticuerpo anti-DC-STAMP a animales transgénicos que sobreexpresan DC-STAMP y midiendo un cambio en los osteoclastos.

20 Un anticuerpo capaz de neutralizar la bioactividad de DC-STAMP obtenido de este modo es útil como agente farmacéutico, especialmente en una composición farmacéutica para tratar enfermedades como osteoporosis, artritis reumatoide e hipercalcemia, que s epueden atribuir a un trastorno óseo metabólico; o como anticuerpo para diagnóstico inmunológico de estas enfermedades.

25 Un anticuerpo anti-DC-STAMP se puede administrar, por ejemplo, solo o en combinación con al menos un agente terapéutico para tratar enfermedades óseas con el fin de tratar trastornos óseos metabólicos. Como ejemplo, también se puede administrar un anticuerpo anti-DC-STAMP junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico contra un trastorno óseo metabólico. El agente terapéutico administrado adecuadamente junto con el anticuerpo anti-DC-STAMP puede incluir, entre otros, bisfosfonatos, vitamina D₃ activada, calcitonina y sus derivados, preparados hormonales tales como estradiol, SERM (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos), ipriflavona, vitamina K₂ (menatetrenona) y preparados de calcio. Dependiendo del estado del trastorno óseo metabólico y/o de la extensión de la terapia necesaria se pueden administrar dos, tres o más agentes diferentes, o se pueden suministrar como una formulación con estos agentes combinados en la misma. Estos agentes y el anticuerpo anti-DC-STAMP también se pueden suministrar como una formulación combinada. Además, estos agentes y se pueden suministrar como un kit terapéutico, estando los agentes contenidos en el mismo. Asimismo, estos agentes se pueden suministrar por separado del anticuerpo anti-DC-STAMP. Cuando la terapia está en forma de terapia génica, el gen del anticuerpo anti-DC-STAMP se puede insertar cadena abajo del mismo promotor junto con, o por separado, un gen para un agente terapéutico proteináceo de enfermedad ósea y se pueden integrar en diferentes vectores o en el mismo vector.

30 La conjugación de un anticuerpo anti-DC-STAMP o fragmento del mismo con agente terapéutico para la enfermedad ósea se puede usar para elaborar un conjugado farmacológico dirigido como se describe por M. C. Garnet, "Targeted drug conjugates: principles and progress", *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2001) 53, 171-216. La molécula de anticuerpo o fragmentos de la misma se pueden usar para esta finalidad, a meos que el fragmento pierda completamente su capacidad para reconocer osteoclastos, Fab, F(ab')₂ ay Fv son ejemplos de fragmentos. El anticuerpo anterior, o fragmentos del mismo, también se pueden usar con esta finalidad en la presente invención. El modo de conjugación de un anticuerpo anti-DC-STAMP o fragmento del mismo con agente terapéutico para la enfermedad ósea puede ser una de las diversas formas descritas en M. C. Garnet, "Targeted drug conjugates: principles and progress", *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2001) 53, 171-216; G. T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, California (1996); Putnam and J. Kopecek, "Polymer Conjugates with Anticancer Activity", *Advances in Polymer Science* (1995) 122, 55-123; etc. Específicamente, el anticuerpo anti-DC-STAMP y el agente terapéutico para la enfermedad ósea se pueden conjugar químicamente directamente, o mediante un espaciador, tal como un oligopéptido, o conjugado mediante un vehículo farmacológico adecuado. Ejemplos de vehículos farmacológicos incluyen liposomas y polímeros acuosos. Más específicamente, el vehículo farmacológico

se puede usar para, por ejemplo, encapsulación del anticuerpo y el agente terapéutico para la enfermedad ósea en un liposoma, para conjugación del anticuerpo con el liposoma, mediante unión química del agente terapéutico para la enfermedad ósea directamente, o mediante un espaciador, tal como un oligopéptido, con un polímero acuoso (un compuesto con un peso molecular de aproximadamente 1.000 a 100.000) o conjugación del anticuerpo con un polímero acuoso. El anticuerpo (o fragmento del mismo), el agente terapéutico para la enfermedad ósea y/o el vehículo farmacológico, tal como un liposoma o un polímero acuoso, se pueden unir entre sí de acuerdo con los procedimientos descritos por G. T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, California (1996); Putnam and J. Kopecek, "Polymer Conjugates with Anticancer Activity" *Advances in Polymer Science* (1995) 122, 55-123, o similares, que son todos ellos bien conocidos por los expertos en la técnica. La encapsulación del agente terapéutico para la enfermedad ósea en el liposoma se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos descritos por D. D. Lasic, "Liposomes: De Physics to Applications", Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1993), o similares, que son bien conocidos por los expertos en la técnica. La unión del agente terapéutico para la enfermedad ósea con un polímero acuoso se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos descritos por D. Putnam and J. Kopecek, "Polymer Conjugates with Anticancer Activity", *Advances in Polymer Science* (1995) 122, 55-123, o similares, que son bien conocidos por los expertos en la técnica. El anticuerpo (o fragmento del mismo) y un agente terapéutico proteínico para la enfermedad ósea (o fragmento del mismo) pueden formar una proteína de fusión de acuerdo con procedimientos de ingeniería genérica bien conocidos en la técnica, además de los procedimientos descritos anteriormente.

En el presente documento, también se divulga una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-DC-STAMP y un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento, también se divulga una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-DC-STAMP y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico para la enfermedad ósea y un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. El agente terapéutico para la enfermedad ósea puede incluir, entre otros, bisfosfonatos, vitamina D₃ activada, calcitonina y sus derivados, preparados hormonales tales como estradiol, SERM (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos), ipriflavona, vitamina K₂ (menatetrenona), preparados de calcio, PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpos anti-PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea), antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos anti-RANKL y OCIF (factor inhibidor de la osteoclastogénesis).

Las sustancias usadas para formulación de la composición farmacéutica de la invención deberán ser, preferentemente, no tóxicas para los receptores de la composición farmacéutica, preferentemente en términos de cantidad y concentraciones a administrar.

La composición farmacéutica divulgada en el presente documento puede contener sustancias incluidas en la formulación para modificar o mantener el pH, la presión osmótica, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la solubilidad, la velocidad de liberación lenta, la adsorción y la permeabilidad. Las sustancias usadas para formulación pueden incluir, entre otras, las siguientes: aminoácidos, tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones, tales como tampón fosfato, citrato, borato, bicarbonato, Tris-HCl; agentes de carga, tales como manitol y glicina, y agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminetetraacético (EDTA); agentes de formación de complejos, tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina; cargas, tales como glucosa, manosa o dextrina; otros hidratos de carbobo tales como monosacáridos y disacáridos; agentes colorantes; agentes aromatizantes, diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; péptidos de bajo peso molecular; iones apareados de formación de sales, tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno; disolventes, tales como glicerina, propilenglicol y polietilenglicol; alcoholes de azúcar, tales como manitol y sorbitol; agentes de suspensión; agentes de superficie activa, tales como ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina y colesterol; agentes potenciadores de la estabilidad, tales como sacarosa y sorbitol; agentes potenciadores de la elasticidad, tales como cloruro de sodio o potasio, manitol y sorbitol; agentes de transporte; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Estas sustancias usadas en formulación se pueden añadir a 0,01 a 100 veces, preferentemente a 0,1 a 10 veces, el peso del anticuerpo anti-DC-STAMP. Los expertos en la técnica pueden formular la composición farmacéutica, según sea adecuado, dependiendo de la enfermedad contra la que se va a usar, la vía de administración usada y similares.

El excipiente o vehículo usado en la composición farmacéutica puede ser líquido o sólido. Un vehículo o excipiente adecuado puede ser agua o solución salina fisiológica para inyectables, líquido cefalorraquídeo artificial u otras sustancias de uso habitual para la administración parenteral. El vehículo puede ser solución salina fisiológica neutra o solución salina fisiológica que contiene seroalbúmina. La composición farmacéutica puede contener tampón tris a pH 7,0-8,5 o tampón acetato a pH 4,0-5,5, que puede contener sorbitol u otros componentes. Una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento incluye una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DC-STAMP, así como una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo anti-DC-STAMP y al menos un agente terapéutico para enfermedad ósea. Una composición farmacéutica como se divulga en el

presente documento se proporciona en una formulación adecuada que tiene una composición seleccionada y una pureza requerida, que puede estar en forma de un producto liofilizado o un líquido. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo anti-DC-STAMP o composición farmacéutica que contiene un anticuerpo anti-DC-STAMP y al menos un agente terapéutico para enfermedad ósea puede ser un producto liofilizado formado con la ayuda de un excipiente adecuado, tal como sacarosa.

Una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento se puede preparar para administración parenteral o para administración oral para absorción en el tracto gastrointestinal. La composición y una concentración de la formulación se pueden determinar mediante el procedimiento de administración. La afinidad de un anticuerpo anti-DC-STAMP contenido en una composición farmacéutica de la invención por DC-STAMP es alta. Esto se puede representar mediante la constante de disociación para DC-STAMP (el valor de la K_d). Una afinidad alta (K_d menor) significa que el anticuerpo es eficaz en un sujeto humano a una dosis baja. El nivel de dosis de una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento para un sujeto humano se puede determinar en base al valor de la K_d . El nivel de dosis para un sujeto humano puede ser una única dosis de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg administrada una vez cada 1 a 30 días cuando un anticuerpo anti-DC-STAMP es el agente activo.

Una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento puede ser una forma de dosificación tal como una inyección (incluidas gotas), supositorio, agente intranasal, comprimido sublingual, agente de absorción transdérmica o similar.

8. Búsqueda de sustancias de interacción directa

En el presente documento se divulga un enfoque al diseño de fármacos basado en la conformación de la proteína DC-STAMP con el fin de proporcionar una sustancia capaz de suprimir la actividad de DC-STAMP. Este enfoque, conocido como diseño racional del fármaco, se usa para buscar un compuesto que pueda inhibir o potenciar con eficacia una función tal como actividad enzimática o la unión a un ligando, cofactor o ADN. Uno de estos ejemplos bien conocidos es un inhibidor de la proteasa que ahora está en el mercado como agente anti-VIH. La estructura tridimensional de DC-STAMP se puede analizar por medio de técnicas generalmente bien conocidas, tales como análisis cristalográfico de rayos X y resonancia magnética nuclear. Además, se puede diseñar una sustancia capaz de suprimir la función de DC-STAMP aprovechando el diseño de fármacos asistido por ordenador (CADD) para buscar dicha sustancia. Dichos ejemplos conocidos incluyen un compuesto de bajo peso molecular que es un promotor de nuevo fármaco basado en genoma para tratar la artritis reumatoide e inhibe la acción de AP-1 (solicitud de patente WO 99/58515). De este modo, se puede identificar una sustancia capaz de suprimir la función de DC-STAMP que puede unirse directamente a DC-STAMP o inhibir la interacción de DC-STAMP con otro factor.

También se divulga un polipéptido capaz de asociarse con DC-STAMP, es decir una proteína pareja de DC-STAMP. Por tanto, se divulga un procedimiento de detección selectiva de una proteína pareja que regula la actividad de DC-STAMP.

El procedimiento de detección selectiva puede incluir una etapa de exponer muestras de la proteína de ensayo a DC-STAMP y seleccionar una proteína capaz de unirse a DC-STAMP. En este procedimiento, por ejemplo, se usa DC-STAMP purificada y una proteína se une a la misma, y la proteína unida se purifica por medio de afinidad. Como ejemplo específico, se puede fusionar una DC-STAMP con una secuencia de seis moléculas de histidina que actúan como marcador de afinidad, el producto de la fusión resultante se incuba con un extracto celular (una fracción de eluato preparada antes cargando el extracto celular en una columna de níquel-agarosa y pasando el extracto por la columna) a 4°C durante 12 horas y, después, se aplica la mezcla a otro soporte de níquel agarosa y se incuba además a 4°C durante 1 hora. El soporte de níquel agarosa se lava bien con tampón de lavado y se añade imidazol 100 mM para liberar/purificar la proteína derivada del extracto celular que es capaz de unirse específicamente a DC-STAMP, proteína que se caracterizará estructuralmente. De este modo, si es posible purificar una proteína capaz de unirse directamente a DC-STAMP, y una proteína incapaz de unirse directamente a DC-STAMP pero capaz de unirse indirectamente a través de un complejo como subunidad con otra proteína unida directamente (Experimental Medicine, Separate Volume, Biological Technology Manual Series 5: "Method of Study on Transcription Factor", 215-219, Yodosha Co, Ltd.).

Otros procedimientos pueden incluir clonación mediante transferencia de tipo western (Experimental Medicine, Separate Volume, "New Handbook on Genetic Engineering", 76-81, Yodosha Co, Ltd.) o un procedimiento de dos híbridos usando células de levadura o de mamífero (Experimental Medicine, Separate Volume, "New Handbook on Genetic Engineering", 66-75, Yodosha Co, Ltd.; "Checkmate Mammalian Two Hybrid System" made by Promega Corporation), pero no se limitan a estos.

Si un ADNc para la proteína pareja que interacciona directa o indirectamente con DC-STAMP se proporciona de este modo, y es útil para la detección selectiva funcional de una sustancia capaz de inhibir la interacción entre DC-STAMP y la proteína pareja. Específicamente, por ejemplo, se prepara una proteína de fusión de DC-STAMP con glutatión-S-transferasa y se fija a una microplaca cubierta con un anticuerpo anti-glutatión-S-transferasa y después se pone en contacto con una proteína pareja biotinilada para detectar su conjugación usando fosfatasa alcalina unida a estreptavidina. Al añadir la proteína pareja biotinilada, cada sustancia de ensayo también se añade para encontrar/seleccionar una sustancia que puede potenciar o inhibir la conjugación de la proteína de fusión a la

proteína pareja. En este procedimiento, se puede identificar una sustancia que actúa directamente sobre la proteína de fusión o la proteína pareja.

5 Si la conjugación de la proteína de fusión a la proteína pareja es indirecta mediante algún tercer factor, el ensayo anterior se puede proseguir, por ejemplo, en presencia de dicho extracto celular, ya que puede contener el factor. En este caso, se puede seleccionar una sustancia que puede actuar sobre el factor.

10 Si la proteína pareja resultante potencia la función de DC-STAMP, se pueden identificar sustancias candidatas útiles como agentes terapéuticos para un trastorno óseo metabólico, por ejemplo osteoporosis, de acuerdo con el procedimiento de ensayo descrito anteriormente en el que se usa un vector de expresión con el gen de DC-STAMP. Como alternativa, si la proteína pareja resultante suprime la función de DC-STAMP, se puede usar un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un factor supresor para terapia génica de un trastorno óseo metabólico.

15 Dicho polinucleótido se puede obtener mediante, por ejemplo, análisis de la secuencia de aminoácidos del inhibidor identificado sintetizando una sonda oligonucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de nucleótidos y criba una biblioteca de genoma o de ADNc. Si un péptido que inhibe la función de DC-STAMP deriva de una biblioteca peptídica artificial generada aleatoriamente se puede sintetizar químicamente un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido.

20 En terapia génica, un gen que codifica el inhibidor obtenido de este modo se puede integrar en, por ejemplo, un vector viral y se puede infectar a un paciente con un virus no virulento que contiene el vector viral recombinante. En el paciente se puede producir un factor anti-osteoclástico para suprimir la diferenciación en osteoclastos y, de este modo, tratar un trastorno óseo metabólico.

Para introducir un agente de terapia génica en las células, se dispone de una transferencia génica usando un vector viral o una transferencia génica con un vector no viral (Nikkei Science, April, 1994, pp. 20-45; Experimental Medicine, Extra Number, 12 (15) (1994); Experimental Medicine, Separate Volume, "Basic Technology of Gene Therapy", Yodosha Co, Ltd. (1996)).

25 Con el objeto de la transferencia génica con vector viral, el ADN que codifica un inhibidor de DC-STAMP o una variante del ADN se integra en, por ejemplo, un virus de ADN o ARN, tal como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus vacunal, virus de viruela, poliovirus o virus Sindbis. De los virus, son particularmente preferidos los retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus vacunales. Una transferencia génica no mediada por virus puede incluir la inyección directa de un plásmido de expresión en un músculo (vacunación con ADN), el procedimiento del liposoma, lipofección, microinyección, transfección con fosfato cálcico y electroporación, particularmente preferida es la vacunación del ADN y el procedimiento del liposoma.

30 Para permitir que un agente terapéutico actúe como fármaco, se dispone de procedimientos *in vivo* para administrar ADN directamente en el cuerpo, así como el procedimiento *ex vivo* para eliminar cierto tipo de célula del cuerpo humano, introduciendo ADN en las células *in vitro* y devolviendo las células al cuerpo (Nikkei Science, April, 1994, pp. 20-45; The Pharmaceuticals Monthly, 36(1), 23-48 (1994); Experimental Medicine, Extra Number, 12(15) (1994)).

35 Por ejemplo, cuando el agente terapéutico génico se administra mediante un procedimiento *in vivo*, se administra por una vía de administración adecuada, tal como por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular, dependiendo del tipo de enfermedad, síntomas etc. Cuando un agente terapéutico génico se administra mediante un procedimiento *in vivo*, normalmente puede ser en forma de una inyección que opcionalmente contiene un vehículo convencional. Además, cuando está en forma de liposoma o liposoma condensada con membrana (liposoma del virus Sendai o similares), se puede formular en una suspensión, liofilizado, liofilizado concentrado por centrifugación o similares.

40 Una complementaria a la secuencia nucleotídica como se muestra en la SEC ID N° 1 en el Listado de secuencias o una complementaria de una secuencia parcial de la misma se puede usar en la denominada terapia antisentido. Las moléculas antisentido se pueden usar en forma de ADN que comprende de 15 a 30 meros complementario de una porción de una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias nucleotídicas proporcionadas en las SEC ID N°: 1, 3 y 5 en el listado de secuencias, o un derivado de ADN estable de las mismas, tal como un fosforotioato, metilfosfonato o derivado de morfolino, o un derivado de ARN estable tal como 2'-O-alkil-ARN. Las moléculas antisentido se pueden incorporar en células para expresarlas en las mismas mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica a la cual pertenece la presente invención, tal como microinyección, encapsulación de liposomas o uso de un vector que tiene una secuencia antisentido. Dicha terapia antisentido es útil para tratar enfermedades causadas por un incremento excesivo de la actividad de la proteína que está codificada por la secuencia de nucleótidos que se da en la SEC ID N°: 1 en el listado de secuencias.

45 Asimismo, se puede usar ARN corto bicatenario (ARNsi) (Genes and Developments, 15th/Jan./2001, 15, 2, pp. 188-200). Por ejemplo, el ARNsi contra el gen de DC-STAMP se puede preparar e introducir en las células de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento anterior, para tratar una enfermedad debida a un trastorno óseo metabólico causado por la sobreexpresión de DC-STAMP.

Una composición farmacéuticamente útil que contiene el oligonucleótido antisentido y/o ARNsi se puede preparar mediante un procedimiento conocido que incluye la mezcla del agente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos para un agente farmacéutico que contiene un oligonucleótido antisentido y procedimientos de producir el agente se ejemplifican en "Applied Antisense Oligonucleotide Technology" (1988, Wiley-Liss, Inc.).

5 Una composición farmacéutica que contiene el oligonucleótido antisentido y/o ARNsi se puede preparar mediante la mezcla del agente activo con excipiente(s) y/o diluyente(s) farmacológicamente aceptables y se administra por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, jarabe o similares, o por vía parenteral en forma de inyección, supositorio, parche, fármaco tópico o similar. Estas formulaciones se puede producir mediante procedimientos bien conocidos usando aditivos tales como: excipientes (incluidos derivados de azúcar, tales como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y sorbitol; derivados de almidón, tales como almidón de maíz, almidón de patata, almidón α y dextrina; derivados de celulosa, tales como celulosa cristalina; excipientes orgánicos tales como goma arábiga, dextrano y pululano, y excipientes inorgánicos, incluidos derivados de silicato, tales como anhídrido de ácido silícico ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio y aluminato metasilicato de magnesio; fosfatos, tales como hidrogenofosfato de calcio, carbonatos, tales como carbonato cálcico; y sulfatos, tales como sulfato cálcico), lubricantes (p. ej., ácido esteárico y sales metálicas del mismo, incluidos ácido esteárico, estearato de calcio y estearato de magnesio; talco; sílice coloidal; ceras, tales como cera de abeja y esperma de ballena; ácido bórico; ácido atípico; sulfatos, tales como sulfato sódico; glicol; ácido fumárico; benzoato sódico; DL-leucina; sales de sodio de ácido graso; Laurilsulfatos, tales como Laurilsulfato sódico y Laurilsulfato de magnesio; ácidos silícicos, tales como anhídrido de ácido silícico e hidrato de ácido silícico; y los derivados de almidón mencionados anteriormente), aglutinantes (p. ej., hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol y compuestos similares a los excipientes mencionados con anterioridad), agentes disgregantes (p. ej., derivados de celulosa, tales como hidroxipropilcelulosa con baja sustitución, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa sódica con puentes internos; celulosas de almidón químicamente modificadas, tales como carboximetilamidón, carboximetilamidón sódico y polivinilpirrolidona reticulada y similares), emulsionantes (incluidos, por ejemplo, arcillas coloidales tales como bentonita y goma de abeja; hidróxidos metálicos tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; tensioactivos aniónicos tales como Laurilsulfato sódico y estearato de calcio; tensioactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio; y tensioactivos no iónicos tales como ésteres grasos de polioxietilentalquiléter, polioxietilensorbitano y ésteres grasos de sacarosa); estabilizantes (incluidos ésteres de p-hidroxinebcoico tales como metilparabeno y propilparabeno; alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico y feniletanol; cloruro de benzalconio, fenoles tales como fenol y cresol; timerosal; ácido deshidroacético; y ácido sórbico), aromatizantes (incluidos, por ejemplo endulcorantes de uso habitual, acidulantes y perfumes), diluyentes y otros.

Se pueden usar dispersiones coloidales además de las formas descritas anteriormente con el fin de administrar los agentes farmacéuticos a los pacientes. Cabe esperar que las dispersiones coloidales potencien la estabilidad de un compuesto *in vivo* y transporten con eficacia el compuesto al interior de órganos, tejidos o células concretos. La elección de dispersiones coloidales de uso habitual no está limitada y pueden incluir dispersiones basadas en lípidos, que abarcan polímeros compuestos, nanocápsulas, microesferas, perlas y emulsionantes en sistemas de aceite/agua, micelas, micelas mixtas y liposomas, preferentemente múltiples liposomas o vesículas lamelares artificiales capaces de transportar con eficacia el compuesto en órganos, tejidos o células concretos (Mannino et al., Biotechniques, (1988) 6, 682; Blume and Cevc, Biochem. et Biophys. Acta, (1990) 1029, 91; Lappalainen et al., Antiviral Res., (1994) 23, 119; Chonn and Cullis, Current Op. Biotech., (1995) 6, 698).

Los liposomas unilamelares con un tamaño en el intervalo de 0,2—0,4 μm pueden encapsular una proporción significativa de un tampón acuoso que contiene macromoléculas. El compuesto se puede encapsular en un ambiente acuoso dentro de las lamelas y se transporta a las células cerebrales al tiempo que mantiene su actividad biológica (Fralely et al., Trends Biochem. Sci., (1981) 6, 77). Los liposomas normalmente están compuestos por lípidos, en particular fosfolípidos, sobre todo fosfolípidos, con una temperatura de transferencia de fase alta que normalmente se conjugan con al menos un tipo de esteroide, en particular colesterol. Ejemplos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingolípidos, fosfatidiletanolamina, cerbrósidos y gangliósidos. Lípidos particularmente útiles son fosfatidilgliceroles de diacilo, en los que la porción lipídica contiene 14-18 átomos de carbono, especialmente 16-18 átomos de carbono y están saturados (la cadena de 14-18 carbonos no tiene dobles enlaces). Fosfolípidos representativos incluyen fosfatidilcolina, dipalmitoil fosfatidilcolina y diestearoil fosfatidilcolina.

Dirigir los liposomas que contienen dispersiones coloidales puede ser de forma pasiva o activa. La forma pasiva se consigue mediante el uso de la propiedad intrínseca de los liposomas que migran para distribuirse entre las células del sistema retículoendotelial en órganos que contienen capilares sinusoidales. En contraste, la forma activa se consigue mediante, por ejemplo, unión de un ligando concreto a liposomas, en los que el ligando incluye una proteína viral de la cubierta (Morishita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) 90, 8474), anticuerpo monoclonal (o un sitio de unión adecuado del mismo) y azúcar, glucolípido o proteína (o un fragmento oligopeptídico adecuado del mismo) o variando la composición de los liposomas o modificando los liposomas para permitir que los liposomas se distribuyan a los órganos o tipos celulares distintos a los sitios localizados activos. La superficie de los coloides dispersados que se van a dirigir se puede modificar de varios modos. En los sistemas de liberación usando liposomas dirigidos, la bicapa lipídica de los liposomas puede captar la porción lipídica de un ligando dirigido para mantener el ligando en asociación estrecha con la bicapa lipídica. La cadena lipídica puede estar unida al ligando

dirigido mediante varios ligadores. Un ligando dirigido capaz de unirse a una especie molecular de superficie celular concreta presente predominantemente en las células a las que se desea que se produzca la liberación del oligonucleótido puede ser: Por ejemplo, (1) una hormona, un factor de crecimiento o un fragmento oligopeptídico adecuado que se puede unir a un receptor celular concreto que se expresa predominantemente en las células en las que se desea la liberación, o (2) un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento adecuado del mismo (por ejemplo, un Fab o F(ab')₂) capaz de unirse específicamente a un epítipo antigénico presente predominantemente en las células diana. Asimismo, se pueden conjugar dos o más agentes bioactivos dentro de los mismos liposomas para dosis adecuadas. Dicha sustancia se puede añadir a la dispersión coloidal para potenciar la estabilidad intracelular y/o dirigir el contenido del fármaco.

La dispersión coloidal se puede administrar a varias dosis según los síntomas, la edad etc., pero a una dosis unitaria de al menos 1 mg (adecuadamente 30 mg) y, como máximo, 2.000 mg (adecuadamente 1,500 mg) en caso de dosificación oral y de al menos 0,1 mg (adecuadamente 5 mg) y, como máximo, 1.000 mg (adecuadamente 500 mg) en caso de inyección, para ser específico, inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa.

La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle y específicamente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. En los ejemplos siguientes se llevaron a cabo las respectivas técnicas para manipulación genética de acuerdo con los procedimientos descritos en Molecular Cloning, Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) a menos que se indique lo contrario o de acuerdo con las instrucciones del fabricante cuando se usan reactivos o kits comerciales

[Ejemplo de referencia 1]

20 Establecimiento de células RAW-D y células RAW-N

a) Aislamiento de células RAW-D y células RAW-N mediante cultivo con dilución límite

Se sabe que la estimulación de la cepa RAW264.7 de células derivada de monocitos murinos con RANKL soluble induce fuertemente expresiones génicas para marcadores de diferenciación en osteoclastos, tales como fosfatasa ácida resistente a tartrato (en lo sucesivo denominada "TRAP") y catepsina K ((Hsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1999) 96, 3540-3545). En consecuencia, se cree que la estimulación de las células RAW264.7 con RANKL induce su diferenciación en osteoclastos. Por tanto, se intentó obtener células subclonadas de la cepa parental de células RAW264, denominada células RAW264.7, que serían más sensibles a RANKL y TNF- α , o más diferenciación mediante estos estímulos (Watanabe et al., J. Endocrinol., (2004) 180, 193-201) Las células RAW264 se pueden adquirir de la Colección Europea de Cultivos TIPO (N^o cat. 85062803). Las células RAW264 se sometieron a dilución límite del modo normal, usando medio α -MEM que contiene 10% de suero bovino fetal y se sembraron en una placa de 96 pocillos en alícuotas de 100 μ l. Se cultivaron durante 10-14 días y se recogieron las colonias formadas. Cada colonia se preparó a $4,5 \times 10^4$ células/ml en medio α -MEM con 10% de suero bovino fetal. La preparación se sembró en placa de 96 pocillos a 150 μ l/pocillo y se añadieron los siguientes: RANKL humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 20 ng/ml y TNF- α humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 1 ng/ml. Las células se cultivaron durante 3 días y después se tiñeron por TRAP con un kit de fosfatasa ácida de leucocitos (de Sigma Co.) de acuerdo con el protocolo proporcionado para comprobar la formación de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP formados a partir de ellas. Esta serie de procedimientos de clonación mediante dilución límite se repitió dos veces para cada colonia.

Como resultado, se obtuvieron células RAW-D capaces de diferenciar con eficiencia en osteoclastos tras estimulación con RANKL y TNF- α , así como células RAW-N completamente incapaces de diferenciarse en osteoclastos tras estimulación con RANKL y TNF- α .

b) Estudio mediante tinción con TRAP de las tendencias de las células RAW-D y las células RAW-N a diferenciarse en osteoclastos

Las células RAW-D y RAW-N se examinaron según sus respuestas a la estimulación con sustancias inductoras de osteoclastos, tales como RANKL and TNF- α . Las células RAW-D, RAW-N y RAW264 se prepararon a $4,5 \times 10^4$ células/ml en medio α -MEM que contiene 10% de suero bovino fetal, respectivamente. Cada preparación se sembró en placa de 96 pocillos a 150 μ l/pocillo y se añadieron los siguientes: TNF- α humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 1 ng/ml y RANKL humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 10, 20, 40 o 80 ng/ml. Las células se cultivaron durante 3 días y después se tiñeron por TRAP con un kit de fosfatasa ácida de leucocitos (de Sigma Co.) de acuerdo con el protocolo proporcionado para contar el número de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP formados a partir de ellas. Como resultado, las células RAW-D formaron osteoclastos multinucleares positivos a TRAP dependiendo de la concentración de RANKL añadido (Figura 1). En contraste, no se observó que las células RAW-N y RAW264, es decir la cepa parental, formaran osteoclastos positivos a TRAP en respuesta a la adición de RANKL.

55 [Ejemplo de referencia 2]

Expresión de ARN de DC-STAMP murino en RAW-D o RAW-N

(Análisis de transferencia de tipo Northern)

a) Extracción de ARN total -D

Se prepararon células RAW-D y RAW-Na 7×10^4 células/ml en medio α -MEM con 10% de suero bovino fetal, respectivamente. Cada preparación se sembró en placa de 24 pocillos a 500 μ l/pocillo y se añadieron los siguientes:
 5 RANKL humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 20 ng/ml, TNF- α humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 2 ng/ml y MIP-1 α murino (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 1 ng/ml y se cultivaron durante 3 días. En paralelo, cada preparación también se cultivó en ausencia de RANKL humano (de PeproTech Inc.), TNF- α humano y MIP-1 α murino.

Después, el ARN total se extrajo de RAW-D O RAW-N, cultivadas en las condiciones descritas anteriormente, usando reactivo de extracción de ARN total (Reactivo TRIZol de Invitrogen Corporation) de acuerdo con el protocolo proporcionado. El ARN total recuperado se conservó a -80°C.
 10

b) Electroforesis y transferencia del ARN total

El ARN total recuperado se preparó a 0,5 μ g/ μ l en tampón de muestra para ARN (tampón 1 \times MOPS que contiene MOPS 20 mM, acetato sódico 8 mM y EDTA 1 mM), 50% de formamida, 18 μ g/ml de azul bromofenol, 5,8% de formaldehído, 5% de glicerol) mantenidos a 65°C durante 15 minutos y se enfrió rápidamente en hielo durante 5 minutos. Una alícuota de 20 μ l de la solución de muestra se dispensó en un pocillo en 1% de gel de agarosa, incluyendo formaldehído para electroforesis (tampón 1 \times MOPS, 1,2% de agarosa (de Sigma Co.), 6% de formaldehído) y se sometió a electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo aplicando corriente eléctrica mediante un lecho electroforético submarino que contiene (tampón 1 \times MOPS a 100V durante aproximadamente 3 horas.
 15

Tras la electroforesis, el ARN en el gel de agarosa se transfirió a un membrana de nailon (Hibond N+ from Amersham Pharmacia Biotech) durante la noche mediante técnica de transferencia capilar (Maniatis, T. et al., in "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, (1982))(una solución para transferencia fue 20 \times SSC). La membrana se lavó con 2 \times SSC durante 5 minutos, se secó al aire y se expuso a luz UV (300 mJ/cm²) en luz negra (Stratalinker 2400 from Stratagene Corporation) para inmovilizar el ARN.
 20

c) Preparación de las sondas

Un ADN plasmídico que se preparó insertando una secuencia de nucleótidos representada por la secuencia de nucleótidos en las posiciones 457 a 1208 del ADNc de DC-STAMP Δ T7 murino (SEC ID N° 5 en el listado de secuencias, n° de acceso en GenBank: AB109561) en el sitio TA clonado del vector pGEM-T Easy (from Promega Corporation), se digirió con NcoI (DE Takara Shuzo Co., Ltd.) en el sitio NcoI cerca del sitio TA clonado para hacer un ADN lineal. Se preparó una sonda antisentido de ARN con DIG (digoxigenina) usando mezcla de marcaje para ARN DIG (de Roche Diagnostics K.K.) y ARN polimerasa SP6 (de Roche Diagnostics K.K.) de acuerdo con los protocolos proporcionados. Esta preparación de sonda líquida se mezcló con 20 meros de ADNasa sin ARNasa (De Roche Diagnostics K.K.) para digerir el ADN molde. La sonda de ARN preparada de este modo puede detectar ANRm para DC-STAMP y DC-STAMP Δ T7, ya que la sonda corresponde a las secuencias nucleotídicas representadas por las posiciones 457 a 1078 y 1247 a 1376 en la SEC ID N°: 3 (ADNc de DC-STAMP murina) en el listado de secuencias.
 30
 35

d) Hibridación

La membrana preparada en b) se introdujo en una solución de hibridación de 6 ml (una solución de DIG Easy Hyb Granules from Roche Diagnostics K.K. en agua redestilada preparada de acuerdo con el protocolo proporcionado), se incubó a 65 °C durante 15 minutos (pre-hibridación) y después se incubó a 65 °C durante 16 horas en una solución de hibridación de 6 ml que contiene la sonda de ARN marcada con DIG. Después, la membrana se lavó dos veces en una solución de 2 \times SSC que contiene 0,1% de SDS a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se lavó dos veces en una solución de 0,5 X SSC que contiene 0,1% de SDA a 65 °C durante 30 minutos. Después, la membrana se trató con una solución de bloqueo (una solución de reactivo de bloqueo de Roche Diagnostics K.K. en un tampón de maleato preparado de acuerdo con el protocolo) durante 30 minutos y con una solución de bloqueo que contiene fragmentos Fag anti-digoxigenina marcados con fosfatasa alcalina (0.075 unidades/ml) (de Roche Diagnostics K.K.) durante 30 minutos. Además, la membrana se lavó tres veces con un tampón de lavado (tampón maleato 5 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,3 % de Tween 20) durante 15 minutos, CDP-Star (de Roche Diagnostics K.K.) se añadió como sustrato luminiscente y se analizó con un analizador Luminoimage Analyzer (LAS-1000 plus de Fuji Photo Film Co., Ltd.).
 40
 45
 50

Como resultado se mostró que RAW-D tenía poca expresión de la DC-STAMP murina en ausencia de RANKL and TNF- α , pero sí una expresión significativamente mayor de la DC-STAMP murina en presencia de RANKL and TNF- α (Figura 2). La expresión de la DC-STAMP murina no se aumentó adicionalmente mediante la adición de MIP-1 α .

Por otro lado, las RAW-N tenían poca o ninguna expresión de la DC-STAMP en ausencia o en presencia de RANKL and TNF- α . Debe añadirse que la expresión de la gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) también se determinó como control.
 55

[Ejemplo de referencia 3]**Expresión de ARN de DC-STAMP murino en RAW-D (análisis RT-PCR)**

Se prepararon células RAW-D a 7×10^4 células/ml en medio α -MEM con 10% de suero bovino fetal. La preparación se sembró en placa de 24 pocillos a 500 μ l/pocillo y se añadieron los siguientes: RANKL humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 20 ng/ml, TNF- α humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 2 ng/ml y MIP-1 α murino (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 1 ng/ml y se cultivaron durante 0, 4, 8, 16, 32, 48 o 72 horas.

Después, en cada punto de tiempo del cultivo, el ARN total se extrajo de RAW-D usando reactivo de extracción de ARN total (Reactivo TRIzol de Invitrogen Corporation) de acuerdo con el protocolo proporcionado. El ARN total recuperado se conservó a -80°C hasta su uso. El ARN total (1 μ g) y 1 μ l del cebador oligo(dT) 18 (0,5 μ g/ μ l) se añadió a H₂O para llegar a una solución de 11 μ l, que después se calentó a 70°C durante 10 minutos y se conservó a 4°C. A la solución se añadió: 4 μ l de 5 \times tampón de primera hebra (de Invitrogen Corporation), 1 μ l de dNTP 10 mM, 2 μ l de ditiotreitól 0,1 M, 1 μ l de transcriptasa inversa Superscript II (200 U/ μ l de Invitrogen Corporation), y 1 μ l de H₂O hasta un total de 20 μ l, que sometió la reacción a 42° C durante 1 hora y después se calentó a 70° C durante 10 minutos y se conservó a 4° C.

El ADNc monocatenario resultante se amplificó con cada par de cebadores como se describe más adelante.

Condiciones de PCR:

Cebadores para amplificar DC-STAMP murina y DC-STAMP Δ T7 murina:

5'-aaaacccttg ggctgttctt-3' (mDC-STAMP-F: SEC ID N° 7 en el listado de secuencias)

20 y

5'-cttcgcatgc aggtattcaa-3' (mDC-STAMP-R: SEC ID N° 8 en el listado de secuencias)

Cebadores para amplificar la catepsina K murina:

5'-gaggccaac tcaagaagaa-3' (mcatK-F: SEC ID N° 9 en el listado de secuencias)

y

25 5'-gccgtggcgt tatacatca-3' (mcatK-R: SEC ID N° 10 en el listado de secuencias)

Cebadores para amplificar la TRAP murina:

5'-cagctgtcct ggctcaaaa-3' (mTRAP-F: SEC ID N° 11 en el listado de secuencias)

y

5'-acatagccca caccgttctc-3' (mTRAP-R: SEC ID N° 12 en el listado de secuencias)

30 Cebadores para amplificar la GAPDH murina:

5'-aaacctca ccatctcca-3' (mGAPDH -F: SEC ID N° 13 en el listado de secuencias)

y

5'-gtggtcaca cccatcaca-3' (mGAPDH -R: SEC ID N° 14 en el listado de secuencias)

La PCR se realizó en las condiciones descritas más adelante usando un ciclador térmico (GeneAmp PCR System 9700 from Applied Biosystems Division, Perkin Elmer Japan Co., Ltd.). Para la reacción se usó la Platinum Taq ADN polimerasa (de Invitrogen Corporation). Al agua destilada se añadieron 8 pmol de cada cebador, 20 ng del ADNc monocatenario, 0,5 μ l de 10 \times tampón de reacción, 0,2 μ l de MgCl₂ 50 mM, 0,4 μ l de cada dNTP 2,5 mM y 0,05 μ l de Taq ADN polimerasa (5 unidades/ μ l) para preparar 5 μ l de una solución de reacción. La solución de reacción se calentó a 94 °C durante 2 minutos, se trató repetidamente 30 veces con un ciclo de temperatura de 94 °C durante 0,5 minutos, 65 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minutos, después se calentó a 72°C durante 10 minutos y se conservó a 4 °C. Toda la reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2,0%.

El gen de DC-STAMP comenzó a expresarse 8 horas después de añadir RANKL, TNF- α and MIP-1 α y su nivel de expresión continuó aumentando hasta 72 horas (Figura 3). También se observó que se expresaba DC-STAMP Δ T7, variante de corte y empalme que tiene un tercer exón corto, a un nivel superior 16 horas después de añadir RANKL, TNF- α and MIP-1 α y después. Además, se observó expresión a mayores niveles de los genes de la catepsina K y TRAP, que son marcadores moleculares para osteoclastos tras 16 horas y después. En la Figura 3, los números de la parte superior indican los lapsos de tiempo, por hora, tras la adición de RANKL, TNF- α and MIP-1 α y en la parte

derecha el tamaño de cada producto génico amplificado en una reacción de PCR se indica con el número de pares de bases.

[Ejemplo de referencia 4]

Expresión de ARNm de DC-STAMP murina en células cultivadas primarias derivadas de médula ósea murina (análisis RT-PCR)

Cuando se cultivan células de cultivos primarios derivadas de médula ósea murina en presencia de vitamina D₃, activada aparece un gran número de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP (Takahashi et al., *Endocrinology*, (1988) 122, 1373-1382).

Se sacrificó a un ratón DDY macho de 6 semanas de edad mediante dislocación cervical con anestesia con éter para extraer el fémur y la tibia. Se rasparon los tejidos blandos del fémur y la tibia y se cortaron los extremos, respectivamente. Se infundió medio α -MEM sin suero en la médula ósea usando una jeringa con una aguja de calibre 25 para obtener células de médula ósea. Se contó el número de células y las células se prepararon a 2×10^6 células/ml en medio α -MEM con 15% de suero bovino fetal. La preparación se sembró en una placa de 24 pocillos a 500 μ l/pocillo y se añadió vitamina D₃ activada (Biomol International LP) hasta una concentración final de 1×10^{-8} M. Las células se cultivaron durante 1, 3, 5 o 6 días.

Después, en cada punto de tiempo del cultivo, el ARN total se extrajo de las células usando reactivo de extracción de ARN total (Reactivo TRIzol de Invitrogen Corporation) de acuerdo con el protocolo proporcionado. El ARN total recuperado se conservó a -80°C hasta su uso.

Se realizó una reacción de RT-PCR usando el kit RNA LA PCR kit (AMV) Ver1.1 (Takara Biochemicals Inc.). En primer lugar, se mezclaron los siguientes para preparar una solución de reacción de 10 μ l: 2 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1 μ l de $10 \times$ tampón de PCR ARN, 1 μ l de mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 0,25 μ l de inhibidor de ARNasa (40 U/ μ l), 0,5 μ l de transcriptasa inversa (5 U/ μ l), 0,5 μ l de cebador Oligo dT-Adapter (2,5 pmol/ μ l), 1 μ g de ARN total y dH₂O sin ARNasa. Después, la solución de reacción se calentó a 50 °C durante 25 minutos, después se calentó a 99 °C durante 5 minutos y después se almacenó a 4°C. El ADNc monocatenario resultante se amplificó con cada par de los cebadores descritos en el Ejemplo de referencia 3.

La RT-PCR se realizó en las condiciones que se describen a continuación usando un ciclador térmico (GeneAmp PCR System 9700). A 5 μ l de la solución de reacción que contiene ADNc se añadieron los siguientes: 1,5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de $10 \times$ tampón LA PCR II (sin Mg²⁺), 0,125 μ l de Takara LA Taq (5 U/ μ l), un conjunto de cebadores (1 μ M cada uno de la concentración final) y agua redistilada para preparar una solución de reacción de 25 μ l. La solución de reacción se calentó a 94 °C durante 2 minutos, se trató repetidamente 25 veces con un ciclo de temperatura de 94 °C durante 30 minutos, 60 °C durante 30 minutos y 72 °C durante 30 minutos, y se almacenó a 4 °C. Una alícuota de 9 μ l se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2,0%.

Como resultado, el gen de DC-STAMP se expresó ligeramente 1 día después de añadir la vitamina D₃ activada, pero se expresó considerablemente tras 3 días cuando se formaron células precursoras de osteoblastos mononucleares y todavía se expresaba de forma considerable tras 5 y 6 días cuando se produjo la multinucleación de forma activa (Figura 4).

La DC-STAMP Δ T7 se expresó a un nivel menor que la DC-STAMP, pero el curso de tiempo de su expresión fue similar al de la DC-STAMP. En la Figura 4, los números de la parte superior indican los tiempos transcurridos, por día, tras añadir la vitamina D₃.

[Ejemplo 1]

Preparación de anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP de ratón de conejo

A partir de la secuencia de aminoácidos de DC-STAMP murino (SEC ID N°: 4 en el listado de secuencias, n° de acceso en GenBank: AB 109560), se intentó la preparación de un péptido parcial de la proteína DC-STAMP murina en base a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se localiza entre el 6° y el 7° dominio transmembranal y representada por los aminoácidos de las posiciones 330 a 343. Se sintetizó un péptido parcial que tiene la secuencia descrita anteriormente más un residuo de cisteína unido en su extremo N:

Cys Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val His Leu Lys Leu Arg Gly Glu (SEC ID N° 15 en el listado de secuencias)

Este péptido se conjugó con KLH (hemocianina de larva californiana), que es una proteína vehículo estimulante de antígeno, mediante el procedimiento con MBS (maleimidabenzoyloxisuccinimida). Se inmunizó un conejo con el conjugado para obtener el antisuero de conejo del modo habitual. El antisuero se purificó pasándolo a través de una columna de afinidad peptídica sobre la cual el péptido parcial usado para inmunización se inmovilizó para proporcionar el anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP de ratón de conejo. Dado que DC-STAMP Δ T7 (n° de acceso en GenBank: AB109561) también contiene esta secuencia peptídica, se consideró que el anticuerpo se unía a DC-STAMP y a DC-STAMP Δ T7. Esta secuencia peptídica se comparó además con una secuencia representada por os

aminoácidos de las posiciones 330 a 343 en la secuencia de aminoácidos de la DC-STAMP humana (SEC ID N°: 2 en el listado de secuencias, n° de acceso en GenBank: NM_030788). Como resultado, se encontró que ambas secuencias eran idénticas a excepción de que la Leu (ratón) en la posición 334 se había sustituido por Phe (humana) y la Arg (ratón) en la posición 341 se sustituyó por His (humana) y, por tanto, era muy probable que el anticuerpo se uniera también a la DC-STAMP humana.

[Ejemplo 2]

Inmunotinción en osteoclastos derivados de tibia de ratón neonato

a) obtención de muestras de osteoclastos derivados de tibia de ratón neonato

Se extrajo la tibia de un ratón DDY de 1 día de edad y se raspó el tejido blando. La tibia se trituró con tijeras de necropsia en medio α -MEM que contenía 15% de suero bovino fetal y después se pipeteó un poco más fuerte para dispersar y suspender las células. La suspensión celular se sembró en placas en una porta de cámara (De Nalge Nunc International) y se cultivó durante 1 hora para proporcionar células multinucleares que se adhieren al porta como osteoclastos.

b) Desarrollo de la proteína DC-STAMP con inmunotinción

Los osteoclastos obtenidos en a) se fijaron con un 4% de la solución de paraformaldehído a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) y se bloquearon con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) que contenía 3% de suero de cabra a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eliminar la solución de bloqueo, se añadió la solución siguiente a la solución salina tamponada con fosfato para osteoclastos (con 1% de suero de caballo) que contenía el anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP de ratón de conejo (10 μ g/ml), que se preparó en el Ejemplo 1, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como control negativo se proporcionó un anticuerpo IgG (de DAKO Japan Co., Ltd.) de un conejo no inmunizado y se sometió al mismo procedimiento. La muestra de osteoclastos se lavó después cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato que contenía 1% de suero de caballo y se hizo reaccionar con un anticuerpo IgG anti-conejo de cabra biotinilado (de Vector Laboratories Inc.) usado como anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato y se sometió a reacción de tinción usando un kit ABC-AP (de Vector Laboratories Inc.) de acuerdo con el protocolo proporcionado. Como resultado, se observó que los osteoclastos expuestos al anticuerpo anti-DC-STAMP se habían teñido intensamente, lo que demostró que la DC-STAMP se había expresado en osteoclastos derivados de tibia de ratón neonato. Por el contrario, los osteoclastos no se habían teñido para el anticuerpo del control negativo.

[Ejemplo 3]

Inmunotinción en tejido mandibular de ratón neonato

a) Preparación de la muestra de ensayo de tejido mandibular de ratón neonato

Se anestesió a un ratón DDY de 1 día de edad con éter y se inyectó solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) que contenía 4% de paraformaldehído en el ventrículo izquierdo para dijarlo en perfusión. Se extrajo la mandíbula, se empapó con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) que contenía 4% de paraformaldehído como se ha descrito anteriormente, se fijó a 4°C durante 12 horas, se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato y se lavó de nuevo con solución salina tamponada con fosfato a 4°C durante la noche. Después, se descalcificó con 10% de ETA (ácido etilendiaminotetraacético) a 4°C durante una semana. Se lavó en solución salina tamponada con fosfato que contenía 30% de sacarosa a 4°C durante la noche, se incluyó en un compuesto OCT (de Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) y se congeló en hielo seco con isopentano. El bloque incluido resultante se cortó en láminas con un espesor de 10 μ m con un criomicrotomo (Leica Microsystems GmbH) para preparar una sección de tejido mandibular.

b) Desarrollo de la proteína DC-STAMP con inmunotinción

La sección de tejido mandibular preparada en a) se secó al aire para eliminar la humedad y se hizo reaccionar con metanol que contenía 0,3% de peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente durante 30 minutos para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. La sección se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato (a temperatura ambiente durante 5 minutos cada vez) y se bloqueó con solución salina tamponada con fosfato que contenía 10% de suero de burro a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eliminar la solución de bloqueo, la sección se sumergió en solución salina tamponada con fosfato (con 2% de suero de burro) que contenía el anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP de ratón de conejo (10 μ g/ml), que se preparó en el Ejemplo 1, y se dejó reaccionar a en una cámara húmeda a 4 °C durante la noche. Como control negativo se proporcionó un anticuerpo IgG (de DAKO Japan Co., Ltd.) de un conejo no inmunizado y se sometió al mismo procedimiento. La sección se lavó después tres veces con solución salina tamponada con fosfato (a temperatura ambiente durante 5 minutos cada vez) y se hizo reaccionar con una dilución por 200 con solución salina tamponada con fosfato del anticuerpo IgG anti-conejo de burro biotinilado (de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) usado como anticuerpo secundario

a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato (a temperatura ambiente durante 5 minutos cada vez) y hizo reaccionar con una dilución por 300 con agua destilada de un conjugado de peroxidada-estreptavidina marcada (de DAKO Japan Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato (a temperatura ambiente durante 5 minutos cada vez) y se sometió a reacción de tinción usando un kit de sustrato DAN (de Vector Laboratories Inc.) de acuerdo con el protocolo proporcionado. Como resultado, se observó que el tejido mandibular que había reaccionado con el anticuerpo anti-DC-STAMP se había teñido intensamente solo en los osteoclastos, lo que demostró que la DC-STAMP se había expresado en osteoclastos derivados de tejido mandibular de ratón neonato. Por el contrario, ninguna de las células se había teñido cuando se usó el anticuerpo del control negativo.

10 **[Ejemplo 4]**

Supresión de la diferenciación de las células RAW-D en osteoclastos usando ARNsi

a) Preparación de ARNsi contra el gen de DC-STAMP murina

15 Los ARNsi de DC-STAMP murina con dos unidades de uridina (UU) añadidas a los respectivos extremos 3' de las ccadenas sentido y antisentido se prepararon mediante transcripción usando un kit Silencer siRNA Construction (de Ambion Inc.) de acuerdo con el protocolo proporcionado. Los conjuntos de oligoADN moldes necesarios para la preparación de los ARNsi se describen más adelante.

En primer lugar, un ARNsi en el lado 5' (correspondiente a la 7ª región transmembranal en la secuencia de aminoácidos predica a partir de la secuencia de ADNm de DC-STAMP humana) del tercer exón y se preparó un ARNsi variante del mismo usando las siguientes respectivas combinaciones de los oligoADN moldes.

20 Moldes de ARNsi nº 135:

5'-aatactagga ttgtgtctt ccctgtctc-3' (mDC-STAMP-#135-AS; SEC ID Nº: 16 en el listado de secuencias)

y

5'-aagaagacaa caatcctagt acctgtctc-3' (mDC-STAMP-#135-S; SEC ID Nº 17 en el listado de secuencias)

Moldes de la variante de ARNsi #135:

25 5'-aatactagga gcgtgtctt ccctgtctc-3' (mDC-STAMP-#135-Mut-AS; SEC ID Nº: 18 en el Listado de secuencias, donde t ha mutado a g en la posición del nucleótido 11, y t ha mutado a c en la posición del nucleótido 12)

y

5'-aagaagacaa cgctcctagt acctgtctc-3' (mDC-STAMP-#135-Mut-S; SEC ID Nº 19 en el Listado de secuencias, donde a ha mutado a g en la posición del nucleótido 12, y a ha mutado a c en la posición del nucleótido 13)

30 En segundo lugar, un ARNsi para la porción de la secuencia de ADNc característica de la DC-STAMP murina, que se localiza en el lado 3' del ARNsi anterior (nº 135) en el tercer exón y se preparó un ARNsi variante del mismo usando las siguientes respectivas combinaciones de los oligoADN moldes.

Moldes de ARNsi *6:

5'-aattctcgtg tcagtctctt tcctgtctc-3' (mDC-STAMP-*6-AS; SEC ID Nº: 20 en el listado de secuencias)

35 y

5'-aaaaggagac tgacacgaga acctgtctc-3' (mDC-STAMP-*6-S; SEC ID Nº: 21 en el listado de secuencias)

Moldes de la variante de ARNsi* 6:

5'-aattctcgtg ccagtctctt tcctgtctc-3' (mDC-STAMP-*6-Mut-AS; SEC ID Nº 22 en el Listado de secuencias, donde g ha mutado a a en la posición del nucleótido 9, y t ha mutado a c en la posición del nucleótido 10)

40 y

5'-aaaaggagac tggtaggaga acctgtctc-3' (mDC-STAMP-*6-Mut-S; SEC ID Nº: 19 en el Listado de secuencias, donde a ha mutado a g en la posición del nucleótido 13, y c ha mutado a t en la posición del nucleótido 14)

b) Supresión de la diferenciación de las células RAW-D en osteoclastos usando ARNsi

45 Se prepararon células RAW-D a $4,5 \times 10^4$ células/ml en medio α -MEM con 10% de suero bovino fetal. La preparación se sembró en placa de 96 pocillos a 80 μ l/pocillo. Al día siguiente, el medio se sustituyó con 80 μ l de medio OPTI-MEM I (de Invitrogen Corporation) al que se había añadido ARNsi de SC-STAMP o ARNsi variante

preparado en a) hasta una concentración final de 0,1, 1 o 5 nM, y las células se transfectaron usando un reactivo de transfección, siPORT Lipid (from Ambion Inc.) de acuerdo con el protocolo proporcionado (20 µl añadidos). También se proporcionó un control (simulado) sin ARNsi pero con el reactivo de transcripción. Las células se transfectaron en un incubador de CO₂ durante 4 horas y, después, se añadió lo siguiente: 100 µl de medio α-MEM con el RANKL humano (de PeproTech Inc.) a 40 ng/ml, el TNF-α humano (de PeproTech Inc.) a 2 ng/ml y 20% de suero bovino fetal. Las células se cultivaron durante 3 días y después se tiñeron por TRAP con un kit de fosfatasa ácida de leucocitos (de Sigma Co.) de acuerdo con el protocolo proporcionado para contar el número de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP formados a partir de las células. El ARNsi n° 135 de DC-STAMP a concentraciones de 0.1, 1 or 5 nM se observó que suprimía significativamente la formación de osteoclastos, este no fue el caso cuando se añadió la variante de ARNsi n° 135. La variante de ARNsi a una concentración de 5 nM se observó que suprimía ligeramente la formación de osteoclastos, pero no la supresión de formación osteoclástica a una concentración de 0,1 o 1 nM. A partir de los resultados, el ARNsi de DC-STAMP suprimió la formación de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP que se indujo en células RAW-D por RANKL and TNF-α dependiendo de su concentración, en contraste con el control simulado (nivel de ARNsi = 0 nM) y un control negativo, es decir el ARNsi variante (Figuras 5A y 5B). Como se ha descrito anteriormente, cuando se suprimió la expresión del gen de DC-STAMP mediante ARNsi, se suprimió la diferenciación de las células RAW-D en osteoclastos, lo que sugirió que la DC-STAMP es un factor esencial para la diferenciación en osteoclastos.

[Ejemplo de referencia 5]

Asilamiento de un clon de ADNc en el marco de lectura abierto (ORF) para DC-STAMP murina

a) Extracción de ARN total de RAW-D

Se prepararon células RAW-D a 7×10^4 células/ml en medio α-MEM con 10% de suero bovino fetal. La preparación se sembró en placa de 24 pocillos a 500 µl/pocillo y se añadieron los siguientes: RANKL humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 20 ng/ml, TNF-α humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 2 ng/ml y MIP-1α murino (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 1 ng/ml y después se cultivaron durante 3 días.

Después, el ARN total se extrajo de RAW-D usando reactivo de extracción de ARN total (Reactivor TRIzol reagent de Invitrogen Corporation) de acuerdo con el protocolo proporcionado. El ARN total recuperado se conservó a -80°C.

b) Síntesis de la primera hebra de ADNc

El ARN total (1 µg) y 1 µl del cebador oligo(dT) 18 (0,5 µg/µl) se añadió a H₂O para llegar a una solución de 11 µl, que después se calentó a 70°C durante 10 minutos y se conservó a 4°C. A la solución se añadió: 4 µl de 5 × tampón de primera hebra (de Invitrogen Corporation), 1 µl de dNTP 10 mM, 2 µl de ditiotreitól 0,1 M, 1 µl de transcriptasa inversa Superscript II (200 U/µl de Invitrogen Corporation), y 1 µl de H₂O hasta un total de 20 µl, que sometió la reacción a 42° C durante 1 hora, después se calentó a 70° C durante 10 minutos y se conservó a 4° C.

c) Reacción de PCR

Los oligonucleótidos, como cebadores para amplificar los ADNc del ORF de la DC-STAMP murina y la DC-STAMP ΔT7 murina mediante PCR y con las secuencias

5'-tttgtcgaca tggagctctg gacctgggc accagtattt t-3' (mDC-STAMP-cDNA-F: SEC ID N° 24 en el listado de secuencias)

y

5'-tttgccggccg ctcatagatc atcttcattt gcagggattg t-3' (mDC-STAMP-cDNA-R: SEC ID N° 25 en el listado de secuencias)

se sintetizaron del modo habitual. Esta combinación de cebadores se usó para PCR, que se realizó en las condiciones que se describen a continuación usando un ciclador térmico (GeneAmp PCR System 9700). A agua redestilada se añadieron cebadores (concentración fina del 1,0 µM cada uno), 5 µl de 10 × tampón Pyrobest PCR (de Takara Shuzo Co., Ltd.), 4 µl de dNTP 2,5 mM y 1 µl de ADNc (preparado en b)) para hacer una solución de 50 µl. Además, se añadieron 0.5 µl de una ADN polimerasa Pyrobest (5 U/µl) (de Takara Shuzo Co., Ltd.) para hacer la solución de reacción. La solución de reacción se calentó a 94 °C durante 2 minutos, se trató repetidamente 30 veces con un ciclo de temperatura de 94 °C durante 0,5 minutos, 60 °C durante 0,5 minutos y 72 °C durante 5 minutos, después se calentó a 72°C durante 10 minutos y se conservó a 4 °C.

d) Clonación en el vector pCI-neo

Toda la reacción de PCR obtenida en c) se purificó usando el kit de purificación QIAquick PCR Purification (de Qiagen Inc.) de acuerdo con el protocolo proporcionado. El fragmento resultante se digirió con las enzimas de restricción Sall and NotI, se ligó en pCI-neo (de Promega Corporation) digerido preliminarmente también con Sall y NotI usando un kit de unión de ADN Ver. 1 (DE Takara Shuzo Co., Ltd.), y se transformó en *E. coli* XL1-Blue MRF'

(de Stratagene Corporation). Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pCI-neo-murine DC-STAMP se aislaron de las colonias de *E. coli* obtenidas de este modo.

El análisis de toda la secuencia de nucleótidos del ADNc del ORF insertado en el plásmido resultante usando un secuenciador de ADN (ABI Prism 310 DNA sequencer de Applied Biosystems Division, PerkinElmer Japan Co., Ltd.) reveló que la secuencia era una secuencia mostrada en la SEC ID N°: 26 en el listado de secuencias. Esta Secuencia de nucleótidos era idéntica a la región de codificación en el ORF en la secuencia registrada como "DC-STAMP murina" (N° de acceso AB 109560) en la base de datos del NCBI GenBank, y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 27 en el listado de secuencias) codificada por la secuencia de nucleótidos era 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la DC-STAMP murina.

10 [Ejemplo de referencia 6]

Efecto de la sobreexpresión de la proteína DC-STAMP murina sobre la diferenciación de las células RAW-D en osteoclastos

En el plásmido pCI-neo-murine DC-STAMP obtenido en el Ejemplo de referencia 5, la secuencia del marco de lectura abierto para la DC-STAMP está integrada bajo el control del promotor de CMV derivado de pCI-neo. Por tanto, la transferencia del plásmido a la huésped puede inducir la expresión de la proteína DC-STAMP murina.

La transferencia génica (transfección transitoria) de este plásmido de expresión en RAW-D se llevó a cabo mediante el procedimiento de DEAE-dextrano.

El vector pCI-neo-murine DC-STAMP (3 µg) o un vector pCI-neo (3 µg) sin ningún inserto de ADN se combinó con una mezcla de 50 µl de solución DEAE-dextrano (de Promega Corporation) a 10 mg/ml y 950 µl de OPTI-MEMI (de Invitrogen Corporation) para elaborar una solución de transcripción.

Las células RAW-D ($3,0 \times 10^6$ células) se lavaron (centrifugaron a $200 \times g$ durante 5 minutos) dos veces con α -MEM sin suero (10 ml) y se suspendieron en la solución de transfección (1 ml) descrita anteriormente. La suspensión se mantuvo a una temperatura constante en un incubador de CO₂ (a 37° C) durante 30 minutos, se lavó (se centrifugó a $200 \times g$ durante 5 minutos) una vez con α -MEM sin suero (10 ml) y se lavó además una vez con α -MEM que contiene 5% de suero bovino fetal (10 ml). El lavado suspendido se centrifugó a $200 \times g$ durante 10 minutos para precipitar las células, que después se resuspendieron en α -MEM que contiene 10% de suero bovino fetal (2 ml). La densidad celular se midió con un hemocitómetro y se ajustó a $4,5 \times 10^4$ células/ml. La suspensión resultante se sembró en placa de 96 pocillos a 0,15 ml/pocillo y se añadieron los siguientes: RANKL humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 20 ng/ml y TNF- α humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 1 ng/ml o, como alternativa, no se añadieron ninguno de estos. Las células se cultivaron durante 3 días y después se tiñeron por TRAP con un kit de fosfatasa ácida de leucocitos (de Sigma Co.) de acuerdo con el protocolo proporcionado para contar el número de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP formados a partir de ellas. Como resultado, en ausencia de RANKL y TNF- α , no se formaron osteoclastos multinucleares positivos para TRAP, incluso cuando la proteína DC-STAMP murina se había sobreexpresado pero, en presencia de RANKL y TNF- α , la sobreexpresión de la proteína DC-STAMP murina potenció significativamente la formación de los osteoclastos multinucleares positivos para TRAP en comparación con el control, es decir cuando se transfeció las células RAW-D con el vector pCI-neo sin el inserto de ADN (Figura 6). En consecuencia se sugirió que la DC-STAMP era un factor de potenciación de la diferenciación en osteoclastos.

[Ejemplo 5]

40 **Efecto de la adición del anticuerpo policlonal DC-STAMP anti-murina sobre la diferenciación de las células RAW-D en osteoclastos**

El anticuerpo policlonal DC-STAMP anti-murino de conejo preparado en el ejemplo 1 se usó para examinar su efecto sobre la diferenciación de las células RAW-D en osteoclastos

Se prepararon células RAW-D a $4,5 \times 10^4$ células/ml en medio α -MEM con 10% de suero bovino fetal. La suspensión se sembró en placa de 96 pocillos a 150 µl/pocillo y se añadieron los siguientes: RANKL humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 20 ng/ml y TNF- α humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 1 ng/ml. Al sobrenadante del cultivo celular se añadieron el anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino de conejo preparado en el ejemplo 1 se añadió hasta una concentración final de 0, 5, 10 o 20 µg/ml. Las células se cultivaron durante 3 días y después se tiñeron por TRAP con un kit de fosfatasa ácida de leucocitos (de Sigma Co.) de acuerdo con el protocolo proporcionado para contar el número de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP formados a partir de ellas. Como resultado, la formación de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP se suprimió mediante la adición del anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino de conejo de un modo dependiente de la dosis (Figura 7). La adición del anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino a un nivel de 10 µg/ml o más suprimió significativamente la formación de los osteoclastos en comparación con lo que ocurría cuando se se añadía anticuerpo.

Los resultados indican que el anticuerpo potencialmente capaz de unirse específicamente a DC-STAMP and DC-

STAMP Δ T7 suprimió la formación de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP de RAW-D, y, por tanto, se sugirió que DC-STAMP and DC-STAMP Δ T7 eran muy importantes en la diferenciación de los osteoclastos.

[Ejemplo 6]

Efecto de la adición del anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino sobre la diferenciación de células de cultivo primario de médula ósea murina en osteoclastos

Se sacrificó a un ratón DDY macho de 6 semanas de edad mediante dislocación cervical con anestesia con éter para extraer el fémur y la tibia. Se rasparon los tejidos blandos del fémur y la tibia y se cortaron los extremos, respectivamente. Se infundió medio α -MEM sin suero en la médula ósea usando una jeringa con una aguja de calibre 25 para obtener células de médula ósea. Se contó el número de células y las células se prepararon a 2×10^6 células/ml en medio α -MEM con 15% de suero bovino fetal. La suspensión celular se sembró en una placa de 24 pocillos a 500 μ l/pocillo y se activó, se añadió vitamina D₃ (de Biomol Corporation) hasta una concentración final de 1×10^{-8} M. Al sobrenadante del cultivo celular se añadió en anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino de conejo preparado en el Ejemplo 1 hasta una concentración final de 0, 5, 10 o 20 μ g/ml. Las células se cultivaron durante 6 días y después se tiñeron por TRAP con un kit de fosfatasa ácida de leucocitos (de Sigma Co.) de acuerdo con el protocolo proporcionado para contar el número de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP formados a partir de ellas. Como resultado, la formación de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP se suprimió mediante la adición del anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino de conejo de un modo dependiente de la dosis (Figura 8). La adición del anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino a un nivel de 5 μ g/ml o 20 μ g/ml suprimió significativamente la formación de los osteoclastos en comparación con lo que ocurría cuando se se añadía anticuerpo. Los resultados indican que el anticuerpo potencialmente capaz de unirse específicamente a DC-STAMP and DC-STAMP Δ T7 suprimió la formación de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP de células de médula ósea murina y se ha demostrado que DC-STAMP y DC-STAMP Δ T7 están implicadas en la diferenciación de las células de cultivo primario, que son más análogas a las del cuerpo humano, así como de cepas celulares tales como RAW-D en osteoclastos.

[Ejemplo 7]

Efecto de la adición del anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino sobre la formación del hoyo de resorción ósea

Cuando las células derivadas de fémur y tibia murinos se cultivan en la sección de marfil en presencia de vitamina D₃, activada se observa que los osteoclastos erosionan a superficie del marfil formando muchos hoyos de resorción ósea ampliamente distribuidos (Takada et al., Bone and Mineral, 17, 347-359 (1992)).

Se sacrificó a un ratón ICR de 14 DÍAS de edad (de cualquier sexo) mediante dislocación cervical con anestesia con éter para extraer el fémur y la tibia. Se rasparon los tejidos blandos del fémur y la tibia y se trituraron finamente usando tijeras en una placa de 60 mm de diámetro que contiene 1 mg de medio DMEM con 10% de suero bovino fetal. La muestras triturada se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 ml, al que se añadió 10 ml de medio DEMEM que contiene 1% de suero bovino fetal, agitado durante 30 segundos en un mezclador de tipo vórtex (de M & S Instruments Inc.) y se dejaron reposar durante 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se recontó el número de células. Se preparó una suspensión celular 1×10^7 células/ml en medio α -MEM con 10% de suero bovino fetal. La suspensión se sembró en placas de 96 pocillos a 100 μ l/pocillo sobre la que se colocaron secciones de marfil de 150-200 μ m de espesor y 6 mm de diámetros (preparada en Kureha Chemical Industry Co., Ltd.) y se cultivaron durante 4 horas en un incubador de CO₂. Después, el medio se sustituyó por 200 μ l de medio DMEM con 10% de suero bovino fetal, al que se añadió vitamina D₃ activada, a una concentración final de 1×10^{-8} M (también se proporciona un grupo sin vitamina). Al sobrenadante del cultivo celular se añadieron el anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino de conejo preparado en el ejemplo 1 se añadió hasta una concentración final de 0, 2, 6 o 20 μ g/ml. Las células se cultivaron durante 4 días. Después de terminado el cultivo, el sobrenadante del cultivo se extrajo de la placa que contiene los marfiles. La placa se lavó una vez con agua destilada y se añadió otra porción de agua destilada. Las células unidas a cada sección de marfil se eliminan con un cepillo de pulido (de Tagaya Seisakusho Co., Ltd.) conectado a un motor manual (de Tokyo Nakai Co., Ltd.). La sección de marfil se lavó dos veces con agua destilada, se tiñó con solución de hematoxilina ácida (de Sigma Co.) durante 13 minutos sobre los hoyos formados sobre su superficie y se lavó dos veces con agua destilada. La sección de marfil se invirtió y se midió el área de los hoyos microscópicamente. Para medir el área total de los hoyos, se usó un micrómetro (10 x 10 cuadrados) unido a la lente óptica del microscopio para contar el número total de cuadrados (mallas) donde se localizaban los hoyos y se convertían en el número del área de hoyo. Como resultado, la adición de vitamina D₃ activada inducía la formación de muchos hoyos sobre la sección de marfil, pero cuando se añadió el anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino se añadió al mismo tiempo, el anticuerpo suprimió la formación de hoyos de un modo dependiente de la dosis (Figura 9). Los resultados indican que el anticuerpo potencialmente capaz de unirse específicamente a DC-STAMP y DC-STAMP Δ T7 suprimió la formación de hoyos inducida por los osteoclastos de fémur y tibia y, por tanto, se sugirió que DC-STAMP y DC-STAMP Δ T7 también estaban implicadas en la regulación de la resorción ósea por los osteoclastos.

[Ejemplo de referencia 7]

Expresión del gen de DC-STAMP en tejido tumoral de células gigantes

El tumor de células gigantes (TCG) es un tumor óseo que se caracteriza por destrucción ósea osteolítica como síntoma clínico, en el que se producen un gran número de células gigantes osteoclasticas histológicamente (Bullough et al., Atlas of Orthopedic Pathology 2nd edition, 17.6-17.8, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1992)) La sonda EST (Affymetrix Genechip HG-U133 sonda 221266_s_at, fabricada por Affymetrix), que tiene una secuencia de nucleótidos que solapa parcialmente con el gen de la DC-STAMP humana, se analizó para determinar el perfil de expresión en tejidos de TCG usando las bases de datos (Genesis 2003 Release 2.0) de GeneLogic Las sondas EST para RANK (Affymetrix Genechip HG-U133 sonda 207037_at, fabricada por Affymetrix) y RANKL (Affymetrix Genechip HG-U133 sonda 210643_at, fabricada por Affymetrix) que desempeñan un papel en la diferenciación en osteoclastos, y para catepsina K (Affymetrix Genechip HG-U133 sonda 202450_s_at, fabricada por Affymetrix) y TRAP (Affymetrix Genechip HG-U133 sonda 204638_at, fabricada por Affymetrix) que son marcadores de diferenciación en osteoclastos, también se analizaron para determinar el perfil de expresión en tejidos de TCG.

Se realizó una comparación de los niveles de expresión entre 9 casos de tejidos óseos sanos, 14 casos de tejidos de TCG y 10 casos de tejidos de tumores óseos distintos a TCG: esto reveló que los tejidos de TCG tenían específicamente un nivel de transcripción de RANK y RANKL mayor que los tejidos óseos sanos (Figura 10A). Por el contrario, los tejidos tumorales óseos que no son TCG, que no siempre potencian la resorción ósea, tenían un nivel de transcripción de RANK y RANKL significativamente menor que los TCG y un nivel de expresión comparable al de los tejidos óseos sanos. De acuerdo con lo anterior, se sugirió que los TCG proporcionaban un ambiente que podía potenciar la formación y la activación de los osteoclastos. La comparación de los niveles de expresión de catepsina K y TRAP reveló que la transcripción de estos factores era significativamente mayor en los TCG (Figure 10B), lo que sugirió que muchos osteoclastos de resorción ósea podrían aparecer en los TCG. Una comparación similar del nivel de expresión de DC-STAMP reveló que la DC-STAMP se transcribía específicamente a un nivel mayor en los TCG que RANK, RANKL, catepsina K y TRAP (Figura 11). A partir de estos hallazgos se sugirió que la DC-STAMP está implicada también en afecciones humanas, tales como el TCG, que aumentan la resorción ósea.

[Ejemplo 8]

Efecto de la adición del anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino sobre la formación de osteoclastos humanos

Cuando se estimulan células mononucleares de sangre periférica humana (HPBMC) con RANKL en presencia de M-CSF y dexametasona, se forman osteoclastos multinucleares positivos para TRAP (Matsuzaki et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1998) 246, 199-204). Las HPBMC adquiridas en Takara Bio Inc se prepararon a 5×10^6 células/ml en medio α -MEM con 10% de suero bovino fetal. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 100 μ l/pocillo y a las que se añadieron un medio que contenía M-CSF humano (de R & D Systems Inc.) hasta una concentración final de 200 ng/ml, dexametasona (de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) hasta una concentración final de 1×10^{-7} M y RANKL humano (de PeproTech Inc.) hasta una concentración final de 100 ng/ml a 200 μ l/pocillo. También se proporcionó un grupo no RANKL de suspensiones celulares. Al sobrenadante del cultivo celular se añadieron el anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino de conejo preparado en el ejemplo 1 se añadió hasta una concentración final de 0, 2 o 6 μ g/ml. Después de iniciar el cultivo, los días 4, 7 y 11, el medio se sustituyó y se añadió una muestra de ensayo y, el día 13, las células se tiñeron para TRAP con el kit de fosfatasa ácida de leucocitos (de Sigma Co.) de acuerdo con el protocolo proporcionado para contar el número de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP formados. Como resultado, se formó un gran número de osteoclastos mediante estimulación con RANKL, pero la adición del anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP murino suprimió la formación de osteoclastos multinucleares positivos para TRAP formados de *un modo dependiente de la dosis* (Figura 12). Los resultados indican que el anticuerpo anti-DC-STAMP murino suprimió la formación de los osteoclastos multinucleares positivos para TRAP de HPBMC y, por tanto, se sugirió fuertemente que la DC-STAMP estaba implicada en la diferenciación en osteoclastos en seres humanos, así como en ratones.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, las composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de trastornos óseos metabólicos se pueden obtener mediante el mecanismo de acción de inhibición de la actividad osteoclastica.

Texto libre del listado de secuencias

SEC ID N° 15 - descripción de la secuencia artificial: péptido parcial sintético de la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 16 - descripción de la secuencia artificial: molde de ADN1 para la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 17 - descripción de la secuencia artificial: molde de ADN2 para la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 18 - descripción de la secuencia artificial: molde de ADN3 para la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 19 - descripción de la secuencia artificial: molde de ADN4 para la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 20 - descripción de la secuencia artificial: molde de ADN5 para la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 21 - descripción de la secuencia artificial: molde de ADN6 para la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 22 - descripción de la secuencia artificial: molde de ADN7 para la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 23 - descripción de la secuencia artificial: molde de ADN8 para la DC-STAMP murina

SEC ID N° 24 - descripción de la secuencia artificial: cebador directo para PCR para la DC-STAMP murina
 SEC ID N° 25 - descripción de la secuencia artificial: cebador inverso para PCR para la DC-STAMP murina

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> SANKYO COMPANY, LIMITED
- <120> Anticuerpo dirigido contra la proteína asociada a los osteoclastos
- <130> EPP92428
- <140> 05710273.3
- <141> 2005-02-09
- 10 <150> JP2004-035216
- <151> 2004-02-12
- <160> 27
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 15 <211> 1952
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (50)..(1462)
- <223> Inventor: Nomiya, Hisayuki; Kukita, Toshio; Hiruma, Yoshiharu
- <400> 1

```
gcatttctgc attcgaagaa gaatctgaga gaaacctgac gcagggagc atg ggt atc      58
                                     Met Gly Ile
                                     1
```

```
tgg acc tca ggc act gat atc ttc cta agt ctt tgg gag att tac gtg      106
Trp Thr Ser Gly Thr Asp Ile Phe Leu Ser Leu Trp Glu Ile Tyr Val
      5              10              15
```

ES 2 428 791 T3

tct cca aga agc ccc gga tgg atg gac ttt atc cag cat ttg gga gtt	154
Ser Pro Arg Ser Pro Gly Trp Met Asp Phe Ile Gln His Leu Gly Val	
20 25 30 35	
tgc tgt ttg gtt gct ctt att tca gtg ggc ctc ctg tct gtg gcc gcc	202
Cys Cys Leu Val Ala Leu Ile Ser Val Gly Leu Leu Ser Val Ala Ala	
40 45 50	
tgc tgg ttt ctg cca tca atc ata gcg gcc gct gcc tcc tgg att atc	250
Cys Trp Phe Leu Pro Ser Ile Ile Ala Ala Ala Ala Ser Trp Ile Ile	
55 60 65	
acg tgt gtt ctg ctg tgt tgc tcc aag cat gca cga tgt ttt att ctt	298
Thr Cys Val Leu Leu Cys Cys Ser Lys His Ala Arg Cys Phe Ile Leu	
70 75 80	
ctt gtc ttt ctc tct tgt ggc ctg cgt gaa ggc agg aat gct ttg att	346
Leu Val Phe Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ala Leu Ile	
85 90 95	
gca gct ggc aca ggg atc gtc atc ttg gga cac gta gaa aat att ttt	394
Ala Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Leu Gly His Val Glu Asn Ile Phe	
100 105 110 115	
cac aac ttt aaa ggt ctc cta gat ggt atg act tgc aac cta agg gca	442
His Asn Phe Lys Gly Leu Leu Asp Gly Met Thr Cys Asn Leu Arg Ala	
120 125 130	
aag agc ttt tcc ata cat ttt cca ctt ttg aaa aaa tat att gag gca	490
Lys Ser Phe Ser Ile His Phe Pro Leu Leu Lys Lys Tyr Ile Glu Ala	
135 140 145	
att cag tgg att tat ggc ctt gcc act cca cta agt gta ttt gat gac	538
Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Ser Val Phe Asp Asp	
150 155 160	

ES 2 428 791 T3

ctt gtt tct tgg aac cag acc ctg gca gtc tct ctt ttc agt ccc agc	586
Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Ala Val Ser Leu Phe Ser Pro Ser	
165 170 175	
cat gtc ctg gag gca cag cta aat gac agc aaa ggg gaa gtc ctg agc	634
His Val Leu Glu Ala Gln Leu Asn Asp Ser Lys Gly Glu Val Leu Ser	
180 185 190 195	
gtc ttg tac cag atg gca aca acc aca gag gtg ttg tcc tcc ctg ggt	682
Val Leu Tyr Gln Met Ala Thr Thr Thr Glu Val Leu Ser Ser Leu Gly	
200 205 210	
cag aag cta ctt gcc ttt gca ggg ctt tcg ctc gtc ctg ctt ggc act	730
Gln Lys Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Ser Leu Val Leu Leu Gly Thr	
215 220 225	
ggc ctc ttc atg aag cga ttt ttg ggc cct tgt ggt tgg aag tat gaa	778
Gly Leu Phe Met Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp Lys Tyr Glu	
230 235 240	
aac atc tac atc acc aga caa ttt gtt cag ttt gat gaa agg gag aga	826
Asn Ile Tyr Ile Thr Arg Gln Phe Val Gln Phe Asp Glu Arg Glu Arg	
245 250 255	
cat caa cag agg ccc tgt gtg ctc ccg ctg aat aag gag gaa agg agg	874
His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Glu Glu Arg Arg	
260 265 270 275	
aag tat gtc atc atc ccg act ttc tgg ccg act cct aaa gaa agg aaa	922
Lys Tyr Val Ile Ile Pro Thr Phe Trp Pro Thr Pro Lys Glu Arg Lys	
280 285 290	
aac ctg ggg ctg ttt ttc ctc ccc ata ctt atc cat ctc tgc atc tgg	970
Asn Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Ile Leu Ile His Leu Cys Ile Trp	
295 300 305	

ES 2 428 791 T3

gtg ctg ttt gca gct gta gat tat ctg ctg tat cgg ctc att ttc tca	1018
Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu Ile Phe Ser	
310 315 320	
gtg agc aag cag ttt caa agc ttg cca ggg ttt gag gtt cac ttg aaa	1066
Val Ser Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Phe Glu Val His Leu Lys	
325 330 335	
ctg cac gga gag aaa caa gga act caa gat att atc cat gat tct tcc	1114
Leu His Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Asp Ile Ile His Asp Ser Ser	
340 345 350 355	
ttt aat ata tct gtg ttt gaa ccc aac tgt atc cca aaa cca aaa ttc	1162
Phe Asn Ile Ser Val Phe Glu Pro Asn Cys Ile Pro Lys Pro Lys Phe	
360 365 370	
ctt cta tct gag acc tgg gtt cct ctc agt gtt att ctt ttg ata tta	1210
Leu Leu Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Val Ile Leu Leu Ile Leu	
375 380 385	
gtg atg ctg gga ctg ttg tcc tct atc ctt atg caa ctt aaa atc ctg	1258
Val Met Leu Gly Leu Leu Ser Ser Ile Leu Met Gln Leu Lys Ile Leu	
390 395 400	
gtg tca gca tct ttc tac ccc agc gtg gag agg aag cgc atc caa tat	1306
Val Ser Ala Ser Phe Tyr Pro Ser Val Glu Arg Lys Arg Ile Gln Tyr	
405 410 415	
ctg cat gca aag ctg ctt aaa aaa aga tca aag cag ccg ctg gga gaa	1354
Leu His Ala Lys Leu Leu Lys Lys Arg Ser Lys Gln Pro Leu Gly Glu	
420 425 430 435	
gtc aaa aga cgg ctg agt ctc tat ctt aca aag att cat ttc tgg ctt	1402
Val Lys Arg Arg Leu Ser Leu Tyr Leu Thr Lys Ile His Phe Trp Leu	
440 445 450	

ES 2 428 791 T3

cca gtc ctg aaa atg att agg aag aag caa atg gac atg gca agt gca 1450
 Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Met Asp Met Ala Ser Ala
 455 460 465

gac aag tca tga gagaccccgga ctactcctca gccacatcgc accaacaatt 1502
 Asp Lys Ser
 470

ctcttcaggt ctaggatggc agtcactatt catgccggat aatagagaac tatgtgacgc 1562

agtcctctca ggagtctgag tttacagagc caacttgacg cacctgggta tgccctcctt 1622

catctcaaag ccaaagagct gccaggtaaa tggttatgtg gtctatgttc caaacaacc 1682

acatgatctt gcctgtgtca caatgtaaca agactctagc tgggtcccct ggtgatgagt 1742

ttcagcatag aataatgttc aaggaaaaga aaacgaaaac agtttaaate tctaccacag 1802

cctcacaagc aatgctaag gggaacatac atgtaaaaag ccagcaaact atcttcaaac 1862

tcttccgtcc ttaatgtctt ccatggctat tgccccacaca atggtctctt ttctccctgc 1922

tccttatta aagaactctt tctgaaaccc 1952

5 <210> 2
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Gly Ile Trp Thr Ser Gly Thr Asp Ile Phe Leu Ser Leu Trp Glu
 1 5 10 15

ES 2 428 791 T3

Ile Tyr Val Ser Pro Arg Ser Pro Gly Trp Met Asp Phe Ile Gln His
20 25 30

Leu Gly Val Cys Cys Leu Val Ala Leu Ile Ser Val Gly Leu Leu Ser
35 40 45

Val Ala Ala Cys Trp Phe Leu Pro Ser Ile Ile Ala Ala Ala Ala Ser
50 55 60

Trp Ile Ile Thr Cys Val Leu Leu Cys Cys Ser Lys His Ala Arg Cys
65 70 75 80

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

Ala Leu Ile Ala Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Leu Gly His Val Glu
100 105 110

Asn Ile Phe His Asn Phe Lys Gly Leu Leu Asp Gly Met Thr Cys Asn
115 120 125

Leu Arg Ala Lys Ser Phe Ser Ile His Phe Pro Leu Leu Lys Lys Tyr
130 135 140

Ile Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Ser Val
145 150 155 160

ES 2 428 791 T3

Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Ala Val Ser Leu Phe
165 170 175

Ser Pro Ser His Val Leu Glu Ala Gln Leu Asn Asp Ser Lys Gly Glu
180 185 190

Val Leu Ser Val Leu Tyr Gln Met Ala Thr Thr Thr Glu Val Leu Ser
195 200 205

Ser Leu Gly Gln Lys Leu Leu Ala Phe Ala Gly Leu Ser Leu Val Leu
210 215 220

Leu Gly Thr Gly Leu Phe Met Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp
225 230 235 240

Lys Tyr Glu Asn Ile Tyr Ile Thr Arg Gln Phe Val Gln Phe Asp Glu
245 250 255

Arg Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Glu
260 265 270

Glu Arg Arg Lys Tyr Val Ile Ile Pro Thr Phe Trp Pro Thr Pro Lys
275 280 285

Glu Arg Lys Asn Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Ile Leu Ile His Leu
290 295 300

ES 2 428 791 T3

Cys Ile Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu
 305 310 315 320

Ile Phe Ser Val Ser Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Phe Glu Val
 325 330 335

His Leu Lys Leu His Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Asp Ile Ile His
 340 345 350

Asp Ser Ser Phe Asn Ile Ser Val Phe Glu Pro Asn Cys Ile Pro Lys
 355 360 365

Pro Lys Phe Leu Leu Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Val Ile Leu
 370 375 380

Leu Ile Leu Val Met Leu Gly Leu Leu Ser Ser Ile Leu Met Gln Leu
 385 390 395 400

Lys Ile Leu Val Ser Ala Ser Phe Tyr Pro Ser Val Glu Arg Lys Arg
 405 410 415

Ile Gln Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Lys Lys Arg Ser Lys Gln Pro
 420 425 430

Leu Gly Glu Val Lys Arg Arg Leu Ser Leu Tyr Leu Thr Lys Ile His
 435 440 445

ES 2 428 791 T3

Phe Trp Leu Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Met Asp Met
 450 455 460

Ala Ser Ala Asp Lys Ser
 465 470

5 <210> 3
 <211> 1993
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (50).. (1462)
 10 <223>
 <400> 3

gtgctttgtg cttgtggagg aacctagcg gaacttagac acagggaga atg agg ctc 58
 Met Arg Leu
 1

tgg acc ttg ggc acc agt att ttc ctg agg ctt tgg ggg act tat gtg 106
 Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly Thr Tyr Val
 5 10 15

ttt cca cga agc cct agc tgg ctg gac ttc atc cag cat ttg gga gtc 154
 Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His Leu Gly Val
 20 25 30 35

tgt tgc ttt gtg gcc ttc ctt tcg gtg agc ctc ttc tct gca gcc ttt 202
 Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser Ala Ala Phe
 40 45 50

15

ES 2 428 791 T3

tac tgg atc ctg cca ccc gtt gcc ctg ctc tct tct gtc tgg atg atc	250
Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val Trp Met Ile	
55 60 65	
acc tgt gtt ttc cta tgc tgt tcc aag cgc gca cga tgc ttc att ctt	298
Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys Phe Ile Leu	
70 75 80	
ctg gcc gtt ctg tcg tgt ggc ctc cgt gaa ggt agg aac gct ttg att	346
Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ala Leu Ile	
85 90 95	
gcg gct ggc act ggg gta gtg atc ttt gga cat gtg gaa aat att ttt	394
Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu Asn Ile Phe	
100 105 110 115	
tat aac ttc aga ggt ctc cta gac agc atg act tgc aac cta agg gca	442
Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn Leu Arg Ala	
120 125 130	
aag agc ttt tca gta cat ttc cca ctt tta aaa cgg tat act gaa gcc	490
Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr Thr Glu Ala	
135 140 145	
atc cag tgg att tac ggc ctt gcc act ccg ctg aat cta ttt gat gac	538
Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu Phe Asp Asp	
150 155 160	
ctt gtt tct tgg aac cag act ctg gtg gtc tct ctt ttt agt ccc agc	586
Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe Ser Pro Ser	
165 170 175	
cat gcc ctg gag gct cat atg aat gac act aga gga gaa gtc ctg gga	634
His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu Val Leu Gly	
180 185 190 195	

ES 2 428 791 T3

. gtc ctg cac cat atg gtg gtc acg aca gag ctg ttg act tcc gtg ggc	682
Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr Ser Val Gly	
200 205 210	
cag aag ttg ctt gcc ctt gcc ggg ctt ctg ctc atc cta gtc agc act	730
Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu Val Ser Thr	
215 220 225	
ggc ctc ttc ctg aag cga ttc ctg ggc cct tgt ggc tgg aag tat gag	778
Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp Lys Tyr Glu	
230 235 240	
aat gtc tac atc acc aaa caa ttt gtt cgg ttt gat gaa aag gag agg	826
Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu Lys Glu Arg	
245 250 255	
cac caa cag cgg ccc tgt gtc ctc ccg ctg aat aag aag gaa agg aag	874
His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys Glu Arg Lys	
260 265 270 275	
aaa tat gtc atc gtc cca tct ttg cag ctg act cct aag gag aag aaa	922
Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys Glu Lys Lys	
280 285 290	
acc ctt ggg ctg ttc ttc ctt cct gtc ctg acc tat ctc tac atg tgg	970
Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu Tyr Met Trp	
295 300 305	
gtg ctg ttt gcc gct gtg gac tat ctg ctg tat cgg ctc atc tcc tcc	1018
Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu Ile Ser Ser	
310 315 320	
atg aac aaa cag ttc caa agc ttg cca ggg ctg gaa gtt cac ttg aaa	1066
Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val His Leu Lys	
325 330 335	

ES 2 428 791 T3

cta cgt gga gag aag caa gga acc caa gga gtc gtc cat gat tct gcc	1114
Leu Arg Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Gly Val Val His Asp Ser Ala	
340 345 350 355	
ttt aat ata tct atg ttt gaa ccg agc tgc att cct aaa cca cgt ctc	1162
Phe Asn Ile Ser Met Phe Glu Pro Ser Cys Ile Pro Lys Pro Arg Leu	
360 365 370	
agt gtg tct gag act tgg gtt cct ctc agt att att ctg tta aca cta	1210
Ser Val Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Ile Ile Leu Leu Thr Leu	
375 380 385	
ata ata cta gga ttg ttg tct tct atg ctg atg cag ctt aaa att ctc	1258
Ile Ile Leu Gly Leu Leu Ser Ser Met Leu Met Gln Leu Lys Ile Leu	
390 395 400	
gtg tca gtc tcc ttc tac ccc aaa gtg gag agg gag aga att gaa tac	1306
Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg Ile Glu Tyr	
405 410 415	
ctg cat gcg aag ctc ctt gag aaa cga tca aag cag cca ttg aga gag	1354
Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro Leu Arg Glu	
420 425 430 435	
gct gac ggg aaa ccg agc ctg tac ttt aaa aag att cat ttc tgg ttt	1402
Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His Phe Trp Phe	
440 445 450	
cca gtc ctg aaa atg att agg aag aag cag aca atc cct gca aat gaa	1450
Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro Ala Asn Glu	
455 460 465	
gat gat cta tga gcaacacagt ccctctttct gggccaactg ctgctttctgt	1502
Asp Asp Leu	
470	

ES 2 428 791 T3

ctactcaaca agagggggct atctgagaag gtctacagat gtttgagttt gcaaggctgc 1562
ctttctcttt ggtgatcctt caagatacat gtcgatcata atgccaaata gccccntaggt 1622
aatagtttc agagtctgtc ttccaaacaa aacacagtat ctaaactgtg tcatagttaa 1682
agctatgggtg atggctggca tggaaatgtc ctccaaaggc ttagatattt gaaaacttgg 1742
tccccagtta gtgcatcttg ggggaggctt ataaggtgtc atgttgctgg acaaagtgtg 1802
actccagagg agtgttttgc agttttaaaa gtcatgtgct actcctgttc actctactca 1862
gcctgtggct ggagatgtgg gctctcagct gtcctgcct ccatgtctgt ctgtaataga 1922
gttcccaact gtgatattga tggagtctta cctctctgaa accttaagcc caaataaatc 1982
cttccttcta t 1993

<210> 4

<211> 470

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

Met Arg Leu Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Val Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His
20 25 30

Leu Gly Val Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser
35 40 45

ES 2 428 791 T3

Ala Ala Phe Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val
 50 55 60

Trp Met Ile Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys
 65 70 75 80

Phe Ile Leu Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn
 85 90 95

Ala Leu Ile Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu
 100 105 110

Asn Ile Phe Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn
 115 120 125

Leu Arg Ala Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr
 130 135 140

Thr Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu
 145 150 155 160

Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe
 165 170 175

Ser Pro Ser His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu
 180 185 190

ES 2 428 791 T3

Val Leu Gly Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr
 195 200 205

Ser Val Gly Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu
 210 215 220

Val Ser Thr Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp
 225 230 235 240

Lys Tyr Glu Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu
 245 250 255

Lys Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys
 260 265 270

Glu Arg Lys Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys
 275 280 285

Glu Lys Lys Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu
 290 295 300

Tyr Met Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu
 305 310 315 320

Ile Ser Ser Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val
 325 330 335

ES 2 428 791 T3

His Leu Lys Leu Arg Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Gly Val Val His
340 345 350

Asp Ser Ala Phe Asn Ile Ser Met Phe Glu Pro Ser Cys Ile Pro Lys
355 360 365

Pro Arg Leu Ser Val Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Ile Ile Leu
370 375 380

Leu Thr Leu Ile Ile Leu Gly Leu Leu Ser Ser Met Leu Met Gln Leu
385 390 395 400

Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg
405 410 415

Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro
420 425 430

Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His
435 440 445

Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro
450 455 460

Ala Asn Glu Asp Asp Leu
465 470

5 <210> 5
<211> 1825
<212> ADN
<213> Mus musculus

ES 2 428 791 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (50).. (1294)
 <223>

5 <400> 5

gtgctttgtg cttgtggagg aacctaagcg gaacttagac acagggaga atg agg ctc 58
 Met Arg Leu
 1

tgg acc ttg ggc acc agt att ttc ctg agg ctt tgg ggg act tat gtg 106
 Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly Thr Tyr Val
 5 10 15

ttt cca cga agc cct agc tgg ctg gac ttc atc cag cat ttg gga gtc 154
 Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His Leu Gly Val
 20 25 30 35

tgt tgc ttt gtg gcc ttc ctt tcg gtg agc ctc ttc tct gca gcc ttt 202
 Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser Ala Ala Phe
 40 45 50

tac tgg atc ctg cca ccc gtt gcc ctg ctc tct tct gtc tgg atg atc 250
 Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val Trp Met Ile
 55 60 65

acc tgt gtt ttc cta tgc tgt tcc aag cgc gca cga tgc ttc att ctt 298
 Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys Phe Ile Leu
 70 75 80

ES 2 428 791 T3

ctg gcc gtt ctg tcg tgt ggc ctc cgt gaa ggt agg aac gct ttg att	346
Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ala Leu Ile	
85 90 95	
gcg gct ggc act ggg gta gtg atc ttt gga cat gtg gaa aat att ttt	394
Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu Asn Ile Phe	
100 105 110 115	
tat aac ttc aga ggt ctc cta gac agc atg act tgc aac cta agg gca	442
Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn Leu Arg Ala	
120 125 130	
aag agc ttt tca gta cat ttc cca ctt tta aaa cgg tat act gaa gcc	490
Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr Thr Glu Ala	
135 140 145	
atc cag tgg att tac ggc ctt gcc act ccg ctg aat cta ttt gat gac	538
Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu Phe Asp Asp	
150 155 160	
ctt gtt tct tgg aac cag act ctg gtg gtc tct ctt ttt agt ccc agc	586
Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe Ser Pro Ser	
165 170 175	
cat gcc ctg gag gct cat atg aat gac act aga gga gaa gtc ctg gga	634
His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu Val Leu Gly	
180 185 190 195	
gtc ctg cac cat atg gtg gtc acg aca gag ctg ttg act tcc gtg ggc	682
Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr Ser Val Gly	
200 205 210	
cag aag ttg ctt gcc ctt gcc ggg ctt ctg ctc atc cta gtc agc act	730
Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu Val Ser Thr	
215 220 225	

ES 2 428 791 T3

ggc ctc ttc ctg aag cga ttc ctg ggc cct tgt ggc tgg aag tat gag	778
Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp Lys Tyr Glu	
230 235 240	
aat gtc tac atc acc aaa caa ttt gtt cgg ttt gat gaa aag gag agg	826
Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu Lys Glu Arg	
245 250 255	
cac caa cag cgg ccc tgt gtc ctc ccg ctg aat aag aag gaa agg aag	874
His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys Glu Arg Lys	
260 265 270 275	
aaa tat gtc atc gtc cca tct ttg cag ctg act cct aag gag aag aaa	922
Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys Glu Lys Lys	
280 285 290	
acc ctt ggg ctg ttc ttc ctt cct gtc ctg acc tat ctc tac atg tgg	970
Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu Tyr Met Trp	
295 300 305	
gtg ctg ttt gcc gct gtg gac tat ctg ctg tat cgg ctc atc tcc tcc	1018
Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu Ile Ser Ser	
310 315 320	
atg aac aaa cag ttc caa agc ttg cca ggg ctg gaa gtt cac ttg aaa	1066
Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val His Leu Lys	
325 330 335	
cta cgt gga gag ctt aaa att ctc gtg tca gtc tcc ttc tac ccc aaa	1114
Leu Arg Gly Glu Leu Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys	
340 345 350 355	
gtg gag agg gag aga att gaa tac ctg cat gcg aag ctc ctt gag aaa	1162
Val Glu Arg Glu Arg Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys	
360 365 370	

ES 2 428 791 T3

cga tca aag cag cca ttg aga gag gct gac ggg aaa ccg agc ctg tac	1210
Arg Ser Lys Gln Pro Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr	
375 380 385	
ttt aaa aag att cat ttc tgg ttt cca gtc ctg aaa atg att agg aag	1258
Phe Lys Lys Ile His Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys	
390 395 400	
aag cag aca atc cct gca aat gaa gat gat cta tga gcaacacagt	1304
Lys Gln Thr Ile Pro Ala Asn Glu Asp Asp Leu	
405 410	
ccctctttct gggccaactg ctgcttctgt ctactcaaca agagggggct atctgagaag	1364
gtctacagat gtttgagttt gcaaggctgc ctttctcttt ggtgatcctt caagatacat	1424
gtcgatcata atgccaaata gccctaggt aaatagtttc agagtctgtc ttccaaaca	1484
aacacagtat ctaaactgtg tcatagttaa agctatggtg atggctggca tggaaatgct	1544
ctccaaagc ttagatattt gaaaacttgg tccccagtta gtgcactctg ggggaggctt	1604
alaaggtgct atgttgctgg acaaagtgtg actccagagg agtgttttgc agttttaaaa	1664
gtcatgtgct actcctgttc actctactca gcctgtggct ggagatgtgg gctctcagct	1724
gtccctgcct ccattgtctgt ctgtaataga gttcccaact gtgatattga tggagtctta	1784
ctctctgaa accttaagcc caaataaatc cttccttcta t	1825

<210> 6
 <211> 414
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 6

ES 2 428 791 T3

Met Arg Leu Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Val Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His
20 25 30

Leu Gly Val Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser
35 40 45

Ala Ala Phe Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val
50 55 60

Trp Met Ile Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys
65 70 75 80

Phe Ile Leu Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn
85 90 95

Ala Leu Ile Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu
100 105 110

Asn Ile Phe Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn
115 120 125

Leu Arg Ala Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr

ES 2 428 791 T3

130	135	140
Thr Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu		
145	150	155 160
Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe		
	165	170 175
Ser Pro Ser His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu		
	180	185 190
Val Leu Gly Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr		
	195	200 205
Ser Val Gly Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu		
	210	215 220
Val Ser Thr Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp		
225	230	235 240
Lys Tyr Glu Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu		
	245	250 255
Lys Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys		
	260	265 270
Glu Arg Lys Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys		

ES 2 428 791 T3

275	280	285
Glu Lys Lys Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu		
290	295	300
Tyr Met Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu		
305	310	315 320
Ile Ser Ser Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val		
	325	330 335
His Leu Lys Leu Arg Gly Glu Leu Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe		
	340	345 350
Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu		
355	360	365
Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro		
370	375	380
Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met		
385	390	395 400
Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro Ala Asn Glu Asp Asp Leu		
	405	410

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 5 <213> Mus musculus
 <400> 7

aaaacccttg ggctgttctt 20

ES 2 428 791 T3

	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Mus musculus		
5	<400> 8	ctfcgcatgc aggtattcaa	20
	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Mus musculus		
10	<400> 9	gagggccaac tcaagaagaa	20
	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Mus musculus		
15	<400> 10	gccgtggcgt tatacataca	20
	<210> 11 <211> 19 <212> ADN <213> Mus musculus		
20	<400> 11 19	cagctgtcct ggctcaaaa	19
	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Mus musculus		
25	<400> 12	acatagccca caccgttctc	20
	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Mus musculus		
30	<400> 13	aaacctatca ccatcttcca	20
	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Mus musculus		
35	<400> 14	gtggtcaca cccatcacia	20
	<210> 15 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
40	<400> 15		
	<220> <223> péptido parcial sintético de la DC-STAMP de ratón		

ES 2 428 791 T3

<400> 15

Cys Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val His Leu Lys Leu Arg Gly Glu
1 5 10 15

5 <210> 16
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molde de ADN 1 para la DC-STAMP de ratón

10 <400> 16

aatactagga ttgtgtctt cctgtctc 29

<210> 17
<211> 29
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molde de ADN 2 para la DC-STAMP de ratón

<400> 17

aagaagacaa caatcctagt acctgtctc 29

20 <210> 18
<211> 29
<212> ADNA
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Molde de ADN 3 para la DC-STAMP de ratón

<400> 18

aatactagga gcgtgtctt cctgtctc 29

<210> 19
<211> 29
30 <212> ADNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Molde de ADN 4 para la DC-STAMP de ratón

<400> 19

35 aagaagacaa cgctcctagt acctgtctc 29

<210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Molde de ADN 5 para la DC-STAMP de ratón

<400> 20

aattctcgtg tcagtctcct tctgtctc 29

<210> 21
45 <211> 29

ES 2 428 791 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Molde de ADN 6 para la DC-STAMP de ratón
 5 <400> 21

 aaaaggagac tgacacgaga acctgtctc 29

 <210> 22
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Molde de ADN 7 para la DC-STAMP de ratón

 <400> 22

 aattctcgta ccagttcctt tctgtctc 29

 15 <210> 23
 <211> 29
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Molde de ADN 8 para la DC-STAMP de ratón

 <400> 23

 aaaaggagac tggtagcaga acctgtctc 29

 <210> 24
 <211> 41
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo para PCR para la DC-STAMP de ratón

 <400> 24
 30
 ttgtcgaca tgaggctctg gacctgggc accagtattt t 41

 <210> 25
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Cebador inverso para PCR para la DC-STAMP de ratón

 <400> 25

 ttgcggccg ctcacatgatc atcttcattt gcagggattg t 41

 <210> 26
 40 <211> 1410
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (1).. (1410)
 <223>

<400> 26

atg agg ctc tgg acc ttg ggc acc agt att ttc ctg agg ctt tgg ggg 48
 Met Arg Leu Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly
 1 5 10 15

act tat gtg ttt cca cga agc cct agc tgg ctg gac ttc atc cag cat 96
 Thr Tyr Val Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His
 20 25 30

ttg gga gtc tgt tgc ttt gtg gcc ttc ctt tcg gtg agc ctc ttc tct 144
 Leu Gly Val Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser
 35 40 45

gca gcc ttt tac tgg atc ctg cca ccc gtt gcc ctg ctc tct tct gtc 192
 Ala Ala Phe Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val
 50 55 60

tgg atg atc acc tgt gtt ttc cta tgc tgt tcc aag cgc gca cga tgc 240
 Trp Met Ile Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys
 65 70 75 80

ttc att ctt ctg gcc gtt ctg tcg tgt ggc ctc cgt gaa ggt agg aac 288
 Phe Ile Leu Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn
 85 90 95

gct ttg att gcg gct ggc act ggg gta gtg atc ttt gga cat gtg gaa 336
 Ala Leu Ile Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu
 100 105 110

aat att ttt tat aac ttc aga ggt ctc cta gac agc atg act tgc aac 384
 Asn Ile Phe Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn
 115 120 125

cta agg gca aag agc ttt tca gta cat ttc cca ctt tta aaa cgg tat 432
 Leu Arg Ala Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr
 130 135 140

ES 2 428 791 T3

act gaa gcc atc cag tgg att tac ggc ctt gcc act ccg ctg aat cta	480
Thr Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu	
145 150 155 160	
ttt gat gac ctt gtt tct tgg aac cag act ctg gtg gtc tct ctt ttt	528
Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe	
165 170 175	
agt ccc agc cat gcc ctg gag gct cat atg aat gac act aga gga gaa	576
Ser Pro Ser His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu	
180 185 190	
gtc ctg gga gtc ctg cac cat atg gtg gtc acg aca gag ctg ttg act	624
Val Leu Gly Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr	
195 200 205	
tcc gtg ggc cag aag ttg ctt gcc ctt gcc ggg ctt ctg ctc atc cta	672
Ser Val Gly Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu	
210 215 220	
gtc agc act ggc ctc ttc ctg aag cga ttc ctg ggc cct tgt ggc tgg	720
Val Ser Thr Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp	
225 230 235 240	
aag tat gag aat gtc tac atc acc aaa caa ttt gtt cgg ttt gat gaa	768
Lys Tyr Glu Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu	
245 250 255	
aag gag agg cac caa cag cgg ccc tgt gtc ctc ccg ctg aat aag aag	816
Lys Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys	
260 265 270	
gaa agg aag aaa tat gtc atc gtc cca tct ttg cag ctg act cct aag	864
Glu Arg Lys Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys	
275 280 285	

ES 2 428 791 T3

gag aag aaa acc ctt ggg ctg ttc ttc ctt cct gtc ctg acc tat ctc	912
Glu Lys Lys Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu	
290 295 300	
tac atg tgg gtg ctg ttt gcc gct gtg gac tat ctg ctg tat cgg ctc	960
Tyr Met Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu	
305 310 315 320	
atc tcc tcc atg aac aaa cag ttc caa agc ttg cca ggg ctg gaa gtt	1008
Ile Ser Ser Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val	
325 330 335	
cac ttg aaa cta cgt gga gag aag caa gga acc caa gga gtc gtc cat	1056
His Leu Lys Leu Arg Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Gly Val Val His	
340 345 350	
gat tct gcc ttt aat ata tct atg ttt gaa ccg agc tgc att cct aaa	1104
Asp Ser Ala Phe Asn Ile Ser Met Phe Glu Pro Ser Cys Ile Pro Lys	
355 360 365	
cca cgt ctc agt gtg tct gag act tgg gtt cct ctc agt att att ctg	1152
Pro Arg Leu Ser Val Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Ile Ile Leu	
370 375 380	
tta aca cta ata ata cta gga ttg ttg tct tct atg ctg atg cag ctt	1200
Leu Thr Leu Ile Ile Leu Gly Leu Leu Ser Ser Met Leu Met Gln Leu	
385 390 395 400	
aaa att ctc gtg tca gtc tcc ttc tac ccc aaa gtg gag agg gag aga	1248
Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg	
405 410 415	
att gaa tac ctg cat gcg aag ctc ctt gag aaa cga tca aag cag cca	1296
Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro	
420 425 430	

ES 2 428 791 T3

ttg aga gag gct gac ggg aaa ccg agc ctg tac ttt aaa aag att cat 1344
 Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His
 435 440 445

ttc tgg ttt cca gtc ctg aaa atg att agg aag aag cag aca atc cct 1392
 Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro
 450 455 460

gca aat gaa gat gat cta tga 1410
 Ala Asn Glu Asp Asp Leu
 465 470

5 <210> 27
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27

Met Arg Leu Trp Thr Leu Gly Thr Ser Ile Phe Leu Arg Leu Trp Gly
 1 5 10 15

Thr Tyr Val Phe Pro Arg Ser Pro Ser Trp Leu Asp Phe Ile Gln His
 20 25 30

Leu Gly Val Cys Cys Phe Val Ala Phe Leu Ser Val Ser Leu Phe Ser
 35 40 45

Ala Ala Phe Tyr Trp Ile Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Ser Ser Val
 50 55 60

10

ES 2 428 791 T3

Trp Met Ile Thr Cys Val Phe Leu Cys Cys Ser Lys Arg Ala Arg Cys
 65 70 75 80

Phe Ile Leu Leu Ala Val Leu Ser Cys Gly Leu Arg Glu Gly Arg Asn
 85 90 95

Ala Leu Ile Ala Ala Gly Thr Gly Val Val Ile Phe Gly His Val Glu
 100 105 110

Asn Ile Phe Tyr Asn Phe Arg Gly Leu Leu Asp Ser Met Thr Cys Asn
 115 120 125

Leu Arg Ala Lys Ser Phe Ser Val His Phe Pro Leu Leu Lys Arg Tyr
 130 135 140

Thr Glu Ala Ile Gln Trp Ile Tyr Gly Leu Ala Thr Pro Leu Asn Leu
 145 150 155 160

Phe Asp Asp Leu Val Ser Trp Asn Gln Thr Leu Val Val Ser Leu Phe
 165 170 175

Ser Pro Ser His Ala Leu Glu Ala His Met Asn Asp Thr Arg Gly Glu
 180 185 190

Val Leu Gly Val Leu His His Met Val Val Thr Thr Glu Leu Leu Thr
 195 200 205

ES 2 428 791 T3

Ser Val Gly Gln Lys Leu Leu Ala Leu Ala Gly Leu Leu Leu Ile Leu
 210 215 220

Val Ser Thr Gly Leu Phe Leu Lys Arg Phe Leu Gly Pro Cys Gly Trp
 225 230 235 240

Lys Tyr Glu Asn Val Tyr Ile Thr Lys Gln Phe Val Arg Phe Asp Glu
 245 250 255

Lys Glu Arg His Gln Gln Arg Pro Cys Val Leu Pro Leu Asn Lys Lys
 260 265 270

Glu Arg Lys Lys Tyr Val Ile Val Pro Ser Leu Gln Leu Thr Pro Lys
 275 280 285

Glu Lys Lys Thr Leu Gly Leu Phe Phe Leu Pro Val Leu Thr Tyr Leu
 290 295 300

Tyr Met Trp Val Leu Phe Ala Ala Val Asp Tyr Leu Leu Tyr Arg Leu
 305 310 315 320

Ile Ser Ser Met Asn Lys Gln Phe Gln Ser Leu Pro Gly Leu Glu Val
 325 330 335

His Leu Lys Leu Arg Gly Glu Lys Gln Gly Thr Gln Gly Val Val His
 340 345 350

ES 2 428 791 T3

Asp Ser Ala Phe Asn Ile Ser Met Phe Glu Pro Ser Cys Ile Pro Lys
355 360 365

Pro Arg Leu Ser Val Ser Glu Thr Trp Val Pro Leu Ser Ile Ile Leu
370 375 380

Leu Thr Leu Ile Ile Leu Gly Leu Leu Ser Ser Met Leu Met Gln Leu
385 390 395 400

Lys Ile Leu Val Ser Val Ser Phe Tyr Pro Lys Val Glu Arg Glu Arg
405 410 415

Ile Glu Tyr Leu His Ala Lys Leu Leu Glu Lys Arg Ser Lys Gln Pro
420 425 430

Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Pro Ser Leu Tyr Phe Lys Lys Ile His
435 440 445

Phe Trp Phe Pro Val Leu Lys Met Ile Arg Lys Lys Gln Thr Ile Pro
450 455 460

Ala Asn Glu Asp Asp Leu
465 470

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente a DC-STAMP y suprimir la formación de osteoclastos.
2. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2 en el Listado de secuencias, una
5 proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 4 y una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 6 en el Listado de secuencias, y suprimir la formación de osteoclastos.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **que se caracteriza porque** el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **que se caracteriza porque** el anticuerpo es humanizado.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de de las reivindicaciones 1 a 4, **que se caracteriza porque** el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano;
- 15 6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de de las reivindicaciones 1 a 5, **que se caracteriza porque** el anticuerpo es un anticuerpo de tipo IgG.
7. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico, **que se caracteriza por que** la composición farmacéutica contiene al menos uno de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico, **que se caracteriza por que** la composición farmacéutica contiene al menos uno de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6 y al menos uno seleccionado del grupo que consiste en bisfosfonatos, vitamina D_3 activada, calcitonina y sus derivados, preparados hormonales tales como estradiol, SERM (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos), ipriflavona, vitamina K_2 (menatetrenona), preparados de calcio, PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpos anti-PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea), antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos anti-RANKL y OCIF (factor inhibidor de la osteoclastogénesis).
- 25 9. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico, que comprende un oligonucleótido antisentido que comprende de 15 a 30 mers complementario de una porción de una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secuencias nucleotídicas proporcionadas en las SEC ID N°: 1, 3 y 5, en la que el
30 oligonucleótido antisentido es capaz de suprimir la formación de osteoclastos.

Figura 1

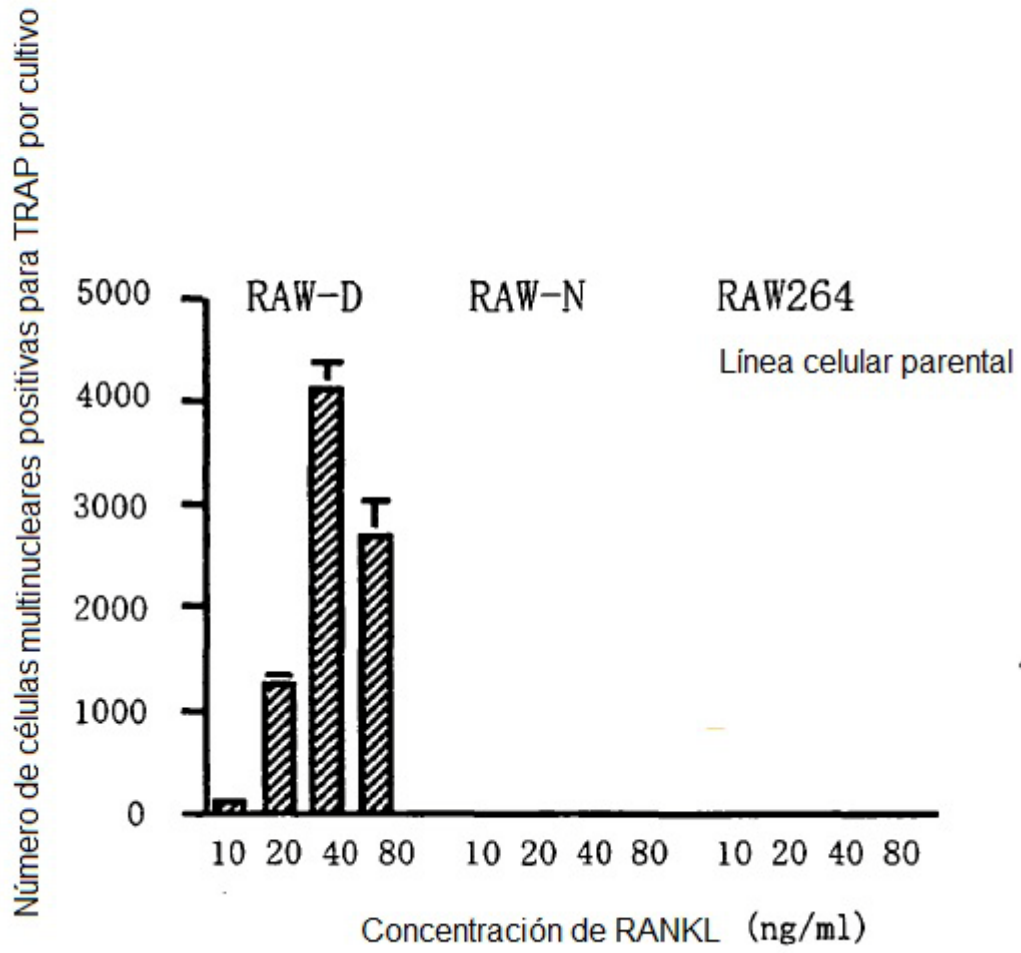
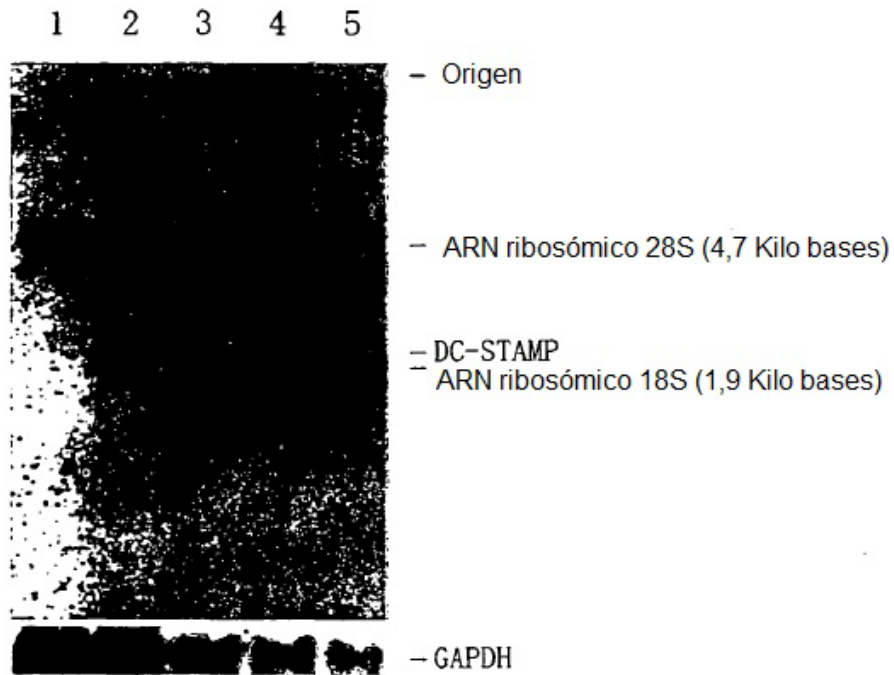


Figura 2



- 1 : RAW-N No estimuladas
- 2 : RAW-D No estimuladas
- 3 : RAW-N RANKL, Estimuladas con TNF- α
- 4 : RAW-D RANKL, Estimuladas con TNF- α
- 5 : RAW-D RANKL, Estimuladas con TNF- α y MIP-1 α

Figura 3

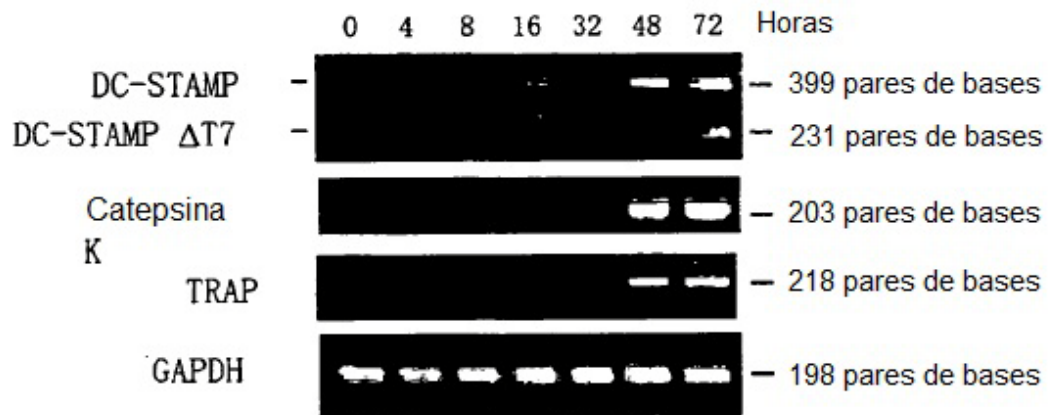


Figura 4

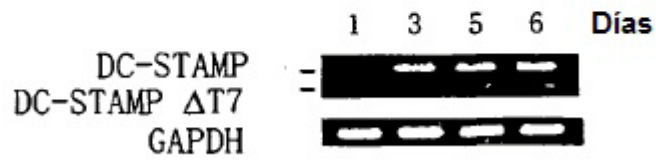
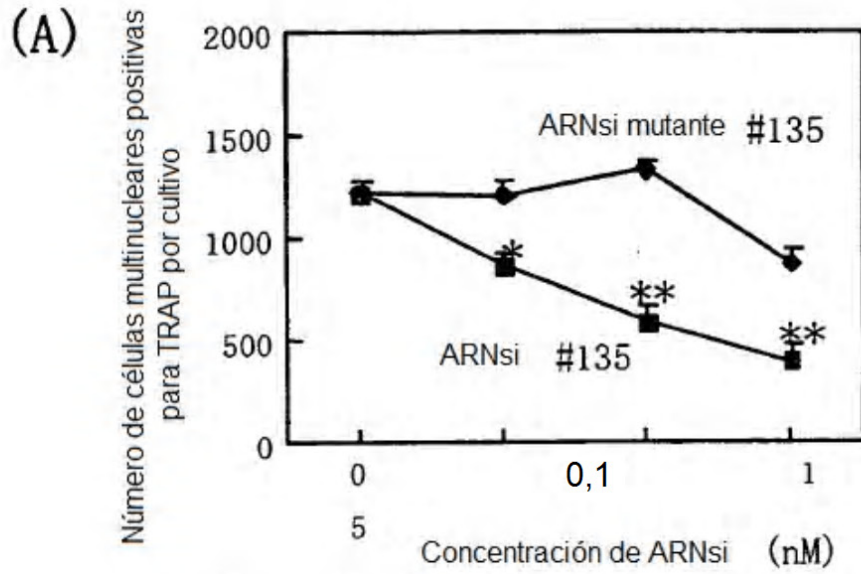
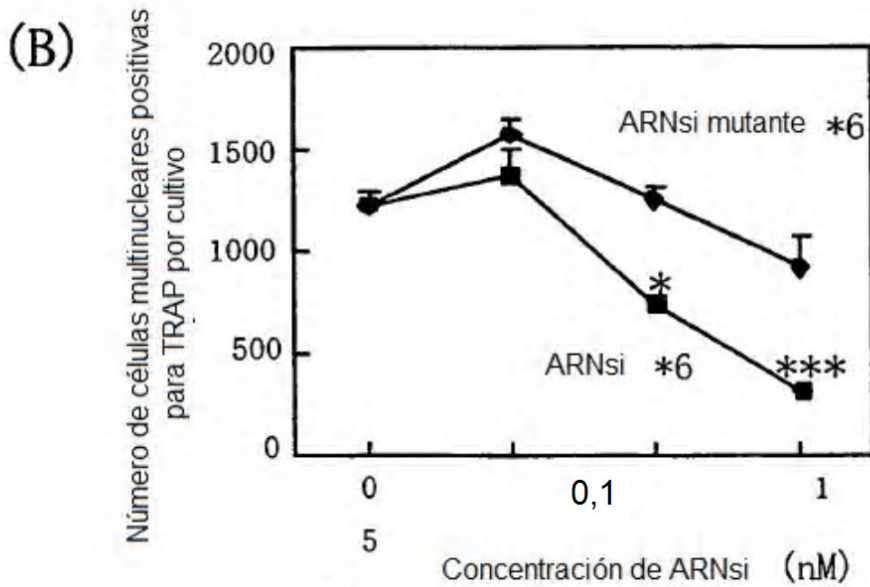


Figura 5



* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. 0 nM



* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. 0 nM

Figura 6

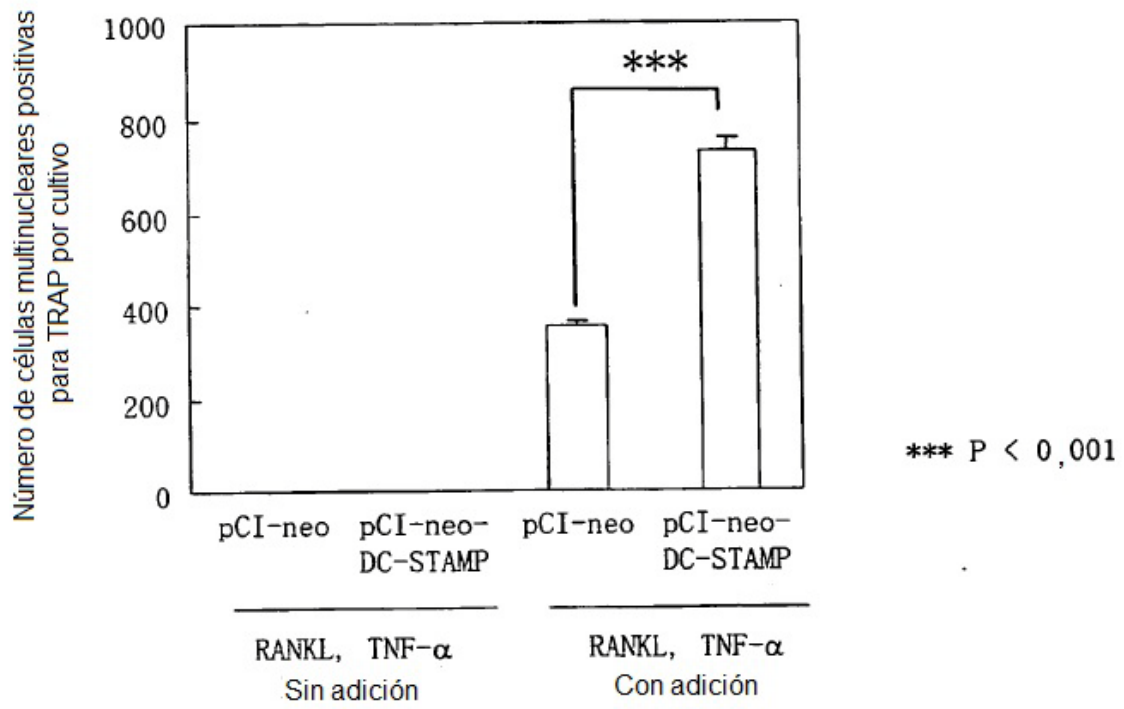


Figura 7

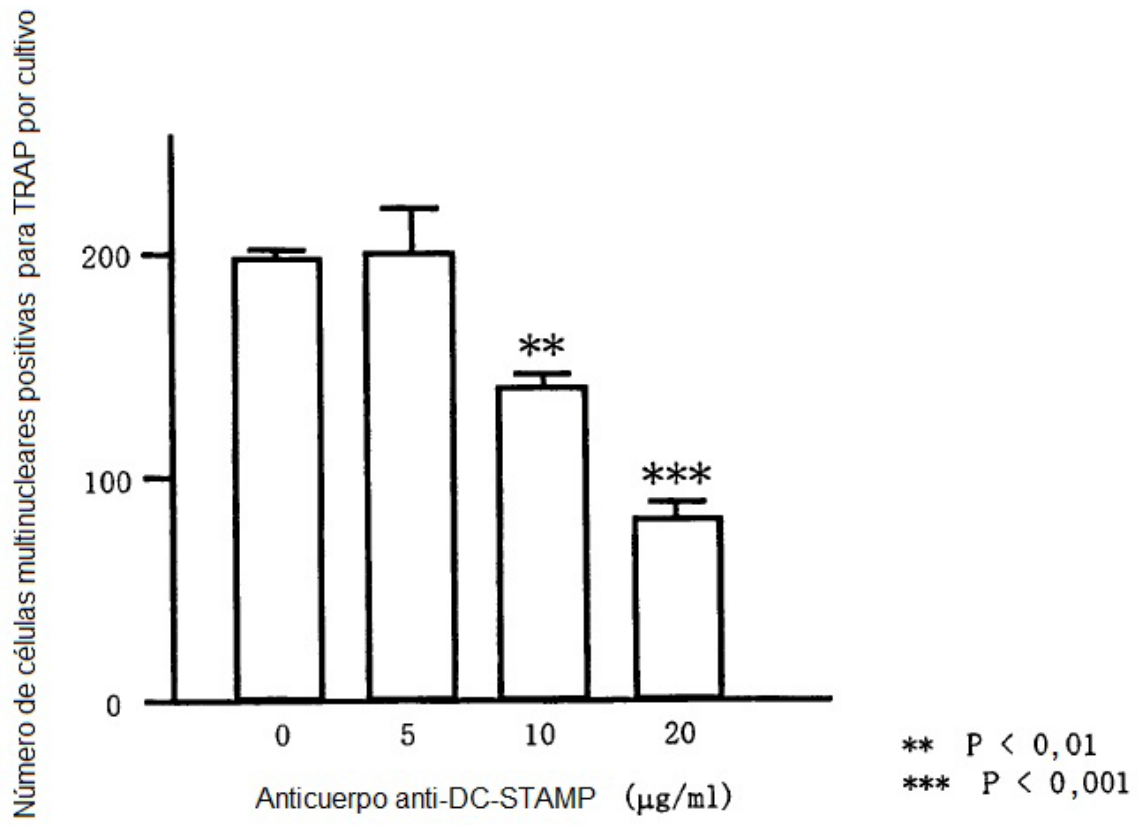


Figura 8

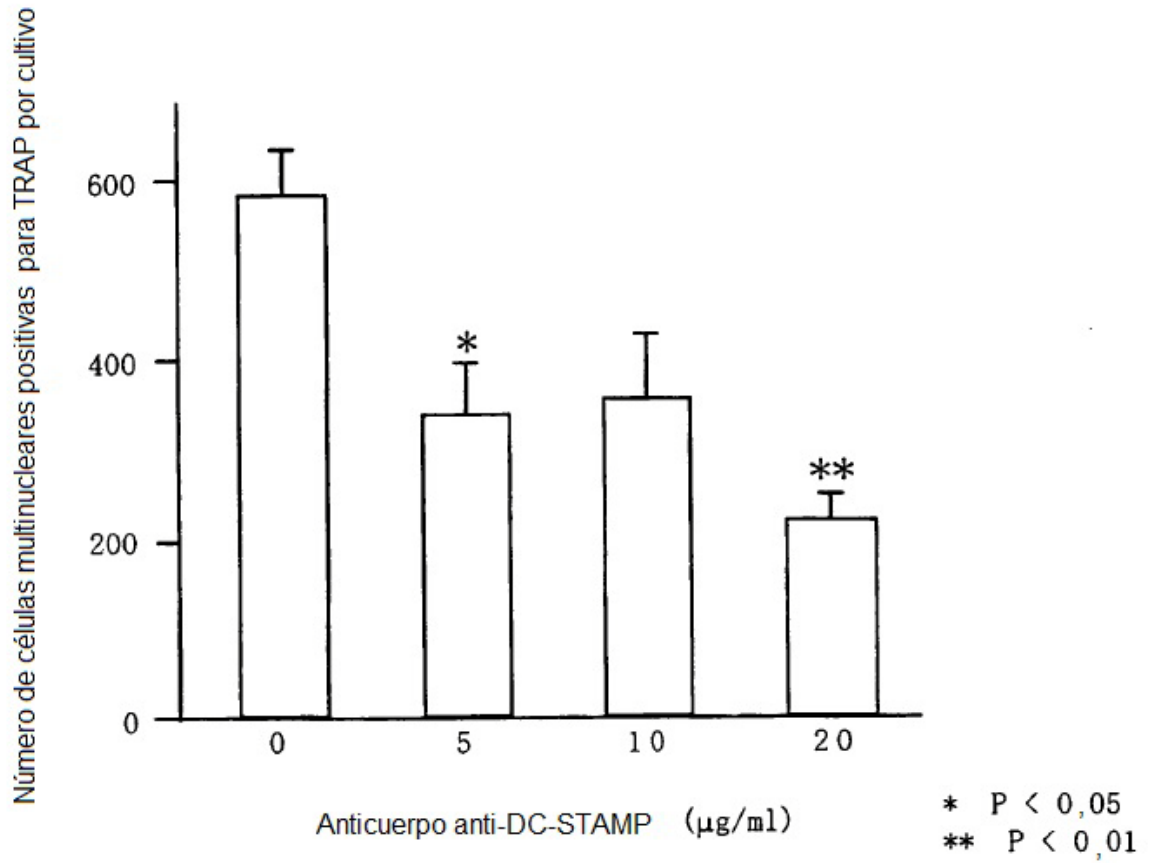


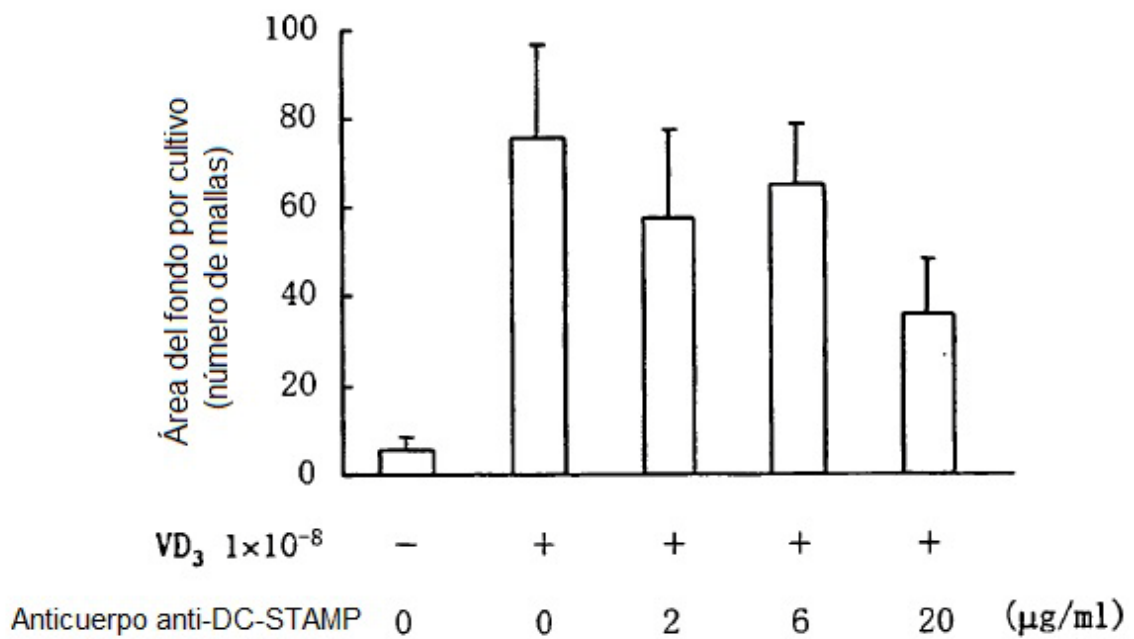
Figura 9

Figura 10

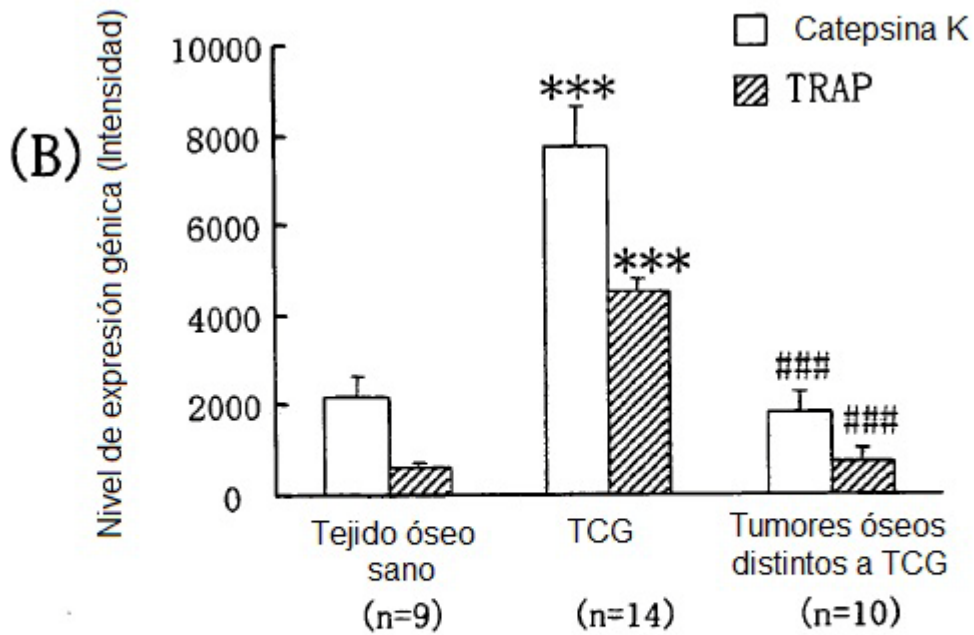
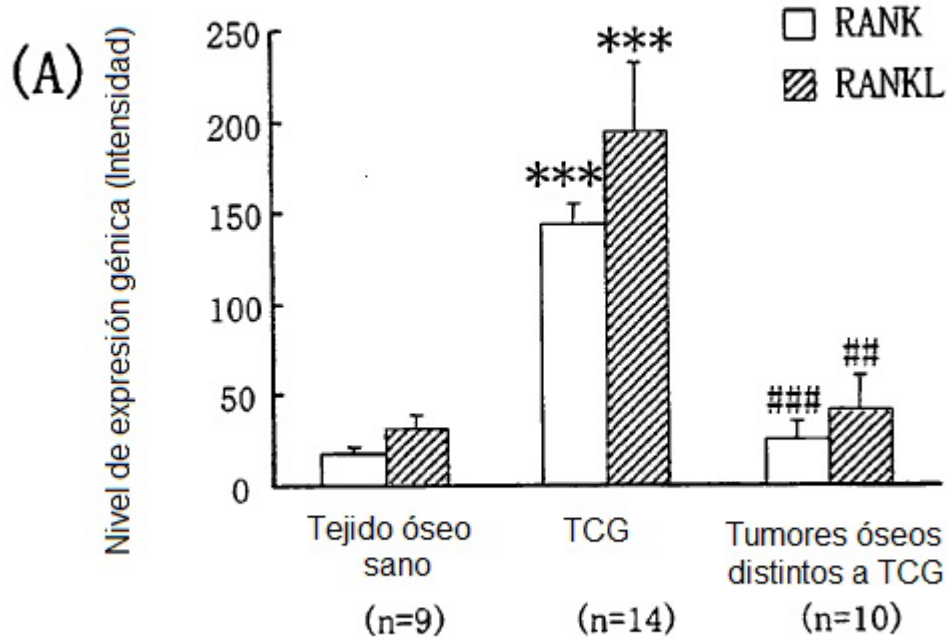
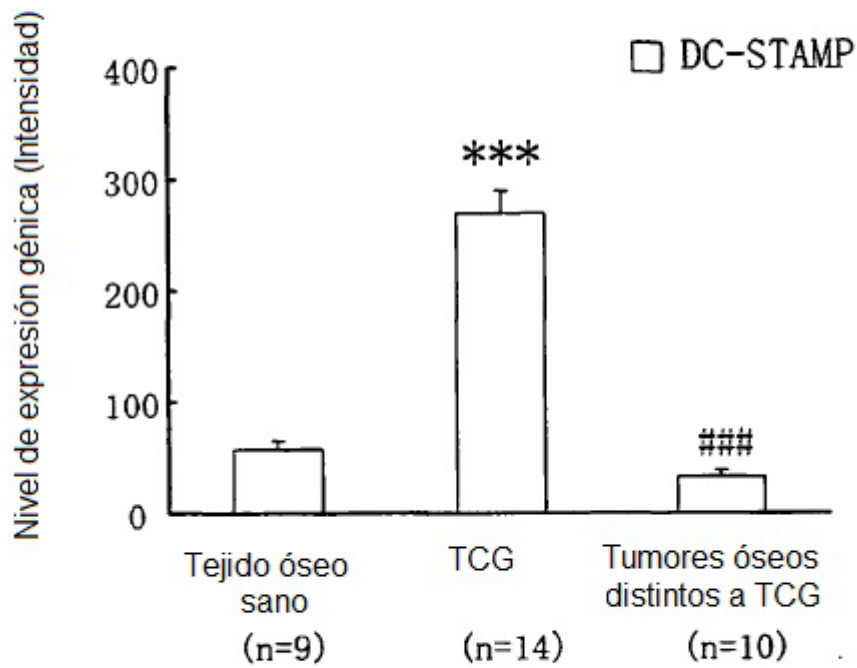


Figura 11



*** P < 0,001 vs. Tejido óseo sano

P < 0,001 vs. TCG

Figura 12

