

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 293**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2008 E 08731905 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2131860**

54 Título: **Anticuerpos anti-esclerostina**

30 Prioridad:

20.03.2007 US 895813 P

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

07.03.2014

73 Titular/es:

**ELI LILLY & COMPANY (100.0%)
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**KORYTKO, ANDREW IHOR;
MARQUIS, DAVID MATTHEW;
SMITH, ERIC MICHAEL y
SWANSON, BARBARA ANNE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 446 293 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

Anticuerpos anti-esclerostina

La presente invención pertenece al campo de la medicina, en particular en el campo de los anticuerpos dirigidos contra la esclerostina. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos de alta afinidad que se unen específicamente a la esclerostina humana y al uso terapéutico de los anticuerpos para varios trastornos o afecciones en sujetos humanos que se benefician de un incremento en al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o resistencia ósea.

La osteoporosis es una enfermedad en la que se reduce la densidad mineral ósea (DMO), se deteriora la microarquitectura ósea y los huesos osteoporóticos tienen un alto riesgo de fractura. La osteoporosis sigue siendo un causa principal de discapacidad a largo plazo y de mortalidad, en particular entre los ancianos. Aunque los tratamientos eficaces para la osteoporosis se presentan en forma de una modificación del estilo de vida y farmacoterapia, los tratamientos actualmente disponibles son limitados en número y eficacia, a menudo están asociados con efectos secundarios no deseados y no son universalmente aceptables para los pacientes. Varios agentes antirresortivos incluidos calcitonina, bisfosfonatos, reemplazo de estrógeno y moduladores selectivos de receptores de estrógeno (MSRE) evitan una pérdida ósea adicional, pero no reconstruyen el hueso una vez que se ha perdido. Está disponible un agente anabólico que incrementa la masa ósea y la densidad mineral ósea y restablece la arquitectura ósea en forma de PTH(1-34) humano. Sin embargo, este agente terapéutico requiere diariamente una inyección subcutánea, a menudo durante un año o más, lo que da como resultado un cumplimiento por parte del paciente menor del completo.

La esclerostina, el producto génico de SOST, se expresa fuertemente en los osteocitos dentro del hueso. Debido a su papel como regulador negativo potente de formación ósea, la esclerostina es un objetivo deseable para la intervención terapéutica para trastornos o afecciones lo que se beneficiaría de un incremento en al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo y resistencia ósea, por ejemplo, osteoporosis. Por lo tanto, los anticuerpos anti-esclerostina pueden resultar útiles como un enfoque anabólico para el tratamiento de dichos trastornos o afecciones. La publicación internacional PCT N.º WO 2006/119107 divulga secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanizados anti-esclerostina particulares en los que todas las CDR son totalmente murinas, es decir, no están alteradas de las CDR de un anticuerpo generado en un ratón. El documento WO 2006/119062 divulga anticuerpos o fragmentos de los mismos que se pueden unir a la esclerostina, lo que se dice que es útil para tratar una amplia variedad de afecciones relacionadas con los huesos.

Existe la necesidad de obtener un anticuerpo anti-esclerostina alternativo que se una a la esclerostina humana con una fuerte afinidad de unión y que tenga un valor de CI_{50} bajo en un ensayo de bioactividad de esclerostina. Se podría prever que un anticuerpo de este tipo es más eficaz terapéuticamente, en particular para la osteoporosis, y requiere una dosificación menos frecuente que PTH(1-34) o un anticuerpo anti-esclerostina con una afinidad de unión menor (es decir, una K_D mayor) o un valor de CI_{50} mayor. También existe una necesidad de obtener un anticuerpo específico para la esclerostina humana donde exista una disminución en el riesgo de una respuesta inmunitaria para el anticuerpo provocada por un sujeto humano administrado con el anticuerpo o una disminución en el riesgo de inestabilidad mientras que se mantienen las propiedades del anticuerpo de tener una alta afinidad de unión para esclerostina humana y un valor de CI_{50} bajo en un ensayo de bioactividad. Los anticuerpos anti-esclerostina de la presente invención satisfacen estas necesidades y proporcionan ventajas relacionadas.

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados, comprenden una secuencia polipeptídica específica divulgada en el presente documento, se unen específicamente a la esclerostina humana con una alta afinidad de unión y se pueden usar para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo y resistencia ósea en un mamífero, preferentemente un ser humano.

En un modo de realización, al menos una CDR en un anticuerpo de la invención difiere en la secuencia de aminoácidos de la CDR en la posición presente en un anticuerpo original, es decir, el anticuerpo generado en un roedor (por ejemplo, un ratón), a partir del que se deriva el anticuerpo variante, es decir, el anticuerpo humanizado o quimérico de la invención. Preferentemente, dicha(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos en una secuencia de CDR de un anticuerpo de la invención da como resultado una mayor afinidad de unión (es decir, K_D menor) con esclerostina humana, una CI_{50} menor en un ensayo de bioactividad de esclerostina, o ambas, que las presentes en el anticuerpo original. Una sustitución de aminoácidos en una secuencia de CDR de un anticuerpo de la invención de la presente en la CDR del anticuerpo original puede dar como resultado una disminución en la respuesta inmunógena para el anticuerpo por un ser humano administrado con el anticuerpo. Además, una sustitución de aminoácidos en una secuencia de CDR de un anticuerpo de la invención de la presente en la CDR del anticuerpo original puede disminuir el riesgo de inestabilidad del anticuerpo, por ejemplo, por la sustitución de un residuo de asparagina con un aminoácido diferente disminuyendo de este modo el riesgo de desaminación.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que se une específicamente a la esclerostina humana, en el que el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende seis CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: HCDR1 con SEQ ID NO: 26, HCDR2 con SEQ ID NO: 27, HCDR3 con SEQ ID NO: 28, LCDR1 con SEQ ID NO: 29, LCDR2 con SEQ ID NO: 30 y LCDR3

con SEQ ID NO: 31.

Preferentemente, el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente invención comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en el que, la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

Aún más preferentemente, el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente invención comprende un polipéptido de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un polipéptido de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de la presente invención, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente invención para su uso como medicamento.

Preferentemente, el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente invención se usa para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo, o resistencia ósea en un sujeto humano, y más en particular para tratar una enfermedad o trastorno seleccionado de osteoporosis, osteopenia, artrosis, dolor asociado con artrosis, artritis reumatoide, enfermedad periodontal, o mieloma múltiple en un sujeto humano.

Un anticuerpo divulgado en el presente documento se une específicamente a la esclerostina humana y comprende seis regiones CDR con secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en de (i) HCDR1 con SEQ ID NO: 20, HCDR2 con SEQ ID NO: 21, HCDR3 con SEQ ID NO: 22, LCDR1 con SEQ ID NO: 23, LCDR2 con SEQ ID NO: 24, y LCDR3 con SEQ ID NO: 25; (ii) HCDR1 con SEQ ID NO: 26, HCDR2 con SEQ ID NO: 27, HCDR3 con SEQ ID NO: 28, LCDR1 con SEQ ID NO: 29, LCDR2 con SEQ ID NO: 30, y LCDR3 con SEQ ID NO: 31; y (iii) HCDR1 con SEQ ID NO: 32, HCDR2 con SEQ ID NO: 33, HCDR3 con SEQ ID NO: 34, LCDR1 con SEQ ID NO: 35, LCDR2 con SEQ ID NO: 36, y LCDR3 con SEQ ID NO: 37.

En un caso, un anticuerpo se une específicamente a la esclerostina humana y comprende un polipéptido de región variable de cadena pesada ("HCVR") y un polipéptido de región variable de cadena ligera ("LCVR") en el que (i) la HCVR tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y la LCVR tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; (ii) la HCVR tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y la LCVR tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; o (iii) la HCVR tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y la LCVR tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En otro caso, un anticuerpo se une específicamente a la esclerostina humana y comprende un polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera en el que, (i) el polipéptido de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; (ii) el polipéptido de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; o (iii) el polipéptido de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En un caso, los anticuerpos como se definen en el presente documento, definidos preferentemente con un número de SEQ ID, se caracterizan además por tener una afinidad de unión (K_D) para la esclerostina humana de aproximadamente 10 pM o menos a 25 °C. Los anticuerpos preferentes tiene una K_D para la esclerostina de macacos de Java de aproximadamente 100 pM o menos a 25 °C. Los anticuerpos más preferentes tienen una afinidad de unión para la esclerostina humana de aproximadamente 10 pM o menos a 25 °C y una afinidad de unión para la esclerostina de macacos de Java de aproximadamente 100 pM o menos a 25 °C.

En otro caso, los anticuerpos como se define en el presente documento, definidos preferentemente con un número de SEQ ID, se caracterizan por tener una CI_{50} de 50 nM o menos en un ensayo de fosfatasa alcalina específico de hueso usando esclerostina humana. Preferentemente, estos anticuerpos también tienen una K_D para la esclerostina humana de aproximadamente 10 pM o menos a 25 °C. Más preferentemente, estos anticuerpos tienen una K_D para la esclerostina humana de aproximadamente 10 pM o menos a 25 °C y una K_D para la esclerostina de macacos de Java de aproximadamente 100 pM o menos a 25 °C.

En otro caso, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende una población homogénea o sustancialmente homogénea de un anticuerpo monoclonal de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención engloba el uso de un anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento. Para su uso en un procedimiento para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o resistencia ósea en un animal, preferentemente una especie de mamífero, más preferentemente un sujeto

humano.

En el presente documento se divulga un procedimiento de incremento de al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o resistencia ósea que comprende administrar a un sujeto humano que lo necesite, una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención.

- 5 En el presente documento se divulga también un procedimiento para tratar una enfermedad, afección o trastorno, en un sujeto humano, que se beneficia de un incremento en al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o resistencia ósea, incluidos, por ejemplo, osteoporosis, osteopenia, artrosis, dolor asociado con artrosis, enfermedad periodontal y mieloma múltiple.

10 En el presente documento también se divulga un procedimiento para detectar la proteína esclerostina en una muestra biológica, que comprende incubar un anticuerpo de la invención con la muestra biológica en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo se una a la proteína esclerostina, y detectar dicha unión. Un anticuerpo preferente para su uso en dicho ensayo de detección tiene un polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO:40 y un polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 41; un polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO: 42, y un polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 43; un polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO: 2 y un polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 5; un polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO: 3 y un polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 6; o un polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO: 4 y un polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 7.

20 En el presente documento se divulgan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo de la invención; un vector que comprende ese ácido nucleico, opcionalmente unido de forma funcional a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; una célula huésped que comprende ese vector; un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención que comprende cultivar la célula huésped de modo que se exprese el ácido nucleico y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo del medio de cultivo de célula huésped.

25 La invención presenta anticuerpos que se unen específicamente a la esclerostina humana, neutralizan o antagonizan al menos una bioactividad de esclerostina humana in vitro o in vivo y presentan además una fuerte afinidad de unión con la esclerostina humana. Cuando se usa en el presente documento, el término "esclerostina" se refiere a la proteína humana de longitud completa con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o a la forma madura de la proteína con la secuencia señal retirada.

30 El término "anticuerpo," en referencia a un anticuerpo anti-esclerostina de la invención (o simplemente, "anticuerpo de la invención"), como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, a menos que se indique de otro modo. Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden producir usando, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación en fagos, tecnologías sintéticas, por ejemplo, injertos de CDR, o combinaciones de dichas tecnologías fácilmente conocidas en la técnica.

35 "Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de una única copia o clon, incluido, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procaríota, o de fago, y no el procedimiento por el que se produce.

40 Un "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpo de la invención" o simplemente "anticuerpo" puede ser un anticuerpo intacto (que comprende una región Fc de completa o de longitud completa), o una porción o fragmento de un anticuerpo que comprende una porción de unión a antígeno, por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fab', o fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los fragmentos de unión a antígeno particularmente preferentes de un anticuerpo de la invención retienen la capacidad de inhibir o neutralizar una o más bioactividades características de una esclerostina de mamífero in vivo o in vitro. Por ejemplo, en un modo de realización, una porción de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención puede inhibir la interacción de la esclerostina humana madura con uno o más de sus ligandos y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por receptor de la esclerostina humana.

45

Además, un "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpo de la invención" o simplemente "anticuerpo", como se usa en el presente documento, puede ser un fragmento Fv de cadena ligera que se puede producir uniendo el ADN que codifica la LCVR y la HCVR con una secuencia enlazadora. (Véase, Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315, 1994). Se entiende que independientemente de si se especifican los fragmentos o porciones de unión a antígeno, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye dichos fragmentos o porciones así como formas monocatenarias, a menos que se indique de otro modo. Siempre que la proteína retenga la capacidad para unirse específicamente a esclerostina, se incluye dentro del término "anticuerpo".

50

55 La expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no se une específicamente a moléculas distintas de su(s) compañero(s) de unión específica, medido por una técnica disponible en la técnica, por ejemplo, ELISA de competición, ensayo BIACORE® o ensayo KINEXA®. También se puede aplicar el término cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención es específico para un epítipo particular que es llevado por varios

antígenos, caso en el que el anticuerpo que lleva el dominio de unión a antígeno se podrá unir específicamente a los diversos antígenos que llevan el epítipo. El término "epítipo" se refiere a esa porción de una molécula que se puede reconocer por y unirse por un anticuerpo a una o más de las regiones de unión a antígeno del anticuerpo.

5 El término "bioactividad", en referencia a un anticuerpo de la invención, incluye, pero no se limita a, afinidad de unión a epítipo o antígeno, capacidad para neutralizar o antagonizar una bioactividad de esclerostina in vivo o in vitro, CI_{50} en un ensayo de fosfatasa alcalina específico de hueso (por ejemplo, como se describe en el ejemplo 2, en el presente documento) u otro ensayo de actividad in vitro, la estabilidad in vivo y/o in vitro del anticuerpo y las propiedades inmunógenas del anticuerpo, por ejemplo, cuando se administra a un sujeto humano. Las propiedades o características mencionadas anteriormente se pueden observar o medir usando técnicas reconocidas en la técnica
10 incluidas, pero sin limitarse a, ELISA, ELISA competitiva, análisis de resonancia de plasmón superficial, ensayos de neutralización in vitro e in vivo sin límite, unión a receptor e inmunohistoquímica con secciones de tejido de diferentes fuentes incluidas humano, primate, o cualquier otra fuente como se pueda necesitar.

15 El término "bioactividad" en referencia a esclerostina, incluye, pero no se limita a, unión específica de esclerostina a otra proteína (por ejemplo, un receptor o miembro de la familia de TGF- β), una o más funciones mediadas por receptor de esclerostina humana, transducción de señal, propiedades inmunógenas, estabilidad in vivo o in vitro, afectando a los niveles o la actividad de otra proteína in vivo o in vitro (véase por ejemplo, el ejemplo 2), niveles de expresión de esclerostina y distribución tisular.

20 El término "inhibir" o "neutralizar", como se usa en el presente documento con respecto a una bioactividad de un anticuerpo de la invención, quiere decir la capacidad para antagonizar, prohibir, prevenir, restringir, ralentizar, interrumpir, eliminar, detener, reducir o invertir sustancialmente una bioactividad de esclerostina (por ejemplo, medido en el ejemplo 2, en el presente documento).

25 El término "numeración de Kabat", como se usa en el presente documento, se reconoce en la técnica y se refiere a un sistema de numeración de residuos aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones de cadena pesada y ligera del anticuerpo (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH N.º 91-3242 (1991)). La colocación de las CDR en la región variable de un anticuerpo sigue la numeración de Kabat o simplemente, "Kabat". Un polinucleótido se "une de forma funcional" cuando se coloca en relación funcional con otro polinucleótido. Por ejemplo, un promotor o potenciador se une de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Los términos "sujeto" y "paciente", usados de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a un mamífero, preferentemente un humano. E un determinado modo de realización, el sujeto se caracteriza además con una enfermedad o trastorno o afección que se beneficiaría de una disminución en el nivel de esclerostina o disminución en la bioactividad de esclerostina.
30

35 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido de forma funcional incluido, pero sin limitarse a, plásmidos y vectores víricos. Ciertos vectores se pueden replicar de forma autónoma en una célula huésped dentro de la que se introducen mientras que otros vectores se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y por lo tanto, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). Los vectores ejemplares son bien conocidos en la técnica.
40

45 Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "célula huésped" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable e incluyen una celda individual o cultivo celular que es un receptor de cualquier polinucleótido aislado de la invención o cualquier vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una HCVR, una LCVR o un anticuerpo de la invención. Una célula huésped incluye células transformadas, transducidas o infectadas con uno o más vectores recombinantes o un polinucleótido que expresa un anticuerpo monoclonal de la invención o una cadena ligera o cadena pesada del mismo.

50 Cada cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa se compone de una región variable de cadena pesada N-terminal (en el presente documento "HCVR") y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera de un anticuerpo de longitud completa se compone de una región variable de cadena ligera N-terminal (en el presente documento "LCVR") y una región constante de cadena ligera. Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones estructurales" (FR). La capacidad funcional de un anticuerpo para unir un antígeno o epítipo particular está grandemente influenciada por las seis CDR presentes en la región variable del anticuerpo. Cada HCVR y LCVR se compone de tres CDR (HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en la HCVR y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en la LCVR) y cuatro FR, dispuestas desde el amino terminal hasta el carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las CDR contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La colocación de CDR dentro de la región variable sigue la numeración de Kabat.
55

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda y se caracterizan por una región constante particular como

- se conoce en la técnica. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, y IgE, respectivamente y varias de estas se pueden dividir además en subclases, por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante particular con una secuencia fácilmente conocida en la técnica. La región constante de cadena ligera kappa y las regiones constantes de cadena pesada IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ son regiones constantes preferentes en los anticuerpos de la invención. Más preferentemente, la región constante de cadena pesada comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 codificada por un polinucleótido con SEQ ID NO: 39. Los anticuerpos quiméricos pueden tener regiones constantes de origen no humano, preferentemente de rata o murino.
- 5 Como se usa en el presente documento, la "región de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" se refiere a esa porción de una molécula de anticuerpo, dentro de la región variable, que contiene los residuos de aminoácidos que interaccionan con un antígeno y confieren en el anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. Esta porción de anticuerpo incluye los residuos de aminoácidos estructurales necesarios para mantener la conformación apropiada de los residuos de unión a antígeno.
- 10 Un anticuerpo preferente comprende seis CDR con secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24 y 25. Otro anticuerpo preferente comprende seis CDR con secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36 y 37. Un anticuerpo más preferente comprende seis CDR con secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 y 31. Las CDR de estos anticuerpos preferentes existen en la posición establecida en la tabla 1 a continuación. Las CDR se colocan en la región variable de acuerdo con Kabat.
- 15 Un anticuerpo preferente comprende una LCVR con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 17, 18 o 19. Otros anticuerpos monoclonales preferentes comprenden una HCVR con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 15 o 16. Más preferentemente, un anticuerpo comprende una LCVR de SEQ ID NO: 17 y una HCVR de SEQ ID NO: 14. Un anticuerpo alternativo comprende una LCVR de SEQ ID NO: 19 y una HCVR de SEQ ID NO: 16. Un anticuerpo más preferente comprende una LCVR de SEQ ID NO: 18 y una HCVR de SEQ ID NO: 15.
- 20 Preferentemente, dichas LCVR se unen a una región constante de cadena ligera, preferentemente de origen humano, preferentemente una cadena kappa. Preferentemente, dichas HCVR se unen de manera funcional a una región constante de cadena pesada, preferentemente de origen humano, preferentemente IgG₁ o IgG₄, lo más preferentemente una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:38.
- 25 Un anticuerpo preferente comprende un polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO: 2 y un polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 5. El polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO: 2 se puede codificar, por ejemplo, por una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 8, el polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 5 se puede codificar, por ejemplo, por un polinucleótido de SEQ ID NO: 11.
- 30 Otro anticuerpo preferente comprende un polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO: 4 y un polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 7. El polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO:4 se puede codificar, por ejemplo, por una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 10, el polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 7 se puede codificar, por ejemplo, por un polinucleótido de SEQ ID NO: 13.
- 35 Otro anticuerpo preferente comprende un polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO: 3 y un polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 6. El polipéptido de cadena pesada con SEQ ID NO:3 se puede codificar por una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 9, el polipéptido de cadena ligera con SEQ ID NO: 6 se puede codificar por un polinucleótido de SEQ ID NO: 12. Los anticuerpos humanizados preferentes se denominan en el presente documento 86, 88 y 89. Los SEQ ID NO de sus secuencias son como se enumeran en la tabla 1 dada a continuación.
- 40

Tabla 1- SEQ ID NO de proteína

Anticuerpo	Cadena pesada	Cadena ligera	HCVR	CDR1 pesada	CDR2 pesada	CDR3 pesada	LCVR	CDR1 ligera	CDR2 ligera	CDR3 ligera
86	2	5	14	20	21	22	17	23	24	25
88	3	6	15	26	27	28	18	29	30	31
89	4	7	16	32	33	34	19	35	36	37

- Preferentemente, un anticuerpo en el que las seis CDR, la HCVR, la LCVR, la HCVR y la LCVR, la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o la cadena pesada completa y la cadena ligera completa están limitadas por una secuencia particular como se muestra por un SEQ ID NO en el presente documento (véase, por ejemplo, la tabla 1) se caracteriza además por tener una K_D para esclerostina humana a 25 °C de menos de aproximadamente 10 pM, 8 pM, 6 pM o 4 pM, más preferentemente menos de aproximadamente 2,2 pM. Adicionalmente, es preferente que dicho anticuerpo esté limitado además por tener una K_D para esclerostina de macaco de Java a 25 °C de menos de aproximadamente 100 pM, 90 pM o 80 pM, o más preferentemente de menos de aproximadamente 75 pM.
- 45

Preferentemente, un anticuerpo en el que las seis CDR, la HCVR, la LCVR, la HCVR y la LCVR, la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o la cadena pesada completa y la cadena ligera completa están limitadas por una secuencia particular como se muestra por un SEQ ID NO en el presente documento se caracteriza además por tener una CI_{50} en un ensayo de fosfatasa alcalina específico de hueso usando esclerostina humana (véase, por ejemplo, el ejemplo 2 en el presente documento) de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40, 35, o 30 nM o menos, más preferentemente de aproximadamente 25 nM, aún más preferentemente de aproximadamente 20 nM (por ejemplo, 20,2 nM) o menos.

Más preferentemente, un anticuerpo en el que las seis CDR, la HCVR, la LCVR, la HCVR y la LCVR, la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o la cadena pesada completa y la cadena ligera completa están limitadas por una secuencia particular como se muestra por un SEQ ID NO en el presente documento se caracteriza además por tener una K_D para esclerostina humana a 25 °C o menos de aproximadamente 10 pM, 8 pM, 6 pM o 4 pM, más preferentemente menos de aproximadamente 2,2 pM, y también se caracteriza por tener una CI_{50} en un ensayo de fosfatasa alcalina específico de hueso usando esclerostina humana de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40, 35, o 30 nM o menos, más preferentemente aproximadamente 25 nM o menos, aún más preferentemente de aproximadamente 20 nM (por ejemplo, 20,2 nM) o menos.

Aún más preferentemente, un anticuerpo en el que las seis CDR, la HCVR, la LCVR, la HCVR y la LCVR, la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o la cadena pesada completa y la cadena ligera completa están limitadas por una secuencia particular como se muestra por un SEQ ID NO en el presente documento se caracteriza además por tener una K_D para esclerostina humana a 25 °C o menos de aproximadamente 10 pM, 8 pM, 6 pM o 4 pM, más preferentemente menos de aproximadamente 2,2 pM; también se caracteriza por tener una CI_{50} en un ensayo de fosfatasa alcalina específico de hueso usando esclerostina humana de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40, 35, o 30 nM o menos, más preferentemente de aproximadamente 25 nM o menos, aún más preferentemente de aproximadamente 20 nM (por ejemplo, 20,2 nM) o menos; y también se caracteriza por tener una CI_{50} en un ensayo de fosfatasa alcalina específico de hueso usando esclerostina de macaco de Java de aproximadamente 75 nM o menos.

Expresión de anticuerpo

La presente invención también está dirigida a células huésped que expresan un anticuerpo anti-esclerostina de la invención. La creación y el aislamiento de líneas de células huésped que producen un anticuerpo de la invención se pueden lograr usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

Se puede usar una amplia variedad de sistemas de expresión de huésped conocidos en la técnica para expresar un anticuerpo de la presente invención incluyendo sistemas de expresión procariontas (bacterianos) y eucariotas (tales como levaduras, baculovirus, células vegetales, células de mamífero y otras células animales, animales transgénicos y células de hibridoma), así como los sistemas de expresión de presentación en fagos. Un anticuerpo de la invención se puede preparar por expresión recombinante de genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de manera recombinante, una célula huésped se transforma, transduce, se infecta o similar con uno o más vectores de expresión recombinantes que llevan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligeras y/o pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligeras y/o pesadas se expresan en la célula huésped. La cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar independientemente a partir de diferentes promotores a los que están unidos de forma funcional en un vector o, de forma alternativa, la cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar independientemente a partir de diferentes promotores a los que están unidos de forma funcional en dos vectores (uno que expresa la cadena pesada y uno que expresa la cadena ligera). Opcionalmente, la cadena pesada y la cadena ligera se pueden expresar en diferentes células huésped.

Adicionalmente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo anti-esclerostina desde una célula huésped. El gen de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo anti-esclerostina se puede clonar dentro del vector de modo que el péptido señal se une de manera funcional en fase al amino terminal del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo. Preferentemente, los anticuerpos recombinantes se segregan en el medio en el que se cultivan las células huésped, a partir del que se pueden recuperar o purificar los anticuerpos.

Un ADN aislado que codifica una región HCVR se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo de forma funcional el ADN que codifica la HCVR a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadenas pesadas. Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanos, así como de otros mamíferos, son conocidos en la técnica. Los fragmentos de ADN que engloban estas regiones se pueden obtener, por ejemplo, por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser de cualquier tipo, (por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM o IgD), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) o subclase de región constante y cualquier variante alotípica de la misma como se describe en Kabat (*supra*). Una región constante de cadena pesada preferente comprende el polipéptido de SEQ ID NO:38.

Un ADN aislado que codifica una región LCVR se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa

(así como en un gen de cadena ligera de Fab) uniendo de manera funcional el ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena ligera. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humanos, así como de otros mamíferos, son conocidos en la técnica. Los fragmentos de ADN que engloban estas regiones se pueden obtener por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Las células huésped de mamífero preferentes para su uso en la invención son células CHO (por ejemplo, ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0 y células COS (ATCC por ejemplo, CRL-1650, CRL-1651), HeLa (ATCC CCL-2). Células huésped adicionales para su uso en la invención incluyen otras células de mamífero, células de levadura y células procariotas. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, se producen los anticuerpos cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar de la célula huésped y/o del medio de cultivo usando procedimientos de purificación estándar.

Una vez expresados, los anticuerpos intactos, las cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico, afinidad, cromatografía en columna de interacción hidrófoba, fase inversa, electroforesis en gel y similares. Las inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad de al menos aproximadamente un 90 %, 92 %, 94 % o 96 % son preferentes, y con una homogeneidad de un 98 a un 99 % o más las más preferentes, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los anticuerpos estériles se usan a continuación terapéuticamente, como se indica en el presente documento.

Anticuerpo humanizado

Preferentemente, un anticuerpo de la invención que se va a usar con propósitos terapéuticos, tiene la secuencia de la región estructural y constante (en la medida en que existe en el anticuerpo) derivada del mamífero en el que se usaría como agente terapéutico para disminuir la posibilidad de que el mamífero provoque una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos humanizados son de particular interés puesto que son valiosos para una aplicación terapéutica y disminuyen la probabilidad de una respuesta al anticuerpo anti-ratón humano observada frecuentemente con anticuerpos de origen murino o anticuerpos que comprenden porciones que son de origen murino cuando se administra a un sujeto humano. Preferentemente, los anticuerpos humanizados inyectados pueden tener una semivida más parecida a la de los anticuerpos humanos naturales que a la de, por ejemplo, los anticuerpos murinos, permitiendo de este modo que se administren dosis más pequeñas y menos frecuentes a un sujeto.

El término "anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo en el que al menos una porción es de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones derivadas de un anticuerpo de origen no humano, tal como un ratón, y porciones derivadas de un anticuerpo de origen humano, unidas entre sí, por ejemplo, químicamente por técnicas convencionales (por ejemplo, sintéticas) o preparadas como un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética.

Preferentemente, un "anticuerpo humanizado" tiene CDR que se originan de o se derivan de un anticuerpo original, es decir, un anticuerpo no humano (preferentemente un anticuerpo monoclonal de ratón), mientras que la región estructural y constante, en la medida en que esté presente, (o una porción significativa o sustancial de la misma, es decir, al menos aproximadamente un 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 %) se codifican por la información de la secuencia de ácido nucleico que se produce en la región de inmunoglobulina de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, the International ImMunoGeneTics Database) o en las formas recombinada o mutada de las mismas tanto si dichos anticuerpos se producen o no en una célula humana. Preferentemente, al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de un anticuerpo humanizado se optimizan a partir de las CDR de un anticuerpo original no humano a partir del que se deriva el anticuerpo humanizado, para generar una propiedad deseada, por ejemplo, especificidad, afinidad o neutralización mejoradas, lo que se puede identificar por un ensayo de cribado, por ejemplo, un ensayo de ELISA. Preferentemente, una CDR optimizada en un anticuerpo de la invención comprende al menos una sustitución aminoacídica cuando se compara con la presente en el anticuerpo original. Determinadas sustituciones de aminoácidos en las CDR de los anticuerpos humanizados 88 y 89 de la invención en comparación con las de los anticuerpos originales 788 y 789 (véanse los ejemplos 5 y 6 en el presente documento) disminuyen la probabilidad de inestabilidad del anticuerpo (por ejemplo, retirada de residuos de Asn de CDR) o disminuyen la probabilidad de inmunogenicidad del anticuerpo cuando se administra a un sujeto humano (por ejemplo, como se predice por tecnología IMMUN-OFILTER™).

Preferentemente, los anticuerpos humanizados contienen una secuencia mínima derivada de un anticuerpo no humano. Los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR o secuencias estructurales importadas del anticuerpo original. Los anticuerpos humanizados se pueden someter a mutagénesis in vitro usando procedimientos de uso rutinario en la técnica y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de regiones estructurales de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos

recombinantes humanizados son secuencias que, aunque se derivan de las relacionadas con las secuencias de HCVR y LCVR de línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos in vivo. Se contempla que dichas secuencias de aminoácidos de las regiones estructurales HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes humanizados son idénticas al menos en un 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 98 % o más preferentemente al menos en un 99 % o lo más preferentemente en un 100 % a una secuencia de línea germinal humana.

En modos de realización preferentes, un anticuerpo humanizado de la presente invención comprende secuencias estructurales de cadena ligera de línea germinal humana (véase, por ejemplo, el documento PCT WO 2005/005604) y secuencias estructurales de cadena pesada de línea germinal humana (véase, por ejemplo, el documento PCT WO 2005/005604). Las regiones estructurales de cadena ligera humana preferentes son de un gen de cadena ligera kappa humana seleccionado del grupo que consiste en: A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, L1, L11, L12, L2, L5, L6, L8, O12, O2 y O8. Las regiones estructurales de cadena pesada humana preferentes son de una cadena pesada humana seleccionada del grupo que consiste en: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VH1-24, VH1-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VH1-18, VH1-69, VH3-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59, VH5-51 (véase, la publicación internacional n.º WO2006/046935).

Existen múltiples procedimientos disponibles en la técnica para generar anticuerpos humanizados. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos humanizados obteniendo secuencias de ácidos nucleicos que codifican la HCVR y la LCVR de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo murino o anticuerpo preparado por un hibridoma) que se une específicamente a la esclerostina, preferentemente esclerostina humana, identificando las CDR en dicha HCVR y LCVR (no humana), e injertando dichas secuencias de ácidos nucleicos que codifican CDR sobre secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones estructurales humanas seleccionadas. Opcionalmente, una región CDR se puede optimizar mutagenizando aleatoriamente o en localizaciones particulares para sustituir uno o más aminoácidos en la CDR con un aminoácido diferente antes de injertar la región CDR dentro de la región estructural. De forma alternativa, una región CDR se puede optimizar posteriormente a la inserción en la región estructural humana usando procedimientos disponibles para un experto en la técnica.

Después de que las secuencias que codifican CDR se injerten sobre las secuencias que codifican las regiones estructurales humanas seleccionadas, las secuencias de ADN resultantes que codifican las secuencias ligera variable y pesada variable humanizadas se expresan a continuación para producir un anticuerpo humanizado que se une a la esclerostina. La HCVR y LCVR humanizadas se pueden expresar como parte de una molécula completa de anticuerpo anti-esclerostina, es decir, como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humano. Sin embargo, las secuencias de HCVR y LCVR también se pueden expresar en ausencia de secuencias constantes para producir un Fv anti-esclerostina humanizado.

Las referencias que describen además procedimientos que implican la humanización de un anticuerpo de ratón que se puede usar incluyen, por ejemplo, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869, 1991 y el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones et al., Nature, 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534 (1988)].

Usos de diagnóstico

Se puede usar un anticuerpo de la invención para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociado con la expresión de la esclerostina humana. De modo similar, se puede usar el anticuerpo de la invención en un ensayo para monitorizar los niveles de esclerostina en un sujeto que está siendo tratado para una afección asociada a esclerostina. Dichas aplicaciones incluyen procedimientos que utilizan un anticuerpo de la invención y una marca para detectar esclerostina en una muestra biológica, por ejemplo, en un fluido corporal humano o en una célula o extracto de tejido (véase, por ejemplo, el ejemplo 1 en el presente documento). Se pueden usar los anticuerpos de la invención con o sin modificación, y se pueden marcar por enlace covalente o no covalente de un resto detectable.

En la técnica se conocen una variedad de protocolos convencionales para medir los niveles de esclerostina en una muestra biológica, incluidos, por ejemplo, ELISA, RIA, y FACS, y proporcionan una base para diagnosticar niveles alterados o anormales de la expresión de esclerostina. Los niveles de esclerostina normales o estándar presentes en una muestra se establecen usando cualquier técnica conocida, por ejemplo, combinando una muestra que comprende un polipéptido de esclerostina con, por ejemplo, un anticuerpo de la invención en condiciones adecuadas para formar un complejo antígeno:anticuerpo. El anticuerpo está marcado directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. La cantidad de un complejo formado estándar se cuantifica por diversos procedimientos, tales como, por ejemplo, medios fotométricos. Las cantidades de polipéptido de esclerostina presente en muestras se comparan a continuación con los valores estándar.

Usos terapéuticos

La esclerostina funciona como un regulador negativo de formación ósea. (véase, por ejemplo, Cytokine & Growth Factor Reviews, 16:319-327, 2005). En adultos, el ARNm de esclerostina se detecta principalmente en osteocitos

aunque los solicitantes han descubierto menores concentraciones en el cartílago.

Se puede usar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de la invención para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o resistencia ósea en hueso vertebral o no vertebral, o ambos, cuando se administra una cantidad eficaz a un sujeto humano que lo necesita. Se puede usar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de la invención para reducir la incidencia de fractura de hueso vertebral y/o no vertebral, cuando se administra una cantidad eficaz a un sujeto humano que lo necesita. Reducir la incidencia de fractura incluye reducir la probabilidad o incidencia real de fractura para un sujeto humano en comparación con una población control no tratada.

5 Además, un anticuerpo de la invención puede ser útil para el tratamiento de afecciones, enfermedades o trastornos en los que la presencia de esclerostina provoca o contribuye a efectos patológicos no deseados o una disminución de los niveles de esclerostina o de la bioactividad de esclerostina tiene un beneficio terapéutico en sujetos humanos. Dichas afecciones, enfermedades o trastornos incluyen, pero no se limitan a, osteoporosis, osteopenia, artrosis, dolor asociado con artrosis, enfermedad periodontal o mieloma múltiple. Los sujetos pueden ser hombres o mujeres. Preferentemente, un sujeto humano está en riesgo de fractura de hueso vertebral y/o no vertebral, más preferentemente un sujeto humano está en riesgo de, o padeciendo, osteoporosis. Preferentemente, el sujeto humano es una mujer y más preferentemente una mujer en riesgo de o que tiene osteoporosis post-menopáusica. Se contempla que el procedimiento de la invención puede beneficiar a un sujeto en cualquier estadio de la osteoporosis.

20 Adicionalmente, se contempla el uso de un anticuerpo de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente.

Se pretende que los términos "tratamiento" y "tratar" se refieran a todos los procedimientos en los que puede haber una ralentización, interrupción, detención, control o parada de la progresión de los trastornos descritos en el presente documento, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas del trastorno.

25 "Tratamiento", como se usa en el presente documento, incluye la administración de un compuesto de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero, en particular en un ser humano, e incluye: (a) inhibir la progresión adicional de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (b) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o trastorno o aliviar los síntomas o complicaciones del mismo. Se pueden ajustar los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o incrementar la dosis de forma proporcional según se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

Composición farmacéutica

35 Se puede incorporar un anticuerpo de la invención en una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto humano. Se puede administrar un anticuerpo de la invención a un sujeto humano solo o en combinación con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable en dosis individuales o múltiples. Dichas composiciones farmacéuticas están diseñadas para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado y se usan diluyentes, vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de dispersión, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares, según sea apropiado. Dichas composiciones se pueden diseñar de acuerdo con técnicas convencionales divulgadas, por ejemplo, en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona un compendio de técnicas de formulación como se conocen generalmente por los médicos. Los vehículos adecuados para las composiciones farmacéuticas incluyen cualquier material que, cuando se combina con un anticuerpo monoclonal de la invención, retiene la actividad de la molécula y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de la presente invención se puede administrar a un sujeto en riesgo de o que presenta patologías como se describen en el presente documento, por ejemplo, osteoporosis, artrosis u otros trastornos degenerativos óseos, usando técnicas de administración estándar.

50 Una composición farmacéutica de la invención contiene preferentemente una "cantidad eficaz" de un anticuerpo de la invención. Una cantidad eficaz se refiere a una cantidad necesaria (a dosificaciones y durante periodos de tiempo y para los medios de administración) para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, se compensa con los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una cantidad eficaz es al menos la dosis mínima, pero menos de una dosis tóxica, de un agente activo que es necesaria para impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Dicho de otra forma, una cantidad eficaz o cantidad

terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención es una cantidad que, en mamíferos, preferentemente seres humanos, (i) incrementa al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o resistencia ósea, o (ii) trata una afección, trastorno o enfermedad en el que la presencia de esclerostina provoca o contribuye a un efecto patológico no deseado, o (iii) produce una disminución en los niveles de esclerostina o resultados de bioactividad de esclerostina en un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, preferentemente un ser humano, incluidos, pero no limitados a, osteoporosis, osteopenia, artrosis, artritis reumatoide, enfermedad periodontal o mieloma múltiple.

Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para un sujeto cualquiera dependen de muchos factores, incluidos la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. La dosis puede variar además dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; preferentemente de 1 a 100 µg; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, en especial considerando los factores mencionados anteriormente. Un régimen de dosificación parenteral diario puede ser de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 0,3 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. El progreso se puede monitorizar por evaluación periódica, y la dosis ajustada en consecuencia.

Estas cantidades sugeridas de anticuerpo están sometidas a un gran criterio terapéutico. El factor clave en la selección de una dosis apropiada y su planificación es el resultado obtenido. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se esté tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del anticuerpo, el tipo particular de anticuerpo, el procedimiento de administración, la planificación de administración y otros factores conocidos por los médicos.

La vía de administración de un anticuerpo de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se pueden incorporar en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. Se prefiere la administración parenteral por inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea. La inyección subcutánea es la más preferente. Los vehículos adecuados para dichas inyecciones son bien conocidos en la técnica.

Típicamente, la composición farmacéutica debe ser estéril y estable en condiciones de fabricación y almacenamiento en el envase proporcionado, incluyendo, por ejemplo, un vial sellado, jeringuilla u otro dispositivo de administración, por ejemplo, una pluma. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas se pueden filtrar de forma estéril después de preparar la formulación, o se pueden preparar de otro modo microbiológicamente aceptable.

Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con propósitos ilustrativos, y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

35 Ejemplos

Ejemplo 1 Ensayo ELISA

Se usa este ensayo para detectar y cuantificar la esclerostina en muestras de suero humano hasta un límite de detección inferior de 0,4 ng/ml. El anticuerpo 86 es el anticuerpo de captura, mientras que el anticuerpo 88 es el anticuerpo de detección (véase la tabla 1 para las secuencias de anticuerpos).

40 Se recubren los pocillos internos de una placa de 96 pocillos con 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de longitud completa 86 a una concentración de 0,5 µg/ml en carbonato de sodio 0,5 M a pH 9,6 ("tampón de recubrimiento"). Se sella la placa y se incuba durante la noche a 4 °C. A continuación, se lava la placa tres veces con TBST "tampón de lavado" (Tris-HCl 0,4 M, NaCl 3 M, Tween 20 al 0,1 %). A continuación, se añaden 200 µl de tampón de bloqueo de caseína en PBS (Pierce, n.º 37528) por pocillo y se incuba la placa durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se lava la placa dos veces en tampón de lavado para retirar la solución de bloqueo.

50 Para generar una curva estándar, se prepara esclerostina humana a una concentración de 0,35 mg/ml en tampón de bloqueo de caseína y se diluye en serie dos veces (de 1,25 ng/ml a 0 ng/ml) en suero humano agrupado al 5 % en tampón de bloqueo de caseína en PBS. El suero humano se pasa por una columna de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-esclerostina 86 para retirar cualquier esclerostina que pueda haber quedado presente de forma endógena en el suero .

Se añaden cien microlitros de muestras (suero al 5 % en tampón de bloqueo de caseína) o estándares a pocillos por duplicado y a continuación se incuba la placa a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación se lavan las placas 5 veces con tampón de lavado.

55 Se añaden por pocillo cien microlitros de anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de longitud completa 88) que se ha biotinilado con el kit de biotina Pierce EZ link NHS-LC. Se incuba la placa a

temperatura ambiente durante una hora y a continuación se lava cuatro veces con tampón de lavado. Se diluye estreptavidina-peroxidasa de rábano picante 1:2000 en tampón de bloqueo de caseína en PBS hasta una concentración final de 0,5 µg/ml, a continuación se añaden 100 µl por pocillo, se incuba a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se lava 7 veces con tampón de lavado. Se añade sustrato OPD (Sigma P8806) a 100 µl/pocillo y se deja que continúe la reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación se termina la reacción añadiendo 100 µl/pocillo de HCl 1 N. Se lee la placa a DO 490 nm.

Ejemplo 2 Neutralización - ensayo de fosfatasa alcalina específico de hueso

La fosfatasa alcalina específica de hueso es un indicador bioquímico de la actividad de osteoblastos. El ensayo de fosfatasa alcalina específico de hueso descrito en el presente documento se basa en la capacidad de esclerostina para disminuir los niveles de fosfatasa alcalina estimulada por BMP-4 y Wnt3a en la línea celular murina multipotencial, C2C12, mientras que un anticuerpo que neutraliza la actividad de esclerostina daría como resultado un incremento dependiente de la dosis de la actividad de fosfatasa alcalina en este ensayo. Wnt3a y BMP-4 son factores de crecimiento osteogénicos.

Se plaquean células C2C12 (ATCC, CRL 1772) a 3000-5000 células por pocillo en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos en medio MEM complementado con suero fetal bovino al 5 %, a continuación se incuba a 37 °C en CO₂ al 5 % durante la noche. Se diluye el anticuerpo que se va a someter a prueba en medio condicionado con 0,5X Wnt3a hasta varias concentraciones finales. A continuación se retira el medio de las células en la placa de cultivo de tejido y se añaden 150 µl por pocillos de una solución premezclada de anticuerpo-BMP4-esclerostina (humano o macaco de Java) en la que el anticuerpo está a una concentración final de 30 µg/ml a 0,5 µg/ml, BMP-4 está a una concentración final de 25 ng/ml y la proteína esclerostina está a una concentración final de 1,0 µg/ml y el medio condicionado está a una concentración 0,5X. A continuación se incuba la placa a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 72 horas. Se retira el medio de las células en la placa de cultivo de tejido, se lavan las células una vez con PBS, a continuación la placa de células se congela y se descongela tres veces alternando entre -80 °C y 37 °C.

Se prepara el medio condicionado con Wnt3a haciendo crecer células L-Wnt-3A y células L de control (ATCC CRL-2647 y CRL-2648, respectivamente) durante cuatro días, de una distribución 1:20 de células confluentes, en DMEM con FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM. Se filtra el medio recogido a través de membranas de nailon de 0,2 micrones y se almacenan a largo plazo a -20 °C o a corto plazo a 4 °C.

Se mide la actividad de fosfatasa alcalina añadiendo 150 µl por pocillo de sustrato de fosfatasa alcalina (1-etapa PNPP, Pierce n.º 37621). A continuación se incuba la placa de células durante 60 minutos a temperatura ambiente, momento en el que se lee DO a 405 nm para determinar la actividad de fosfatasa alcalina. Los valores de neutralización de anticuerpo CI₅₀ informados en la tabla 2 a continuación son promedios de 2 experimentos separados. Los cálculos de CI₅₀ se realizan usando SigmaPlot Regression Wizard con una ecuación de ajuste de 4 parámetros sigmoideo.

Tabla 2

Anticuerpo	CI ₅₀ (nM) Usando esclerostina humana	CI ₅₀ (nM) Usando esclerostina Cyno
89	25,1	34,4
88	20,2	23,7
86	25,5	31,6

Ejemplo 3 Unión por afinidad

Se realizan estudios de unión de equilibrio entre un anticuerpo anti-esclerostina y esclerostina humana, no macaco de Java ("cyno") o bien de rata en un instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Instruments Inc.) en condiciones controladas para K_D. Con esta técnica, se mezcla una concentración fijada de anticuerpo por debajo de su K_D con varias concentraciones de proteína esclerostina y se deja que se llegue al equilibrio. La fracción de anticuerpo no unido, libre, que permanece en solución se sondea exponiendo brevemente esta mezcla equilibrada a perlas recubiertas con esclerostina seguido de detección con un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente. Típicamente, se mezclan 2 pM de un anticuerpo anti-esclerostina que se va a someter a prueba con concentraciones variables de esclerostina humana, de cyno, o rata comenzando a 2-50 nM y realizando diluciones de tres veces en serie en tampón de unión (solución salina tamponada con fosfato 1X, pH 7,4, azida de sodio al 0,02 % y 1 mg/ml de seroalbúmina bovina) que contiene 2 pM del anticuerpo que se va a someter a prueba. Se deja que estas soluciones lleguen al equilibrio durante dos días a 25 °C. La cantidad de anticuerpo unido se sondea usando perlas de azlactona recubiertas con esclerostina humana (Sapidyne Instruments Inc.). Estas perlas se preparan haciendo reaccionar 50 mg de perlas de azlactona secas con 50 mcg/ml de esclerostina humana en un tampón de carbonato de sodio 50 mM a pH 9,0-9,6 con rotación durante la noche. A continuación se deja que las perlas sedimenten y se reemplaza el sobrenadante con solución de bloqueo (Tris 1 M, pH 8,0, más 10 mg/ml de seroalbúmina bovina) y se rotan durante una hora. Se diluye esta reserva de perlas 20 veces en tampón de unión y se usa en el plazo de tres

días. Se usa un instrumento KinExA 3000 equilibrado a temperatura ambiente (ca 25 °C) para los estudios de unión. Típicamente, se pasan 6,25 ml de la solución equilibrada de anticuerpo/esclerostina sobre una columna de relleno de perlas de azlactona con esclerostina humana a un caudal de 0,25 ml/minuto, a continuación se aclara con tampón de desplazamiento (solución salina tamponada con fosfato 1X, pH 7,4 con azida de sodio al 0,02 %). Se cuantifica la fracción de anticuerpo anti-esclerostina libre unido a estas perlas midiendo la fluorescencia que resulta de un anticuerpo secundario marcado inyectado (anticuerpo Fab'2 anti-humano de cabra marcado con Cy5). Se analizan dos muestras duplicadas para cada condición y se determina K_D ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 usando el programa informático KinExA Pro. Se informa del promedio de los valores de K_D a 25 °C en la tabla 3 a continuación.

5

10

Tabla 3 - Afinidad

Anticuerpo	K_D (pM) esclerostina humana	K_D (pM) esclerostina de rata	K_D (pM) esclerostina Cyno
89	0,3	0,4	1,4
88	2,2	2,2	75
86	0,6	0,1	1,0

Ejemplo 4 Ensayo de calceína in vivo:

El ensayo de calceína en ratas permite la evaluación directa de la formación ósea durante un periodo de tiempo corto (10 días) y el efecto de un anticuerpo de la invención sobre la formación ósea. La calceína es una marca de fluorocromo que se incorpora en la matriz ósea durante la formación de hueso nuevo. La medida cuantitativa de calceína refleja el grado de formación ósea inducido por agentes farmacológicos. Se usan ratas Sprague-Dawley hembra de seis meses de edad (n=6/grupo de dosis). Se dosifican las ratas cada 3 días por inyección subcutánea (días 0, 3 y 6) con 1 mg/kg o 6 mg/kg de anticuerpo en vehículo PBS, o con 10 µg/kg de PTH diariamente o con 6 mg/kg de IgG humana como control negativo. La calceína se inyecta por vía subcutánea el día 7 y las ratas se sacrifican el día 10. Se recogen las tibias y se cortan para evaluar la formación ósea trabecular (metáfisis distal) o formación ósea cortical (diáfisis tibial) y se someten a desmineralización y cuantificación de fluorocromos de la calceína total. Los valores mostrados en la tabla 4 a continuación son promedios con el control de IgG humana fijado en 1,0. Los datos demuestran que la administración de anticuerpos de la invención da lugar a la formación ósea tanto trabecular como cortical.

15

20

25

Tabla 4

Anticuerpo	Dosis mg/kg	Calceína trabecular relativa	Calceína cortical relativa
Hu IgG	6	1,00	1,00
PTH	0,01	1,45	1,89
89	6	1,97	1,88
88	6	1,90	2,18
86	6	1,77	2,78

Ejemplo 5 Artrosis

La expresión de SOST se limita principalmente al tejido óseo. Sin embargo, los solicitantes determinan en el presente documento que otro tejido con expresión de SOST significativa es el cartílago medido por PCR en tiempo real. La expresión en cartílago de SOST también se observa usando una matriz de ARN aislada del cartílago de pacientes normales o con artrosis. Además, en la matriz, la expresión de SOST se incrementa con relación a la gravedad de la artrosis de modo que la expresión en el cartílago de artrosis leve es mayor que el control, grave es mayor que leve, y quirúrgica grave (retirado de cirugía de artroplastia de rodilla) es mayor que todos los demás lo que demuestra una correlación de artrosis y expresión de SOST. Se puede usar un anticuerpo específico para esclerostina para tratar la artrosis.

30

35

Se somete a un anticuerpo quimérico anti-esclerostina con una región variable murina en una región Fc de rata, anticuerpo 789 con SEQ ID NO:42 para cadena pesada y SEQ ID NO:43 para cadena ligera, para determinar la capacidad de bloquear el dolor en las articulaciones en el modelo MIA de artrosis. La región variable de este

anticuerpo era la secuencia original para la generación del anticuerpo humanizado 89 (HCVR con SEQ ID NO: 16 y LCVR con SEQ ID NO: 19). Ambos, el anticuerpo humanizado 89 y el anticuerpo quimérico 789 se unen al mismo epítipo. El modelo de artrosis utiliza inyecciones de monoyodoacetato (MIA) directamente en la articulación de la rodilla para inducir un proceso similar a la OA que implica un dolor mediado por citocinas e inflamatorio y un proceso de destrucción del cartílago. Se inyecta la rodilla contralateral de una rata sólo con solución salina, y se mide el dolor como la diferencia en el soporte de peso de las 2 patas traseras.

El experimento MIA n.º 1 utiliza ratas Lewis macho jóvenes (7-8 semanas de edad) en el "modo de prevención" en el que se administra el anticuerpo anti-esclerostina antes de las inyecciones MIA. El día antes de las inyecciones MIA, se inyectan las ratas con 10 mg/kg de anticuerpo anti-esclerostina i.p. o bien 10 mg/kg de IgG de control, o bien PBS (n = 6 por grupo). Al día siguiente, se anestesian las ratas y se inyectan las rodillas derechas con 0,3 mg de yodoacetato de monosodio disuelto en 50 ul de solución salina estéril al 0,9 %. Se inyectan las rodillas izquierdas sólo con solución salina. Las inyecciones son a través del ligamento rotuliano usando una jeringuilla de insulina con una aguja 28G cubierta con una envoltura de tubo de plástico para permitir una penetración de sólo 5 mm en la articulación de la rodilla.

Se toman medidas del dolor 2 y 7 días después de la inyección de MIA (3 y 8 días después de la inyección de anticuerpo). Después de la medida del dolor el día 7, se administra una segunda dosis de inyección del anticuerpo o del control. A continuación se toman medidas del dolor adicionales 10 y 14 días después de MIA (3 y 7 días después de la segunda inyección del anticuerpo).

Se mide el dolor por la diferencia en el soporte de peso de las patas inyectadas con el uso de un comprobador de incapacitación. Se colocan las ratas en una caja Perspex con sus patas traseras sobre sensores de presión. Cuando las ratas están quietas de forma fiable, se toma una lectura de 1 segundo, seguido de 2 lecturas adicionales y se calcula el promedio. Se resta el peso colocado sobre la pata inyectada con MIA del de la pata inyectada con solución salina para dar la diferencia en soporte de peso.

Se observa una disminución estadísticamente significativa en el dolor con el anticuerpo anti-esclerostina en comparación con control de IgG (y PBS) los días 7, 10 y 14 después de la administración de MIA (tabla 5 a continuación). Los valores son diferencias de soporte de peso entre la pata inyectada con MIA y la pata inyectada con solución salina en gramos (error estándar de la media).

Se lleva a cabo un segundo experimento con MIA con ratas más mayores (27 semanas de edad) y en el "modo de tratamiento" en el que se administra el anticuerpo después de que se inyecte MIA. Las ratas reciben inyecciones de MIA o de solución salina de control como antes y después, 6 días después se inyectan i.p. 10 mg/kg de anticuerpo anti-esclerostina, IgG de control, o PBS (n = 6 por grupo). Los días 8 y 15 después de MIA (2 y 9 días después del anticuerpo) se toman medidas del dolor como antes. El día 16 después de MIA, se administra una segunda dosis del anticuerpo anti-esclerostina y de los controles, y el día 21 (5 días después de la segunda dosis de anticuerpo) se recogen de nuevo medidas del dolor.

En el primer punto temporal después de la administración del anticuerpo anti-esclerostina (día 8 post-MIA) no se produce efecto del anticuerpo sobre el dolor, pero 7 días después, se produce una tendencia hacia una disminución en el dolor medido por diferencias de soporte de peso entre la pata inyectada con MIA y la pata inyectada con solución salina en gramos. También se observa la tendencia hacia una reducción en el dolor con anticuerpo anti-esclerostina 5 días después de la segunda dosificación de anticuerpo. El anticuerpo quimérico 789 difirió del control de IgG con un valor p de 0,06 y 0,08 los días 15 y 21, respectivamente. Juntos, estos resultados demuestran que el dolor en las articulaciones que resulta del proceso de enfermedad por MIA establecido se interrumpe administrando anticuerpo anti-esclerostina neutralizante.

Ejemplo 6 Estudios en ratas OVX

La rata ovariectomizada (OVX) es un modelo bien reconocido para la osteoporosis postmenopáusica. En este estudio, se examinan los efectos de anticuerpos anti-esclerostina de la invención que comprenden una región variable murina y una Fc de rata en la rata OVX.

Se ovariectomizan ratas Sprague-Dawley hembra de seis meses de edad y se deja que pierdan hueso durante 1 mes antes de la dosificación. No se ovariectomiza un grupo de ratas (n=8) pero se operan de forma simulada para su comparación con las ratas ovariectomizadas. Se aleatorizan todas las ratas OVX en grupos de tratamiento (n=7 cada uno) y se tratan con PTH (1-38), control de IgG (10 mg/kg) o bien 10 mg/kg de anticuerpo anti-esclerostina quimérico (anticuerpo 788 con cadena pesada de SEQ ID NO: 40 y cadena ligera de SEQ ID NO:41 [la región variable de este anticuerpo fue la secuencia original para la generación del anticuerpo humanizado 88]; anticuerpo 789 con cadena pesada de SEQ ID NO: 42 y cadena ligera de SEQ ID NO: 43) durante un total de 58 días. Se dosifican todos los anticuerpos por vía subcutánea una vez cada 3 días, mientras que se dosifica PTH (1-38) diariamente por vía subcutánea a 10 mg/kg. Tras sacrificarlas, se retiran los fémures y las vértebras para el análisis de tomografía axial computarizada cuantitativa (TAC) usando un escáner TAC para medir el fémur distal (hueso trabecular) y la diáfisis media (hueso cortical) así como la 5ª vértebra lumbar. Se colocan los huesos en arcilla de moldeado para medidas reproducibles y se toman barridos de los fémures a 2 mm desde el extremo de la epífisis

(fémur distal) o 10 mm de la epífisis (diáfisis femoral).

Se realizan medidas vertebrales con L-5 escaneada a partir de una estructura "V" marcada en la vértebra. Se calculan los datos por el programa informático de fabricación SYS-C320-V 1,5. Se miden las propiedades biomecánicas de la diáfisis femoral, la vértebra L-5 y el cuello femoral postnecropsia de acuerdo con: Turner CH, Burr DB, Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 14(4):595-608, 1993. Se miden las propiedades mecánicas de la diáfisis para fémures izquierdos intactos usando una flexión en 3 puntos con carga aplicada en el punto intermedio entre dos soportes separados 15 mm. Se colocan los fémures de forma que el punto de carga esté aproximadamente 7,5 mm proximal desde el espacio poplíteo distal y la flexión se produce sobre el eje medial-lateral. Se someten a prueba los especímenes en un baño de solución salina a 37 °C. Se registran las curvas de desplazamiento de carga a una velocidad de cruce de 10 mm/min usando una máquina de prueba de materiales (modelo: 1/S, MTS Corp, Minneapolis, MN) y se analizan usando el programa informático TestWorks 4 (MTS Corp.) para calcular la carga máxima. Se analizaron las propiedades mecánicas de la vértebra L-5 después de retirar los procesos posteriores y se pusieron en paralelo los extremos del centro usando una sierra de diamante de fabricación de obleas (Buehler Isomet, Evanston, IL). Se cargan los especímenes vertebrales en compresión, usando el dispositivo de prueba de materiales y se analizan usando el programa informático TestWorks 4 (MTS Corp.). Para las medidas de cuello femoral, se coloca el fémur verticalmente en un soporte de montaje con el proximal hacia arriba y se aplicó carga hacia abajo en el punto medio de la cabeza femoral. Se realizó el análisis con el programa informático TestWorks 4 (MTS Corp.). El promedio de los valores y el error estándar de los valores medios están en las tablas 5 y 6 a continuación. Los datos demuestran que los anticuerpos quiméricos 788 y 789 incrementan la densidad mineral ósea ("DMO"), el contenido mineral óseo ("CMO") y la resistencia ósea (carga máxima) en ratas OVX.

Tabla 5

Tratamiento	DMO fémur dist. (mg/cm ³)	CMO fémur dist(mg)	DMO fémur med. (mg/cm ³)	CMO fémur (mg)	DMO vértebra I (mg/cm ³)	CMO vértebra I (mg)
Simulado	*602	74,1	898	61,2	*587	165
IgG	528	68,6	852	60,5	526	149
PTH	*744	*95,3	*925	63,2	*642	*180
788	*675	*91,4	*946	*68,6	*703	*209
789	*710	*94,9	*951	*68,4	*721	*209

* Incremento estadísticamente significativo del control de IgG, p<0,05, procedimiento Dunnett.

Tabla 6

Tratamiento	Carga máxima del cuello femoral (Newtons)	Carga máxima del fémur medio (Newtons)	Carga máxima vertebral (Newtons)
Simulado	96,5	134	236
IgG	100,4	126	188
PTH	117,6	128	*328
2492788	*131,6	*147	*431
2492789	*147,5	*153	*432

* Incremento estadísticamente significativo del control de IgG, p<0,05, procedimiento Dunnett.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly y Company

Korytko, Andrew I.

Marquis, David Matthew

Smith, Eric Michael

Swanson , Barbara Anne

<120> Anticuerpos anti-esclerostina

5 <130> X17563

<150> US 60/895813

<151> 20/03/2007

10 <160> 43

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 213

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 446 293 T3

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

<210> 2

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 2

ES 2 446 293 T3

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

ES 2 446 293 T3

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp Pro Glu Val Glu
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Glu Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Glu Glu Glu Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Glu
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 3

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

ES 2 446 293 T3

<223> Construcción miscelánea

<400> 3

G n Val G n Leu Val G n Ser G y Ala G u Val Lys Lys Pro G y Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Val Ser G y Phe Pro Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Phe G n His Trp Val Arg G n Ala Pro G y Lys G y Leu G u Trp Met
 35 40 45

G y Trp Ser Asp Pro G u Ile G y Asp Thr G u Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60

G n G y Arg Val Thr Met Thr G u Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met G u Leu Ser Ser Leu Arg Ser G u Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr G y Asp Thr Thr Tyr Lys Phe Asp Phe Trp G y G n G y Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys G y Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Oys Ser Arg Ser Thr Ser G u Ser Thr Ala Ala Leu G y
 130 135 140

Oys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro G u Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser G y Ala Leu Thr Ser G y Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu G n
 165 170 175

Ser Ser G y Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu G y Thr Lys Thr Tyr Thr Oys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val G u Ser Lys Tyr G y Pro Pro Oys
 210 215 220

Pro Pro Oys Pro Ala Pro G u Phe Leu G y G y Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro G u
 245 250 255

ES 2 446 293 T3

Val Thr Oys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Oys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Oys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 4

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Oys Lys Gly Ser Asp Phe Glu Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

ES 2 446 293 T3

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Gly
450

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Gln Trp Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

ES 2 446 293 T3

			85					90						95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
			100					105					110			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
		115					120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Oys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
	130					135					140					
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
145					150					155					160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				165					170					175		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
			180					185					190			
Ala	Oys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
		195					200					205				
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Oys											
	210															

<210> 6

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 6

ES 2 446 293 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala
 20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 7

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 7

ES 2 446 293 T3

G l u I l e V a l L e u T h r G n S e r P r o A l a T h r L e u S e r L e u S e r P r o G l y
 1 5 10 15
 G l u A r g A l a T h r L e u S e r O y s S e r A l a S e r S e r S e r V a l S e r T y r I l e
 20 25 30
 H i s T r p T y r G n G n L y s P r o G l y G n A l a P r o A r g L e u L e u I l e T y r
 35 40 45
 S e r T h r S e r G l u L e u A l a S e r G l y I l e P r o A l a A r g P h e S e r G l y S e r
 50 55 60
 G l y S e r G l y T h r A s p P h e T h r L e u T h r I l e S e r S e r L e u G l u P r o G l u
 65 70 75 80
 A s p P h e A l a V a l T y r T y r O y s G n G n L e u S e r H i s L e u P r o L e u T h r
 85 90 95
 P h e G l y G l y G l y T h r L y s V a l G l u I l e L y s A r g T h r V a l A l a A l a P r o
 100 105 110
 S e r V a l P h e I l e P h e P r o P r o S e r A s p G l u G n L e u L y s S e r G l y T h r
 115 120 125
 A l a S e r V a l V a l O y s L e u L e u A s n A s n P h e T y r P r o A r g G l u A l a L y s
 130 135 140
 V a l G n T r p L y s V a l A s p A s n A l a L e u G n S e r G l y A s n S e r G n G l u
 145 150 155 160
 S e r V a l T h r G l u G n A s p S e r L y s A s p S e r T h r T y r S e r L e u S e r S e r
 165 170 175
 T h r L e u T h r L e u S e r L y s A l a A s p T y r G l u L y s H i s L y s V a l T y r A l a
 180 185 190
 O y s G l u V a l T h r H i s G n G l y L e u S e r S e r P r o V a l T h r L y s S e r P h e
 195 200 205
 A s n A r g G l y G l u O y s
 210

<210> 8

<211> 1332

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 8

ES 2 446 293 T3

caggt gcagc t ggt gcagt c t ggggct gag gt gaagaagc ct gggf cct c agt gaaggt t 60
 t cct gcaagg cat ct ggal a cacat t cact gact act t t c t gaact gggf gcgacaggcc 120
 cct ggacaag ggc t t gagi g gal gggaaact at t t at cct t accat gat gg t act acct ac 180
 t ct cagaagi t caagggcag agt cacat t accgcggaaca aat ccacgag cacagcct ac 240
 at ggagct ga gcagcct gag at ct gaggac acggccgt gi at t act gt gc gagagaggaa 300
 gaggat ggt c agt t cgact a ct ggggcca ggaaccacgg t caccgt ct c ct cagcct cc 360
 accaagggcc cal cggt ct t cccgct agcg cctt gct cca ggagcacct c cgagagcaca 420
 gccgccct gg gct gcct ggt caaggact ac t t ccccgaac cggt gacggf gt cgt ggaac 480
 t cagggcccc t gaccagcgg cgt gcacacc t t cccggct g t cct acagt c ct caggact c 540
 t act cctt ca gcagcgt ggt gaccgt gcc t ccagcagct t gggcacgaa gacct acacc 600
 t gcaacgt ag at cacaagcc cagcaacacc aaggt ggaca agagagt t ga gi ccaaat at 660
 ggt ccccat gccaccct g cccagcacct gagt t cct gg ggggacct c agt ct t cct g 720
 t t cccccaa aacccaagga cact ct cal g at ct cccgga cccct gaggt cacgt gcgt g 780
 gt ggt ggacg t gagccagga agaccccgag gt ccagt t ca act ggt acgt ggat ggcgt g 840
 gaggt gcat a at gccaaagac aaagccgcgg gaggagcagt t caacagcac gt accgt gt g 900
 gt cagcgt cc t caccgt cct gcaccaggac t ggct gaacg gcaaggagt a caagt gcaag 960

 gt ct ccaaca aaggcct ccc gt cct ccat c gagaaaacca t ct ccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggt gt a caccct gcc ccat cccagg aggagat gac caagaaccag 1080
 gt cagcct ga cct gcct ggt caaaggct t c t accccagcg acat cgccgt ggagt gggaa 1140
 agcaat gggc agccggagaa caact acaag accacgcct c ccgt gct gga ct cggacggc 1200
 t cct t ct t cc t ct acagcag gct aaccgt g gacaagagca ggt ggcagga ggggaat gt c 1260
 t t ct cat gct ccgt gat gca t gaggct ct g cacaaccaact acacacagaa gagcct ct cc 1320
 ct gt ct ct gg gt 1332

<210> 9

<211> 1332

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 9

ES 2 446 293 T3

caggt t cagc t ggt gcagt c t ggggct gag gt gaagaagc ct ggggcct c agt gaaggt c 60
t cct gcaagg t t t ceggct t ccccat t aag gacacct t t c agcact ggg t gcgacaggct 120
cct ggaaaag ggct t gagt g gat gggat gg agcga t cct g agat cgg t ga t act gaat at 180
gcct cgaagt t ccagggcag agt caccat g accgaggaca cat ct acaga cacagcct ac 240
at ggagct ga gcagcct gag at ct gaggac acggccgt gt at t act gt gc aacaggcgac 300
accacat aca agt t t gact t ct gggggcaa gggaccacgg t caccgt ct c ct cagcct cc 360
accaagggcc cat cgg t ct t cccgt agcg cct gct cca ggagcacct c cgagagcaca 420
gccgcct gg gct gcct ggt caaggact ac t t cccgaac cgg t gacgg t gt cgt ggaac 480
t caggcgccc t gaccagcgg cgt gcacacc t t cccggct g t cct acagt c ct caggact c 540
t act cct ca gcagcgt ggt gaccgt gcc t ccagcagct t gggcacgaa gacct acacc 600
t gcaacgt ag at cacaagcc cagcaacacc aaggt ggaca agagagt t ga gt ccaaat at 660
gg t ccccat gccaccct g cccagcacct gagi t cct gg ggggacct c agt ct t cct g 720
t t cccccaa aacccaagga cact ct cat g at ct cccgga cccct gaggt cacgt gcgt g 780
gt ggt ggacg t gagccagga agaccccgag gt ccagt t ca act ggt acgt ggal ggcgt g 840
gaggt gcat a at gccaaagac aaagccgagg gaggagcagt t caacagcac gt accgt gt g 900
gt cagcgt cc t caccgt cct gcaccaggac t ggct gaacg gcaaggagt a caagt gcaag 960
gt ct ccaaca aaggcct ccc gt cct ccat c gagaaaacca t ct ccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagagc cacaggt gt a caccct gcc ccat cccagg aggagat gac caagaaccag 1080
gt cagcct ga cct gcct ggt caaaggct t c t accccagcg acat cgcct ggagt gggaa 1140
agcaat gggc agccggagaa caact acaag accacgcct c ccgt gct gga ct cggacggc 1200
t cct t ct t cc t ct acagcag gct aaccgt g gacaagagca ggt ggcagga ggggaat gt c 1260
t t ct cat gct ccgt gat gca t gaggct ct g cacaaccact acacacagaa gagcct ct cc 1320

ct gt ct ct gg gt 1332

<210> 10

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 10

ES 2 446 293 T3

gaggt gcagc t ggt gcagt c t ggagcagag gt gaaaaagc ccggggagt c t ct gaagat c 60
t cct gt aagg gt t ct gact t cgagat t aaa gact act at a t acat t gggg gcgccagat g 120
cccgggaaag gcct ggagt g gat ggggcag at t gat gct g aggat ggt ga aact gaat at 180
gccccgaggt t ccagggcca ggt caccat c t cagccgaca agt ccat cag caccgcct ac 240
ct gcagt gga gcagcct gaa ggct cggac accgccat gt at t act gt gc gagagagggt 300
t at t act acg at gggcgcca ct act ggt ac t t cgal gt ct ggggccaagg gaccacggt c 360
accgt ct cct cagcct ccac caagggccca t cggf ct t cc cgct agcgcc ct gct ccagg 420
agcacct ccg agagcagcgc cgccct gggc t gct ggt ca aggact act t ccccgaaccg 480
gt gacggt gt cgt ggaact c aggcgcct g accagcggcg t gcacacct t cccggct gt c 540
ct acagt cct caggact ct a ct ccct cagc agcgt ggt ga ccgt gccct c cagcagct t g 600
ggcacgaaga cct acacct g caacgt agat cacaagccca gcaacaccaa ggt ggacaag 660
agagt t gagt ccaaat at gg t cccccat gc ccacct gcc cagcacct ga gt t cct gggg 720
ggacat cag t ct t cct gt t cccccaaaa cccaaggaca ct ct cat gat ct cccggacc 780
cct gaggt ca cgt gcgt ggt ggt ggacgt g agccaggaag accccgaggt ccagt t caac 840
t ggt acgt gg at ggcgt gga ggt gcat aat gccaaagaca agccgcggga ggagcagt t c 900
aacagcacgt accgt gt ggt cagcgt cct c accgt cct gc accaggact g gct gaacggc 960
aaggagt aca agt gcaaggt ct ccaacaaa ggct cccgt cct ccat cga gaaaacct c 1020
t ccaaagcca aagggcagcc ccgagagcca caggt gt aca cct gccccc at cccaggag 1080
gagat gacca agaaccaggt cagcct gacc t gct ggt ca aaggct t ct a ccccagcgac 1140
at cgccgt gg agt gggaaag caat gggcag ccggagaaca act acaagac cacgcct ccc 1200
gt gct ggact ccgacggct c ct t ct t cct c t acagcaggc t aaccgt gga caagagcagg 1260
t ggcaggagg ggaat gt ct t ct cat gct cc gt gat gcat g aggct ct gca caaccact ac 1320
acacagaaga gcct ct ccct gt ct ct gggf 1350

<210> 11

<211> 642

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 11

gacat ccaga t gaccagc c t ccat cct ct ct gt ct gcat ct gt aggaga cagagt cacc 60

ES 2 446 293 T3

at cact t gca gt gcaagt ca gggcat t cag t ggt at t t aa act ggt at ca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ct aagct cct gat ct at t ac acat caagt t t acact cagg ggt cccat ca 180
 aggt t cagt g gcagt ggat c t gggacagat t t cact ct ca ccat cagcag t ct gcaacct 240
 gaagat t t t g caact t act a ct gt cagcag cat agt aaac t t cct cggac gt t cggcgga 300
 gggaccaagg t ggagat caa acggact gt g gct gcacat ct gt ct t cat ct t cccgcca 360
 t ct gat gagg agt t gaaat c t ggaact gcc t ct gt t gt gt gcct gct gaa t aact t ct at 420
 cccagagagg ccaaagt aca gt ggaaggt g gat aacgccc t ccaat cggg t aact cccag 480
 gagagt gt ca cagagcagga cagcaaggac agcacct aca gcct cagcag caccct gacg 540
 ct gagcaaag cagact acga gaaacacaaa gt ct acgctt gcgaagt cac ccat cagggc 600
 ct gagct cgc ccgt cacaaa gagct t caac aggggagagt gc 642

<210> 12

<211> 642

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 12

gacat ccaga t gaccagct c t ccat cct cc ct gt ct gcat ct gt aggaga cagagt cacc 60
 at cact t gca aggccagt ca ggal gt gcac act gct gt ag cct ggt at ca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ct aagct cct gat ct at t gg gcat ccaccc ggt ggact gg agt cccat ca 180
 aggt t cagt g gcagt ggat c t gggacagat t t cact ct ca ccat cagcag t ct gcaacct 240
 gaagat t t t g caact t act a ct gt cagcaa t at agcgat t at ccgt ggac gt t cggcgga 300
 gggaccaagg t ggagat caa acggact gt g gct gcacat ct gt ct t cat ct t cccgcca 360
 t ct gat gagg agt t gaaat c t ggaact gcc t ct gt t gt gt gcct gct gaa t aact t ct at 420
 cccagagagg ccaaagt aca gt ggaaggt g gat aacgccc t ccaat cggg t aact cccag 480
 gagagt gt ca cagagcagga cagcaaggac agcacct aca gcct cagcag caccct gacg 540
 ct gagcaaag cagact acga gaaacacaaa gt ct acgctt gcgaagt cac ccat cagggc 600
 ct gagct cgc ccgt cacaaa gagct t caac aggggagagt gc 642

10 <210> 13

<211> 642

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Construcción miscelánea

<400> 13

ES 2 446 293 T3

gaaat t gt gt t gacacagt c t ccagccacc ct gt ct t t gt ct ccagggga aagagccacc 60
 ct ct cct gca gt gccagct c aagt gt aagt t acat ccact ggt accaaca gaaacct ggc 120
 caggct ccca ggct cct cat ct at agcaca t ccagagct gg ct t ct ggcat cccagccagg 180

t t cagt ggca gt ggg t ct gg gacagact t c act ct cacca t cagcagect agagcct gaa 240
 gat t t t gcag t t t at t act g t cagcagct t agt cat ct cc cgct cacgt t cggcggaggg 300
 accaaggt gg agat caaacg aact gt ggct gcacat ct g t ct t cat ct t cccgccat ct 360
 gat gagcagt t gaaat ct gg aact gcct ct gt t gt gt gcc t gct gaat aa ct t ct at ccc 420
 agagaggcca aagt acagt g gaaggt ggat aacgccct cc aat cgggt aa ct cccaggag 480
 agt gt cacag agcaggacag caaggacagc acct acagcc t cagcagcac cct gacgt g 540
 agcaaagcag act acgagaa acacaaagt c t acgcct gcg aagt caccca t cagggcct g 600
 agct cgcccg t cacaaagag ct t caacagg ggagagt gc 639

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val 5 Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 15
 1

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

Phe Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 45
 35 40

Gly Thr Ile Tyr Pro Tyr His 55 Asp Gly Thr Thr Tyr Ser Gln Lys Phe 60
 50 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser 75 Thr Ser Thr Ala Tyr 80
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Glu Glu Asp Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 110
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser 115
 115

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 15

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

<210> 16

10 <211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

15 <400> 16

ES 2 446 293 T3

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

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 17

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

10 <210> 18

<211> 107

ES 2 446 293 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

5 <400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 19

ES 2 446 293 T3

G l u I l e Val Leu Thr G n Ser Pro Al a Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

G l u Arg Al a Thr Leu Ser Cys Ser Al a Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

H i s Trp Tyr G n G n Lys Pro Gly G n Al a Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser G l u Leu Al a Ser Gly Ile Pro Al a Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

G l y Ser G l y Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu G l u Pro G l u
 65 70 75 80

Asp Phe Al a Val Tyr Tyr Cys G n G n Leu Ser H i s Leu Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe G l y G l y G l y Thr Lys Val G l u Ile Lys
 100 105

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 20

G l y Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Leu Asn
 1 5 10

10 <210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Construcción miscelánea

<400> 21

Thr Ile Tyr Pro Tyr H i s Asp Gly Thr Thr Tyr Ser G n Lys Phe Lys
 1 5 10 15

G l y

<210> 22

<211> 9

20 <212> PRT

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Construcción miscelánea

<400> 26

Gly Phe Pro Ile Lys Asp Thr Phe Gln His
1 5 10

<210> 27

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 27

Trp Ser Asp Pro Glu Ile Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln
1 5 10 15

15 Gly

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 28

Gly Asp Thr Thr Tyr Lys Phe Asp Phe
1 5

<210> 29

25 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

30 <400> 29

Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 30

Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr
 1 5

10 <210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Construcción miscelánea

<400> 31

Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 32

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 32

Asp Phe Glu Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

25 <210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 33

G n I l e A s p A l a G u A s p G y G u T h r G u T y r A l a P r o A r g P h e G n
1 5 10 15

G y

<210> 34

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 34

G n I l e A s p A l a G u A s p G y G u T h r G u T y r A l a P r o A r g P h e G n
1 5 10 15

G y

10

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 35

G n I l e A s p A l a G u A s p G y G u T h r G u T y r A l a P r o A r g P h e G n
1 5 10 15

G y

20 <210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Construcción miscelánea

<400> 36

Ser Thr Ser Glu Leu Ala Ser
 1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 37

Gln Gln Leu Ser His Leu Pro Leu Thr
 1 5

10 <210> 38

<211> 322

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Construcción miscelánea

<400> 38

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 1 5 10 15

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 35 40 45

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

ES 2 446 293 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

5 <400> 39

```

ggcccat cgg t ct t cccgct agcgcct gc t ccaggagca cct ccgagag cacagccgcc 60
ct gggct gcc t ggt caagga ct act t cccc gaaccggt ga cggg gt cgt g gaact caggc 120
gccct gacca gggcggt gca cacct t cccg gct gt cct ac agt cct cagg act ct act cc 180
gct cagcagc gt ggt gaccg t gccct ccag cagct t gggc acgaagacct acacct gcaa 240
cgt agat cac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gt t gagt cca aat at ggt cc 300
cccat gccca cctt gccag cacct gagt t cct gggggga ccat cagt ct t cct gt t ccc 360
cccaaaacc aaggacact c t cat gat ct c ccggaccct gaggt cacgt gcgt ggt ggt 420
ggacgt gagc caggaagacc ccgaggt cca gt t caact gg t acgt ggat g gcgt ggaggt 480
gcat aat gcc aagacaaagc cgcgggagga gcagt t caac agcacgt acc gt gt ggt cag 540
cgt cct cacc gt cct gcacc aggact ggct gaacggcaag gagt acaagt gcaaggt ct c 600
caacaaaggc ct cccgt cct ccat cgagaa aacct ct cc aaagccaaag ggcagccccg 660
agagccacag gt gt acacc t gccccat c ccaggaggag at gaccaaga accaggt cag 720
cct gacct gc ct ggt caaag gct t ct accc cagcgacat c gccgt ggagt gggaaagcaa 780
t gggcagccg gagaacaact acaagaccac gcct cccgt g ct ggact ccg acggct cct t 840
ct t cct ct ac agcaggct aa ccgt ggacaa gagcaggt gg caggagggga at gt ct t ct c 900
at gct ccgt g at gcat gagg ct ct gcacaa ccaact acaca cagaagagcc t ct cctt gt c 960
t ct gggt t ga 970
    
```

<210> 40

<211> 444

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 40

```

G u Val G n Leu G n G n Ser Val Al a G u Leu Val Arg Pro G y Al a
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Oys Thr Al a Ser G y Phe Asn Ile Lys Ser Thr
20 25 30
Phe Met His Trp Val Lys G n Arg Pro Asp G n G y Leu G u Trp Ile
35 40 45
G y Trp Ile Asp Pro G u Asn G y Asp Thr G u Tyr Al a Ser Lys Phe
    
```


ES 2 446 293 T3

G u G l y A r g T h r G n V a l P r o H i s V a l T y r T h r M e t S e r P r o T h r L y s
340 345 350

G u G l u M e t T h r G n A s n G l u V a l S e r I l e T h r C y s M e t V a l L y s G l y
355 360 365

P h e T y r P r o P r o A s p I l e T y r V a l G l u T r p G n M e t A s n G l y G n P r o
370 375 380

G n G l u A s n T y r L y s A s n T h r P r o P r o T h r M e t A s p T h r A s p G l y S e r
385 390 400

T y r P h e L e u T y r S e r L y s L e u A s n V a l L y s L y s G l u L y s T r p G n G n
405 410 415

G l y A s n T h r P h e T h r C y s S e r V a l L e u H i s G l u G l y L e u H i s A s n H i s
420 425 430

H i s T h r G l u L y s S e r L e u S e r H i s S e r P r o G l y L y s
435 440

<210> 41

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 41

10

ES 2 446 293 T3

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

<210> 42

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 42

ES 2 446 293 T3

G l u Val G l n Leu G l n G l n Ser G l y A l a G l u H i s Val L y s P r o G l y A l a
 1 5 10 15
 Ser Val L y s Leu Ser O y s Thr A l a Ser Asp P h e A s n I l e L y s Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr I l e H i s Trp Val L y s G l n A r g Thr A l a G l n G l y Leu G l u Trp I l e
 35 40 45
 G l y A r g I l e Asp P r o G l u Asp G l y G l u Thr G l u Tyr A l a P r o A r g P h e
 50 55 60
 G l n G l y L y s A l a Thr I l e I l e A l a Asp Thr Ser Ser A s n Thr A l a Tyr
 65 70 75 80
 Leu G l n Leu Ser Ser Leu Thr Ser G l u Asp Thr A l a Val Tyr Tyr O y s
 85 90 95
 A l a A r g G l u G l y Tyr Tyr Tyr Asp Ser A r g Asp Tyr Trp Tyr P h e Asp
 100 105 110
 Val Trp G l y Thr G l y Thr Thr Val Thr Val Ser Ser A l a L y s Thr Thr
 115 120 125

ES 2 446 293 T3

Pro 130 Pro 130 Ser Val Tyr Pro 135 Leu 135 Ala Pro Gly Thr Ala 140 Leu Lys Ser Asn
 Ser 145 Met Val Thr Leu Gly 150 Oys Leu Val Lys Gly 155 Tyr Phe Pro Gu Pro 160
 Val Thr Val Thr Trp 165 Asn Ser Gly Ala Leu 170 Ser Ser Gly Val His 175 Thr
 Phe Pro Ala 180 Val Leu Gn Ser Gly Leu 185 Tyr Thr Leu Thr Ser 190 Ser Val
 Thr Val Pro 195 Ser Ser Thr Trp Pro 200 Ser Gn Thr Val Thr 205 Oys Asn Val
 Ala His 210 Pro Ala Ser Ser Thr 215 Lys Val Asp Lys Lys 220 Ile Val Pro Arg
 Asn 225 Cys Gly Gly Asp Cys 230 Lys Pro Oys Ile Cys 235 Thr Gly Ser Gu Val 240
 Ser Ser Val Phe Ile 245 Phe Pro Pro Lys Pro 250 Lys Asp Val Leu Thr Ile
 Thr Leu Thr Pro 260 Lys Val Thr Oys Val 265 Val Val Asp Ile Ser Gn Asp
 Asp Pro Gu 275 Val His Phe Ser Trp 280 Phe Val Asp Asp Val 285 Gu Val His
 Thr Ala Gn Thr Arg Pro 295 Pro Gu Gu Gn Phe Asn 300 Ser Thr Phe Arg
 Ser 305 Val Ser Gu Leu Pro 310 Ile Leu His Gn Asp 315 Trp Leu Asn Gly Arg 320
 Thr Phe Arg Cys Lys 325 Val Thr Ser Ala Ala 330 Phe Pro Ser Pro Ile Gu
 Lys Thr Ile Ser 340 Lys Pro Gu Gly Arg 345 Thr Gn Val Pro His 350 Val Tyr
 Thr Met Ser 355 Pro Thr Lys Gu Gu 360 Met Thr Gn Asn Gu 365 Val Ser Ile
 Thr Cys Met Val Lys Gly Phe 375 Tyr Pro Pro Asp Ile 380 Tyr Val Gu Trp
 Gn Met Asn Gly Gn Pro 390 Gn Gu Asn Tyr Lys 395 Asn Thr Pro Pro Thr 400
 Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys

ES 2 446 293 T3

405 410 415
 Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
 420 425 430
 Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 43

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción miscelánea

<400> 43

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que se une específicamente a la esclerostina humana, en el que el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende seis CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: HCDR1 con SEQ ID NO: 26, HCDR2 con SEQ ID NO: 27, HCDR3 con SEQ ID NO: 28, LCDR1 con SEQ ID NO: 29, LCDR2 con SEQ ID NO: 30 y LCDR3 con SEQ ID NO: 31.
2. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en el que, la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.
3. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende un polipéptido de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un polipéptido de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
4. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
5. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento.
6. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el incremento de al menos uno de entre masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo, o resistencia ósea en un sujeto humano.
7. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de entre osteoporosis, osteopenia, artrosis, dolor asociado con artrosis, artritis reumatoide, enfermedad periodontal o mieloma múltiple en un sujeto humano.
8. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de osteoporosis.