

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 542**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/663 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008 E 08838428 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2203478**

54 Título: **Composiciones y métodos para uso de anticuerpos contra esclerostina**

30 Prioridad:

12.10.2007 EP 07118414

25.02.2008 EP 08151911

29.07.2008 EP 08161342

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

14.03.2014

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse, 35

4056 Basel , CH

72 Inventor/es:

KNEISSEL, MICHAELA;

HALLEUX, CHRISTINE;

HU, SHOU-IH;

DIEFENBACH-STREIBER, BEATE y

PRASSLER, JOSEF

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 448 542 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

Composiciones y métodos para uso de anticuerpos contra esclerostina

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con anticuerpos contra la esclerostina y composiciones y métodos para uso para dicho anticuerpos para tratar un trastorno patológico que es mediado por la esclerostina o enfermedades relacionadas con anomalías óseas tales como osteoporosis.

Antecedentes de la invención

10 El gen SOST codifica la proteína esclerostina la cual es una glicoproteína secretada de 213 aminoácidos. La esclerostina es un miembro de la superfamilia de los factores que contienen el nudo de cistina. La esclerostina se relaciona con la familia de proteínas de DAN/Cerberus, la cual interfiere directamente con la señalización de BMP inhibiendo el enlace de BMP a los receptores y así la cascada de señalización de BMP (Avsian-Kretschmer, Mol Endocrinol 2004, 18(1): 1-12).

15 La expresión del ARNm de la esclerostina se detecta en humanos adultos predominantemente en hueso y riñones. La proteína esclerostina es detectable predominantemente en hueso. Dentro del hueso su expresión está restringida a las células formadoras de hueso maduras y terminalmente diferenciadas, los osteocitos.

20 La esclerostina es un regulador negativo potente de la formación de huesos en hombre y ratones. La carencia de la expresión de SOST da lugar a la esclerosteosis (Balemans et al., Hum Mol Genet., 2001, 10 (5): 537-43; Brunkow et al., Am J Hum Genet, 2001, 68 (3): 577 - 89). Los pacientes sufren de sobrecrecimiento óseo a lo largo de la vida dando como resultado una densidad mineral y resistencia incrementadas en el hueso. No presentan otras anomalías endocrinológicas – todas las complicaciones que experimentan durante el tiempo de vida están relacionadas con la acumulación anormal de hueso. Los portadores heterocigóticos para este trastorno recesivo también presentan masa ósea incrementada (Gardner et al., J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90 (12): 6392-5). Este fenotipo puede ser recapitulado en ratones deficientes en SOST y su sobreexpresión da como resultado la osteopenia. Adicionalmente la enfermedad de Van Buchem [MIM 239100] – una copia fenotípica de la esclerostina – es causada por la regulación equivocada de SOST debido a una limitación genómica de un potenciador óseo de rango largo (Balemans et al., J Med Gene, 2002, 39 (2): 91-7; Loots et al., Genome Res, 2005, 15 (7): 928-35). Finalmente, el SOST es subregulado por la hormona paratiroides - un principio formador de huesos validado clínicamente - durante la formación de huesos sugiriendo que la parte de acción anabólica de PHT podría ser mediada a través de SOST (Keller and Kneissel Bone, 2005, 37 (2): 148-58).

30 La esclerostina se enlaza a la BMP (proteína morfogénica del hueso) y puede actuar como un antagonista de BMP *in vitro* (Winkler et al., EMBO J., 2003, 22(23):6267-76). La esclerostina también actúa como un regulador negativo de la señalización canónica de Wnt, bien sea directamente por enlazamiento a LRP5/LRP6 (Li et al. J Biol Chem., 2005, 280(20); Semenov, J Biol Chem. 2006 Oct. 19; van Bezooijen et al. J Bone Miner Res, 2006, Oct 10), or indirectly (Winkler et al. J Biol Chem., 2005, 280(4):2498-502).

35 La carencia de expresión de la esclerostina da como resultado una formación alta de hueso, mientras que no se perturba la resorción ósea (esclerosteosis, enfermedad de Van Buchem) (Balemans et al., 2001; Brunkow et al., Am J Hum Genet, 2001, 68 (3): 577-89, Balemans et al., 2006; Loots et al., Genome Res, 2005, 15 (7): 928-35).

40 Pocos de los tratamientos disponibles actualmente para trastornos en el esqueleto pueden incrementar la densidad ósea en adultos, y la mayoría de los tratamientos disponibles actualmente trabajan primariamente inhibiendo adicionalmente la resorción ósea más que estimula la formación de nuevo hueso.

45 Un ejemplo de medicamento utilizado para tratar la pérdida ósea es el estrógeno. Sin embargo, no es claro si el estrógeno tiene o no efectos beneficiosos a largo plazo. Adicionalmente, el estrógeno puede portar el riesgo de incrementar la prevalencia de diversos tipos de tumores, tales como cáncer de seno y del endometrio. Otras metodologías terapéuticas actuales para la osteoporosis incluyen bifosfonatos (por ejemplo, FosamaxTM, ActonelTM, BonvivaTM, ZometaTM, olpadronato, neridronato, skelid, bonefos), hormona paratiroide, calcilíticos, calcimiméticos (por ejemplo, cinacalcet), estatinas, esteroides anabólicos, sales de lantano y estroncio y fluoruro de sodio. Tales terapias, sin embargo, están asociadas frecuentemente con efectos colaterales indeseados.

Resumen de la invención

La invención provee <la reivindicación 1>.

50 Una realización divulgada aquí provee un anticuerpo o una proteína funcional que comprende una porción enlazante a un antígeno de dicho anticuerpo para un objetivo en el polipéptido de la esclerostina (SEQ ID NO: 155), caracterizado porque el anticuerpo o la proteína funcional se enlaza específicamente al polipéptido de la esclerostina

y puede incrementar al menos uno entre formación de huesos, densidad mineral de huesos, contenido mineral de huesos, masa ósea, calidad del hueso y resistencia del hueso en un mamífero.

5 En una realización, los anticuerpos divulgados tienen la capacidad de revertir la inhibición de la esclerostina de la mineralización de un hueso *in vitro*. En una realización relacionada, tienen la capacidad de revertir la inhibición de la esclerostina de la ruta de señalización mediada por wnt-1. En otra realización relacionada, perturban el enlazamiento de LRP6 de la esclerostina y pueden bloquear el efecto inhibitorio que la esclerostina tiene a altas dosis sobre la fosforilación de Smad1 inducida por BMP. En otra realización, los anticuerpos divulgados se enlazan a una región de la esclerostina entre los aminoácidos 112 y 126 inclusive (esto es, dicha región consiste de aminoácidos 112 a 126 of SEQ ID NO: 155) of SEQ ID NO:155 y/o la región entre los aminoácidos 160-174 inclusive (esto es, dicha región consiste de aminoácidos 160 a 174 of SEQ ID NO: 155) of SEQ ID NO: 155, y más específicamente, se enlazan a una región que comprende tanto ARLLPNAIGRGKWWR (SEQ ID NO 156) y RLVASCKCKRLTRFH (SEQ ID NO 157).

15 La esclerostina inhibe la activación mediada por wnt1 de STF (supertopflash, lectura informadora para la señalización canónica de wnt) en células HEK293. En algunas realizaciones, los anticuerpos divulgados restauran la lectura del informador de señalización de wnt de una forma altamente reproducible.

20 El efecto inhibitorio observado de los anticuerpos divulgados sobre la acción de la esclerostina en la prueba del informador de señalización de wnt en células no osteoblásticas ha demostrado traducirse en la inducción de respuestas de formación ósea debidas a la inhibición de la esclerostina *in vivo*. En efecto, los experimentos *in vivo* en roedores de edad muestran que los anticuerpos de acuerdo con la invención promueven un anabolismo óseo fuerte. El incremento de masa ósea alcanzó el nivel de efecto de tratamiento intermitente diario con dosis anabólicas extremadamente altas de la hormona paratiroides (la cual fue utilizada como un control positivo).

Por lo tanto, de acuerdo con otra realización preferida, los anticuerpos divulgados tienen afinidades con la esclerostina en el rango de pM bajo e inhiben el impacto de la esclerostina en la señalización de wnt con un IC₅₀ de alrededor de 10 nM.

25 Mas preferiblemente, en otra realización preferida, los anticuerpos divulgados se enlazan a una región de la esclerostina comprendida entre los aminoácidos 112 y 126 inclusive (esto es, dicha región consiste de los aminoácidos 112 a 126 of SEQ ID NO: 155) y entre los aminoácidos 160 y 174 inclusive (esto es dicha región consiste de los aminoácidos 160 a 174 of SEQ ID NO: 155) of SEQ ID NO: 155, y más específicamente una región que superpone al menos los siguientes péptidos ARLLPNAIGRGKWWR (SEQ ID NO: 156) y RLVASCKCKRLTRFH (SEQ ID NO:157), respectivamente, y tienen afinidades con la esclerostina en el rango de pM bajo e inhiben el impacto de la esclerostina sobre la señalización de wnt con un IC₅₀ de alrededor de 10 nM. Tales anticuerpos tienen la capacidad de incrementar la masa ósea en el esqueleto axial y apendicular de un modelo animal de ratón en el nivel efectivo de tratamiento subcutáneo diario con una dosis anabólica estimadamente alta de hormona paratiroides (control positivo) y son por lo tanto útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con anomalías óseas tales como osteoporosis.

Realizaciones adicionales incluyen composiciones que comprenden los anticuerpos de la invención en combinación con terapias alternativas para tratar la osteoporosis, tales como bifosfonatos, hormona paratiroides, agentes de liberación de hormona paratiroides (calcilíticos), anticuerpos neutralizadores de LRP4 y anticuerpos neutralizadores de DKK-1.

40 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de MOR05613_IgG2lambda en la prueba de wnt-1

Figura 2: MOR05813_IgG2lambda en mineralización inducida por BMP-2 en células MC3T3-1b

Figura 3: Efecto de MOR05813_IgG2lambda en la LRP6-SOST ELISA

Figura 4: Efecto de MOR05813_IgG2lambda en la prueba de fosfo-Smad1

45 Figura 5: A - Efecto de la anulación de LRP4 (siARN) sobre la acción inhibitoria de SOST en la prueba de wnt-1 en células Hek293 (números negros: con respecto a actividades de STF en la ausencia de SOST, **números en negro resaltados:** relación de actividades de STF en presencia/ausencia de SOST); especificidad B del efecto de la sobreexpresión de LRP4 sobre SOST IC₅₀ y Dkk1 IC₅₀ en la prueba de wnt-1 en células Hek293; especificidad C del efecto de la sobreexpresión de LRP4 sobre SOST en la acción inhibitoria de Dkk1 en la prueba de wnt-1 en células C28a2; especificidad D del efecto de la anulación de LRP4 (siARN) sobre la acción inhibitoria de SOST y Dkk1 en la prueba de wnt-1 en células Hek293; modulación E de la actividad de MOR05813 por LRP4

Figura 6: Estudio en ratón *in vivo*, con pQCT - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa el contenido mineral total en hueso en la metafisis de tibia proximal

- Figura 7: Estudio en ratón, con pQCT *in vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral en hueso total en la metáfisis de tibia proximal
- Figura 8: Estudio en ratón, con pQCT *in vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa el espesor cortical en la metáfisis de tibia proximal
- 5 Figura 9: Estudio en ratón, con uQCT *in vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa el volumen de hueso esponjoso en la metáfisis de tibia proximal
- Figura 10: Estudio en ratón, con uQCT *in vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa el espesor trabecular en la metáfisis de tibia proximal
- 10 Figura 11: Estudio en ratón, con pQCT *in vivo* - 5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral ósea total adicional en la metáfisis de tibia proximal
- Figura 12: Estudio en ratón, *ex vivo* DEXA - 5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral ósea adicionalmente en la tibia
- Figura 13: Estudio en ratón, *ex vivo* DEXA - 5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral ósea adicionalmente en el fémur
- 15 Figura 14: Estudio en ratón, *ex vivo* DEXA - 5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral en hueso adicional en la espina
- Figura 15: Estudio en ratón, histomorfometría *ex vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa las ratas de formación ósea en el esqueleto apendicular (metáfisis del fémur distal)
- 20 Figura 16: Estudio en ratón, histomorfometría *ex vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la rata de aposición mineral en el esqueleto apendicular (metáfisis en fémur distal)
- Figura 17: Estudio en ratón, histomorfometría *ex vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la superficie de mineralización en el esqueleto apendicular (metáfisis de fémur distal)
- Figura 18: Estudio en ratón, histomorfometría *ex vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa las ratas de formación de hueso en el esqueleto axial (vértebra lumbar)
- 25 Figura 19: Estudio en ratón, histomorfometría *ex vivo* - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 no afectan la reabsorción ósea en el esqueleto apendicular (metáfisis de fémur distal), medida por superficie de osteoclastos
- Figura 20: ELISA que muestra el efecto de MOR05813_IgG2lambda sobre enlazamiento a SOST de LRP6. Se utilizó SOST 0.9 nM en cada caso
- 30 Figura 21: Estudio en ratón, pQCT *in vivo* después de cotratamiento con MOR05813 y ácido zoledrónico, (A) Densidad mineral total en hueso, (B) Contenido mineral total en hueso, (C) Espesor cortical y (D) Densidad mineral en hueso esponjoso
- Figura 22: Estudio en ratón, pQCT *in vivo* : tratamiento con MOR05813 después de pretratamiento con alendronato (alen), (A) Densidad mineral total en hueso, (B) Contenido mineral total en hueso, (C) Espesor cortical, y (D) Densidad mineral de hueso esponjoso
- 35 Figura 23: Estudio en ratón, *in vivo* pQCT después de cotratamiento anabólico con MOR05813 y (i) anti-DKK1, o (ii) PTH, (A) Densidad mineral total ósea, (B) Contenido mineral total en hueso, (C) Espesor cortical, y (D) Densidad mineral de hueso esponjoso

Descripción detallada

- 40 La presente invención se relaciona con anticuerpos aislados, particularmente anticuerpos humanos, que se enlazan específicamente a la esclerostina y que inhiben las propiedades funcionales de la esclerostina. En ciertas realizaciones, los anticuerpos divulgados son derivados a partir de secuencias de cadenas particulares pesadas y ligeras y/o comprenden características estructurales particulares tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La invención provee un anticuerpo de antiesclerostina que comprende una
- 45 secuencia de polipéptido de una región variable de cadena pesada que comprenden SEQ ID NO: 70 y una secuencia de polipéptidos de región variable de cadena ligera que comprenden SEQ ID NO: 81. También se divulgan anticuerpos aislados, métodos para hacer tales anticuerpos, inmunconjugados y moléculas multivalentes o multispecíficas que comprenden tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. La invención también se relaciona con métodos para utilizar los anticuerpos

para inhibir un trastorno o condición asociados con la presencia de la expresión de la esclerostina, por ejemplo, en el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina; por ejemplo, una enfermedad relacionada con los huesos tal como osteoporosis.

5 Con el fin de que la presente invención pueda ser entendida más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Se fijan definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

El término "comprende" abarca "incluye" así como "consiste de" por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir alguna cosa adicional, por ejemplo X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

10 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que es "sustancialmente libre" de Y puede ser completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede ser omitida de la definición de la invención.

15 El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células que presentan antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas y complementos) que dan como resultado un daño selectivo a, la destrucción de, o la eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

20 El término esclerostina se refiere a la esclerostina humana tal como se define en SEQ ID NO: 155. La esclerostina humana recombinante puede ser obtenida en R&D Systems (Minneapolis, MN, USA, 2006 cat# 1406-ST-025). Adicionalmente, esclerostina de ratón recombinante/SOST está disponible comercialmente en R&D Systems (Minneapolis, MN, USA, 2006 cat # 1589-ST-025). Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,395,511 y 6,803,453 y las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos 20040009535 y 20050106683 se refieren a anticuerpos antiesclerostina en general.

25 El término "anticuerpo" tal como se cita aquí incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de enlazamiento a antígenos (esto es, "porción de enlazamiento a antígenos") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" de origen natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está constituida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden ser subdivididas adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas región de complementariedad determinante (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL están compuestas de tres CDR y cuatro FR dispuestos desde el terminal amino al terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de enlazamiento que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en el enlazamiento de la inmunoglobulina a los tejidos o factores anfitriones, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

30

35

40 El término "porción de enlazamiento al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción del antígeno"), tal como se utiliza aquí, se refiere a una longitud completa o uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de enlazarse específicamente a un antígeno (por ejemplo, esclerostina). Se ha demostrado que la función de enlazamiento al antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de enlazamiento abarcados dentro del término "porción de enlazamiento del antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente de los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra; y un fragmento Fv que consiste de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo individual de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546), el cual consiste de un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

45

50 Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, pueden ser unidos, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazante sintético que permite que se conviertan en una cadena de proteínas sencilla en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)); véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; y Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también deben considerarse abarcados dentro del término "región de enlazamiento del antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas para los experimentados en la técnica, y los fragmentos son seleccionados en cuanto a su utilidad de la misma forma que los anticuerpos intactos.

55

Un “anticuerpo aislado”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que enlaza específicamente la esclerostina está sustancialmente libre de anticuerpos que enlazan específicamente antígenos diferentes a la esclerostina). Un anticuerpo aislado que enlaza específicamente la esclerostina puede, sin embargo, tener reactividad cruzada a otros antígenos, tales como moléculas de esclerostina de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” tal como se utilizan aquí se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal despliega una especificidad de enlazamiento sencilla y afinidad por un epítipo particular.

El término “anticuerpo humano”, tal como se utiliza aquí, se entiende por incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones marco como CDR se derivan de secuencias de origen humano. Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, también la región constante es derivada de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias germinales humanas o anticuerpos que contienen secuencias de marco de consenso derivadas de análisis de secuencias marco tal como lo describe Knappik, et al., (2000. J Mol Biol 296, 57-86).

Los anticuerpos humanos divulgados pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de un sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, tal como se utiliza aquí, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, han sido injertados en secuencias de marco humanas.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que despliegan una especificidad de enlazamiento sencilla que tiene regiones variables en las cuales tanto las regiones de marco como las CDR son derivadas de secuencias humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena liviana fusionados a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante”, tal como se utiliza aquí, incluye todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados a partir de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca recombinante de anticuerpos humana combinatorial, y anticuerpos preparados expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre la división de todo o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias para otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales las regiones marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utilizan secuencias de Ig transgénica para humano, metagénesis somática *in vivo*), y así las secuencias de aminoácidos de las regiones de V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras son derivadas de y relacionadas con las secuencias de las líneas germinales V_H y V_L , pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Tal como se utiliza aquí, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM, IgG tales como IgG1 o IgG2) que es provista por los genes de la región constante de cadena pesada.

Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se utilizan de manera intercambiable aquí con el término “un anticuerpo que se enlaza específicamente a un antígeno”.

Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que “se enlaza específicamente al polipéptido de esclerostina” se entiende como la referencia a un anticuerpo que se enlaza al polipéptido de esclerostina con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, 1×10^{-9} M o menos, o 1×10^{-10} M o menos. Un anticuerpo que “reacciona cruzado con un antígeno diferente a la esclerostina” se entiende como referencia a un anticuerpo que enlaza a ese antígeno con una K_D de 0.5×10^{-8} M o menos, 5×10^{-9} M o menos o 2×10^{-9} M o menos. Un anticuerpo que “no reacciona cruzado con un antígeno en particular” se entiende como referencia a un anticuerpo que se enlaza a ese antígeno, con una K_D de 1.5×10^{-8} M o más, o una K_D de entre 5×10^{-8} M y 10×10^{-8} M, o 1×10^{-7} M o mayor. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos que si no reaccionan cruzados con el antígeno exhiben esencialmente enlazamiento indetectable contra estas proteínas en ensayos de enlazamiento estándar.

Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que “bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en una célula con base en una prueba de señalización de wnt” se entiende como referencia un anticuerpo que restaura la señalización inducida

por wnt en presencia de esclerostina en una prueba de supertopo instantáneo basada en células (STF) con un IC₅₀ menor de 1 mM, 100 nM, 20 nM, 10 nM o menos. Tal ensayo SFT se describe en más detalle en los ejemplos más adelante.

5 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que “bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células” se entiende como referencia a un anticuerpo que restaura la mineralización inducida por BMP2 en presencia de esclerostina en una prueba basada en células con un IC₅₀ menor de 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM o menos. Tales pruebas se describen en más detalle en los ejemplos más adelante.

10 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que “bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en la prueba de fosforilación de Smad1” se entiende como referencia a un anticuerpo que restaura la fosforilación de Smad1 inducida por BMP6 en presencia de esclerostina en un ensayo basado en células con un IC₅₀ menor de 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM o menos. Tal ensayo se describe en más detalle en los ejemplos más adelante.

Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que “inhibe el enlazamiento de la esclerostina a LRP-6” se refiere a un anticuerpo que inhibe el enlazamiento de la esclerostina a LRP-6 con un IC₅₀ de 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 1 nM o menos. Tal ensayo se describe en más detalle en los ejemplos más adelante.

15 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que “incrementa la formación y masa y densidad de huesos” se refiere a un anticuerpo que es capaz de alcanzar la formación de huesos, masa y densidad en el nivel de un tratamiento intermitente diario con una dosis anabólica alta de PTH como se muestra en el ejemplo 10.

20 El término “K_{assoc}” o “K_a”, tal como se utiliza aquí, se entiende como referencia a la rata de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno, mientras que el término “K_{dis}” o K_D”, tal como se utilizan aquí, se entienden como referencia a la rata de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término “K_D”, tal como se utiliza aquí, se entiende como referencia a la constante de disociación, la cual es obtenida a partir de la relación de K_d a K_a (esto es, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos pueden ser determinados utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar el K_D de un anticuerpo es utilizando resonancia de plasmón en superficie, o utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

25

Tal como se utiliza aquí, el término “afinidad” se refiere a la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno en sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del “brazo” del anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; cuanto más interacciones, más fuerte es la afinidad.

30 Tal como se utiliza aquí, el término “avidez” se refiere a una medida informativa de la estabilidad global o resistencia del complejo anticuerpo-antígeno. Es controlado por tres factores principales: afinidad anticuerpo epítipo; la valencia tanto del antígeno como del anticuerpo; y la disposición estructural de las partes interactuantes. Finalmente estos factores definen la especificidad del anticuerpo, que es, la probabilidad de que el anticuerpo particular se esté enlazando a un epítipo de antígeno preciso.

35 Con el fin de obtener una sonda de avidez más alta, puede construirse un conjugado dimérico, haciendo así interacciones de baja afinidad (tales como las que hay con el anticuerpo de línea germinal) más fácilmente detectadas por FACS. Además, otros medios para incrementar la avidez del enlazamiento al antígeno involucran la generación de dímeros, trímeros o multímeros de cualquiera de los constructos descritos aquí de los anticuerpos antiesclerostina. Tales multímeros pueden ser generados a través de enlazamiento covalente entre módulos individuales, por ejemplo, imitando el enlazamiento natural de terminal C a N o imitando los dímeros de anticuerpos que se mantienen juntos a través de sus regiones constantes. Los enlaces manipulados en la interfaz Fc/Fc pueden ser covalentes o no covalentes. Además, los asociados de dimerización o multimerización diferentes a Fc pueden ser utilizados en los híbridos de esclerostina para crear tales estructuras de orden superior. Por ejemplo, es posible utilizar dominios de multimerización tales como dominios de trimerización descritos en Borean (WO2004039841) o dominios de pentamerización descritos en la solicitud publicada de Patente WO98/18943.

40

45

Tal como se utiliza aquí, el término “reactividad cruzada” se refiere a un anticuerpo o población de anticuerpos que se enlazan a epítopos sobre otros antígenos. Esto puede ser causado bien sea por baja avidez o especificidad del anticuerpo o por múltiples antígenos distintos que tienen epítopos idénticos o muy similares. La reactividad cruzada algunas veces es deseable cuando se quiere un enlazamiento general a un grupo relacionado de antígenos o cuando se intenta el etiquetado de especies cruzadas cuando la secuencia del epítipo del antígeno no es altamente conservada en la evolución.

50

Tal como se utiliza aquí, el término “alta afinidad” para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁸ M o menos, 10⁻⁹ M o menos o 10⁻¹⁰ M o menos que un antígeno objetivo. Sin embargo, el enlazamiento de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, enlazamiento de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menos, o 10⁻⁸ M o menos.

55

Tal como se utiliza aquí, el término “sujeto” se refiere a cualquier animal humano o no humano. El término “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

5 Tal como se utiliza aquí, el término “optimizado” significa una secuencia de nucleótidos que ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que son preparados en la producción de células u organismos, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia* o *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada es manipulada para retener por completo o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos codificada originalmente por la secuencia de nucleótidos de partida, lo cual también se conoce como secuencia “original”. Las secuencias optimizadas aquí han sido manipuladas para tener codones que son preferidos en células de mamíferos, sin embargo la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas también se contempla aquí. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de nucleótidos optimizadas también se denominan como optimizadas.

Se describen en mayor detalle en las subsecciones siguientes diversos aspectos de la invención.

15 Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de enlazamiento de los anticuerpos hacia la esclerostina de diversas especies son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA, inmunoprecipitación western y RIA. Ensayos adecuados son descritos en detalle en los ejemplos. La cinética de enlazamiento (por ejemplo, afinidad de enlazamiento) de los anticuerpos también puede ser establecida por ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como análisis Biacore. Los ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos sobre las propiedades funcionales de la esclerostina (por ejemplo, enlazamiento a receptor, prevención o mejoramiento de la osteólisis) se describen en más detalle en los ejemplos.

25 De acuerdo con lo anterior, un anticuerpo que “inhibe” una o más de estas propiedades funcionales de la esclerostina (por ejemplo, actividades bioquímicas, inmuoquímicas, celulares, fisiológicas u otras, o similares), tal como se determina de acuerdo con la metodología conocida en la técnica y descrita aquí, se entenderá como relacionado con un descenso estadísticamente significativo en la actividad particular con respecto a la vista en la ausencia del anticuerpo (o cuando está presente un anticuerpo de control de especificidad y relevante). Un anticuerpo inhibe los efectos de la actividad de la esclerostina tal como un descenso significativo estadísticamente en al menos 10% del parámetro medido, en al menos 50%, 80% o 90%, y en ciertas realizaciones un anticuerpo de la invención puede inhibir más de 95%, 98% o 99% de la actividad funcional de la esclerostina.

30 Los términos “bloque cruzado”, “bloqueado cruzado” y “bloqueo cruzado” se utilizan de manera intercambiable aquí para indicar la capacidad de un anticuerpo u otro agente de enlazamiento para interferir con el enlazamiento de otros anticuerpos o agentes de enlazamiento a la esclerostina en un ensayo de enlazamiento competitivo estándar.

35 La capacidad o grado al cual un anticuerpo u otro agente de enlazamiento es capaz de interferir con el enlazamiento de otro anticuerpo o molécula de enlazamiento a la esclerostina, y por lo tanto si puede ser denominado de acuerdo como bloqueo cruzado de acuerdo con la divulgación, puede determinarse utilizando ensayos de enlazamiento por competición estándar. Un ensayo adecuado involucra el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, utilizando el instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el grado de interacciones utilizando la tecnología de resonancia de plasmón en superficie. Otro ensayo para medición del bloqueo cruzado utiliza una metodología basada en ELISA.

40 Detalles adicionales sobre ambos métodos se dan en los ejemplos.

45 De acuerdo con la divulgación, un anticuerpo de bloqueo cruzado u otro agente de enlazamiento se enlaza a la esclerostina en la prueba de bloqueo cruzado de BIAcore descrita de tal forma que en el enlazamiento registrado de la combinación (mezcla) de los anticuerpos o agentes de enlazamiento está entre 80% y 0.1% (por ejemplo 80% a 4%) del enlazamiento teórico máximo, específicamente entre 75% y 0.1% (por ejemplo 75% a 4%) del enlazamiento teórico máximo y más específicamente entre 70% y 0.1% (por ejemplo de 70% a 4%), y más específicamente entre 65% y 0.1% (por ejemplo, 65% a 4%) del enlazamiento teórico máximo (como se definió anteriormente) de los dos anticuerpos o agentes de enlazamiento en combinación.

50 Un anticuerpo es definido como un enlazamiento cruzado en la prueba de ELISA tal como se describe en los ejemplos, si la fase en solución del anticuerpo de antiesclerostina es capaz de producir una reducción entre 60% a 100%, específicamente entre 70% y 100%, y más específicamente entre 80% y 100%, de la señal de detección de esclerostina (esto es la cantidad de esclerostina enlazada por el anticuerpo recubierto), en comparación con la señal de detección de esclerostina obtenida en ausencia del anticuerpo antiesclerostina en fase de solución (esto es, los pozos de control positivo).

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos divulgados aquí incluyen los anticuerpos monoclonales humanos, aislados tal como se describe, en los ejemplos. Las secuencias de aminoácidos V_H de los anticuerpos aislados divulgados se muestran en SEQ ID NOs: 69 – 77. Las secuencias de aminoácidos V_L de los anticuerpos aislados divulgados se muestran en SEQ ID NOs: 80 – 88 respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa preferidos correspondientes de los anticuerpos divulgados se muestran en SEQ ID NO: 113 – 121. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa preferidos correspondientes de los anticuerpos divulgados se muestran en SEQ ID NO: 124 – 132, respectivamente. Otros anticuerpos incluyen aminoácidos que han sido mutados, bien sea que tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento o más de identidad con la regiones CDR representadas en las secuencias descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la divulgación incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita anteriormente.

Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos originales de cadena pesada variable se muestran en las SEQ ID NOs 89 - 90. Las secuencias de nucleótidos originales de cadena pesada variables se muestran en SEQ ID NOs 100 – 101. Las secuencias de nucleótidos de cadena ligera de longitud completa optimizadas para expresión en una célula de mamíferos se muestran en SEQ ID NOs 146 – 154. Las secuencias de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa optimizadas para expresión en una célula de mamífero se muestran en SEQ ID NOs 135 – 143. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa codificadas por las secuencias de nucleótidos de cadena ligera optimizadas se muestran en SEQ ID NOs 124 – 132. Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa codificadas por las secuencias de nucleótidos de cadena pesada optimizadas se muestran en SEQ ID NOs 113 – 121. Otros anticuerpos incluyen aminoácidos o ácidos nucleicos que han sido mutados, bien sea que tengan al menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento o más de identidad a las secuencias descritas anteriormente. En algunas realizaciones, la invención incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en la secuencia descrita anteriormente, a la vez que retienen sustancialmente la misma actividad terapéutica.

Puesto que cada uno de estos anticuerpos puede enlazarse a la esclerostina, la cadena de longitud variable completa V_H , V_L , y las secuencias de cadenas pesadas de longitud completa (secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos) pueden ser “mezcladas y comparadas” para crear otras moléculas de enlazamiento de la esclerostina de la invención. El enlazamiento de la esclerostina de tales anticuerpos “mezclados y comparados” puede probarse utilizando los ensayos de enlazamiento descritos anteriormente y en los ejemplos (por ejemplo ELISA). Cuando estas cadenas se mezclan y se hacen coincidir, una secuencia V_H de una par V_H/V_L en particular debería ser reemplazada con una secuencia V_H estructuralmente similar. De la misma forma una secuencia de cadena pesada de longitud completa a partir de un apareamiento de cadena pesada de longitud completa/cadena liviana de longitud completa particular debería ser reemplazada con una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. De la misma forma, una secuencia V_L de un apareamiento V_H/V_L particular debería ser reemplazada con una secuencia V_L estructuralmente similar. De la misma forma una secuencia de cadena ligera de longitud completa de una pareja de cadena pesada de longitud completa/cadena liviana de longitud completa particular debería ser reemplazada con una secuencia de cadena liviana de longitud completa estructuralmente similar. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la divulgación provee un anticuerpo monoclonal aislado o una región de enlazamiento a antígeno que tiene: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 69 – 77; y una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 80 – 88; en donde el anticuerpo se enlaza específicamente a la esclerostina.

En otro aspecto, la divulgación provee:

(i) un anticuerpo monoclonal aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 113 – 121; y una cadena liviana de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 124 – 132; o

(ii) una proteína funcional que comprende una porción de enlazamiento a antígeno de la misma.

En otro aspecto, la divulgación provee:

(i) un anticuerpo monoclonal aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de nucleótidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 135 – 143; y una cadena liviana de longitud completa que comprende una secuencia de nucleótidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 146 – 154; o

(ii) una proteína funcional que comprende una porción de enlazamiento a antígeno de la misma.

En aún otro aspecto, la divulgación provee anticuerpos que comprenden la cadena pesada y la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos del CDR1 de V_H de los anticuerpos se muestra en SEQ ID NOs: 1 - 11. Las secuencias de aminoácidos del CDR2 de V_H de los anticuerpos se muestra en SEQ ID NOs: 12 - 22. Las secuencias de aminoácidos de la CDR3 de V_H de los anticuerpos se muestra en SEQ ID NO: 23 -33. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 de V_L de los anticuerpos se muestra en SEQ ID NO: 34 - 44. Las secuencias de aminoácidos de la CDR2 de V_L de los anticuerpos se muestra en SEQ ID NO: 45 - 55. Las secuencias de aminoácidos de la CDR3 de V_L de los anticuerpos se muestra en SEQ ID NO: 56 - 66. Las regiones de CDR se delinear utilizando el sistema Kabat (Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91 - 3242).

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede enlazarse a la esclerostina y que cada especificidad de enlazamiento al antígeno es provista primariamente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de V_H CDR1, 2 y 3, y las secuencias de V_L de CDR1, 2 y 3 pueden ser "mezcladas y comparadas" (esto es, los CDR de diferentes anticuerpos pueden ser mezclados y comparados), aunque cada anticuerpo debe contener un CDR1, 2 y 3 de V_H y un CDR1, 2 y 3 de V_L para crear otras moléculas de enlazamiento antiesclerostina de la invención. El enlazamiento a la esclerostina de tales anticuerpos "mezclados y comparados" puede ser probados utilizando los ensayos de enlazamiento descritos anteriormente y en los ejemplos (por ejemplo ELISA). Cuando se mezclan y comparan secuencias CDR de V_H , la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_H particular debería ser reemplazada con unas secuencias de CDR estructuralmente similares. De la misma forma, cuando las secuencias de CDR de V_L se mezclan y comparan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_L en particular debería ser reemplazada con una secuencia de CDR estructuralmente similar. Será fácilmente evidente para la persona de experiencia normal que las secuencias novedosas de V_H y V_L pueden ser creadas sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares a las secuencias de CDR mostradas aquí para los anticuerpos monoclonales de la presente invención.

Un anticuerpo monoclonal aislado, o una región de enlazamiento a antígeno del mismo tiene: una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 1 - 11; una región CDR2 variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 12 - 22; una región CDR3 variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupos consistente of SEQ ID NOs: 23 - 33; una región CDR1 variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 34 - 44; una región CDR2 variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 45 - 55; y una región CDR3 variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 56 - 66; en donde el anticuerpo enlaza específicamente la esclerostina.

En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 3; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 14; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 25; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 36; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 47; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 58.

En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 4; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 15; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 26; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 37; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 48; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 59.

En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 5; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 16; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 27; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 38; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 49; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 60.

En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 6; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 17; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 28; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 39; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 50; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 61.

En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 7; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 18; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 29; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 40; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 51; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 62.

En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 8; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 19; una región variable de cadena pesada CDR3 de

SEQ ID NO: 30; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 41; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 52; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 63.

5 En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 9; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 20; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 31; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 42; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 53; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 64.

10 En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 10; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 21; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 32; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 43; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 54; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 65.

En una cierta realización, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 11; una región variable de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO: 22; una región variable de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO: 33; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 44; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 55; y una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 66.

15 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o ligeras de longitud completa que son "el producto de" o "derivadas de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables o las cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humanos con el antígeno de interés o seleccionando una biblioteca de gen de inmunoglobulina humana desplegada sobre un fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina germinal humana que es más cercana en secuencia (esto es, el mayor porcentaje de identidad) con respecto a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es el "producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana en particular puede contener diferencias en aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o inducción intencional de mutaciones dirigidas al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado a partir de una secuencia de línea germinal humana en particular desplegará no más de 10 diferencias en aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede desplegar no más de 5, incluso no más de 4, 3, 2 o una diferencia en aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal se seleccionan de aquellas que comprenden las secuencias de cadena pesada variable que consisten of SEQ ID NO: 67 – 68 respectivamente, y las secuencias de cadena ligera variable consistente of SEQ ID NO: 78 -79 respectivamente.

Anticuerpos homólogos

45 En aún otra realización, un anticuerpo divulgado tiene secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de longitud completa; secuencias de nucleótidos de cadena pesada y ligera de longitud completa, secuencias de nucleótidos de cadena pesada y ligera de región variable, o secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de región variable que son homólogas a las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los anticuerpos descritos aquí, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos antiesclerostina de la invención.

50 Por ejemplo, la divulgación provee un anticuerpo monoclonal aislado (o una proteína funcional que comprende una porción enlazante al antígeno de la misma) que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 67 -77; la región de cadena variable ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 78 -88; el anticuerpo se enlaza específicamente a la esclerostina, y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt basado en células, el anticuerpo bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células o

bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en el ensayo de fosforilación de Smad1 o el anticuerpo inhibe el enlazamiento de la esclerostina al LRP-6 o el anticuerpo incrementa la formación y masa y densidad ósea.

5 En un ejemplo adicional, la divulgación provee un anticuerpo monoclonal aislado (o una proteína funcional que comprende una porción de enlazamiento al antígeno de la misma) que comprende una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa, en donde: la cadena pesada de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NO 111 – 121; la cadena liviana de longitud completa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs 122 – 132; el anticuerpo se enlaza específicamente a la esclerostina, y el anticuerpo exhibe al menos
10 una de las siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt basada en células, el anticuerpo bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células o bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en el ensayo de fosforilación de Smad1 o el anticuerpo inhibe el enlazamiento de la esclerostina al LRP-6 o el anticuerpo incrementa la formación y masa y densidad ósea.

15 En otro ejemplo, la divulgación provee un anticuerpo monoclonal aislado (o una proteína funcional que comprende una porción de enlazamiento al antígeno de la misma), que comprende una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa, en donde: la cadena pesada de longitud completa es codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs 133 – 143; la cadena liviana de longitud completa comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente of
20 SEQ ID NOs 144 – 154; el anticuerpo se enlaza específicamente a la esclerostina, y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt basado en células, el anticuerpo bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células o bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de fosforilación de Smad1 o el anticuerpo inhibe el enlazamiento de la esclerostina al LRP-6 o el anticuerpo incrementa la formación y masa y densidad ósea.
25

En diversas realizaciones, el anticuerpo debe exhibir una, dos o más, o tres de las propiedades funcionales discutidas anteriormente. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

30 En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias definidas anteriormente. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser idénticas excepto una sustitución de aminoácido en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tiene alta identidad (esto es 80% o mayor) a las regiones V_H y V_L of SEQ ID NOs 67 – 77 y SEQ ID NOs 78 – 88 respectivamente, puede ser obtenido por
35 mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de las moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 89 – 99 y 100 – 110 respectivamente, seguido por la prueba del anticuerpo alterado codificado en cuanto a la función retenida (esto es, las funciones definidas anteriormente) utilizando los ensayos funcionales descritos aquí.

40 En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y/o la cadena liviana de longitud completa pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias definidas anteriormente. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada de longitud completa y una cadena liviana de longitud completa que tienen alta identidad (esto es, 80% o mayor) a las cadenas pesadas de longitud completa de cualquiera of SEQ ID NOs 111 – 121 y cadenas livianas de longitud completa de cualquiera de SEQ ID
45 NOs 122 – 132 respectivamente, pueden ser obtenidos por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 133 – 143 y SEQ ID NOs: 144 – 154 respectivamente, seguido por la prueba de anticuerpo alterado codificado para la función retenida (esto es, las funciones definidas anteriormente) utilizando los ensayos funcionales descritos aquí.

50 En otras realizaciones, las secuencias de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena liviana de longitud completa pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias definidas anteriormente.

En otras realizaciones, las regiones variables de secuencias de nucleótidos de cadena pesada y/o cadena ligera pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias definidas anteriormente.

55 Tal como se utiliza aquí, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, porcentaje de identidad = # de posiciones idénticas/total # de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, las cuales necesitan ser introducidas para el alineamiento óptico de las dos secuencias. La comparación de las

secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitantes que siguen más adelante.

5 El porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput, Appl. Biosci., 4: 11 – 17, 1988) el cual ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM 120, una penalidad de longitud de brecha de 12 y una penalidad de brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444 – 453, 1970) el cual ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando bien sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

10 Adicional o alternativamente, las secuencias de proteína de la presente invención pueden ser utilizadas adicionalmente como una "secuencia de pregunta" para llevar a cabo una búsqueda contra bases de datos públicos para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden ser llevada a cabo utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al., 1990 J. Mol Biol. 215: 403 – 10. Las búsquedas de proteína BLAST pueden ser llevadas a cabo con el programa XBLAST, marcación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpos de la invención. Para obtener alineamientos con brecha para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389 – 3402. Cuando se utiliza los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden ser usados los parámetros de fondo de los programas respectivos (por ejemplo XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Anticuerpos con modificaciones conservadoras

25 En ciertas realizaciones, un anticuerpo divulgado tiene una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias CDR tienen secuencias de aminoácidos especificadas con base en los anticuerpos descritos aquí o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos antiesclerostina de la invención. De acuerdo con lo anterior, la divulgación provee un anticuerpo monoclonal aislado, o una proteína funcional que comprende una porción de enlazamiento de antígeno de la misma, que consiste de una región de cadena variable pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde: la secuencia de aminoácidos CDR1 de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo consistente of SEQ ID NOs: 1 – 11 y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos CDR2 de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo consistente of SEQ ID NOs: 12 – 22, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos CDR3 de la región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo consistente of SEQ ID NOs: 23 – 33 y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos CDR1 de la región variable de cadena ligera se seleccionan del grupo consistente of SEQ ID NOs: 34 – 44 y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos CDR2 de las regiones variables de cadena ligera se seleccionan del grupo consistente of SEQ ID NOs: 45 – 55, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos CDR3 de las regiones variables de cadena ligera se seleccionan del grupo consistente of SEQ ID NOs: 56 – 66, y modificaciones conservadoras de las mismas; el anticuerpo se enlaza específicamente a la esclerostina, y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt con base en células, el anticuerpo bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células o bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de fosforilación de Smad1 o el anticuerpo inhibe el enlazamiento de la esclerostina en el LRP-6 o el anticuerpo incrementa la formación y la masa y densidad ósea.

45 En diversas realizaciones, el anticuerpo debe exhibir una o más, dos o más, o tres o más de las propiedades funcionales listadas discutidas anteriormente. Tales anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

50 En otras realizaciones, un anticuerpo divulgado optimizado para expresión en una célula de mamífero tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa y una secuencia de cadena ligera de longitud completa, en donde una o más de estas secuencias tienen secuencias de aminoácidos especificadas con base en los anticuerpos descritos aquí o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos antiesclerostina de la invención. De acuerdo con lo anterior, la divulgación provee un anticuerpo monoclonal aislado utilizado para expresión en una célula de mamífero que consiste de una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa en donde: la cadena pesada de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo of SEQ ID NOs: 111 – 121, y modificaciones conservadoras de los mismos; y la cadena ligera de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente of SEQ ID NOs: 122 – 132, y modificaciones conservadoras de las mismas; el anticuerpo se enlaza específicamente a la esclerostina; y el anticuerpo exhibe al menos una de las

siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt basado en células, el anticuerpo bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células o bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de fosforilación de Smad1 o el anticuerpo inhibe el enlazamiento de la esclerostina al LRP4 - 6 o el anticuerpo incrementa la formación y masa y densidad ósea.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede exhibir una o más, dos o más o tres o más de las propiedades funcionales discutidas anteriormente. Tales anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Tal como se utiliza aquí, el término "modificaciones de secuencias conservadoras" pretende referirse a modificaciones en aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de enlazamiento del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden ser introducidas en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en el arte, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

Sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las cuales el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tiroxina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tiroxina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, uno o más residuos de aminoácidos dentro de la región CDR de un anticuerpo de la invención pueden ser reemplazados con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral, y el anticuerpo alterado puede ser probado en cuanto a la función retenida utilizando los ensayos funcionales descritos aquí.

Anticuerpos que se enlazan al mismo epítipo como anticuerpos de antiesclerostina de la invención

En otra realización, la divulgación provee anticuerpos que se enlazan al mismo epítipo como lo hacen los diversos anticuerpos antiesclerostina descritos aquí. Se ha encontrado en efecto sorprendentemente que todos los anticuerpos descritos en los ejemplos son capaces de:

- (i) bloquear el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt basado en células;
- (ii) bloquear el efecto inhibitor en un ensayo de mineralización basado en células;
- (iii) inhibir el enlazamiento de la esclerostina a LRP-6; y
- (iv) incrementar la formación, masa y densidad óseas,

enlaza el mismo epítipo en la esclerostina con alta afinidad, siendo dicho epítipo un epítipo conformacional que incluye aminoácidos of SEQ ID NO: 156 y SEQ ID NO: 157. Sin estar limitados por cualquier modelo específico, se propone aquí que las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 156 y SEQ ID NO: 157 delimitan una región de epítipo conformacional en el polipéptido de la esclerostina que es reconocida por los anticuerpos divulgados.

Por lo tanto pueden identificarse anticuerpos adicionales con base en su capacidad para competencia cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente el enlazamiento de, en una manera significativamente estadística) con otros anticuerpos de la invención en ensayos de enlazamiento estándar con esclerostina. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir el enlazamiento de los anticuerpos de la presente divulgación a esclerostina humana demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo para enlazarse a la esclerostina humana; tal anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, enlazarse al mismo epítipo o a uno relacionado (por ejemplo uno estructuralmente similar o espacialmente proximal) sobre la esclerostina humana como lo hace el anticuerpo con el cual compete. En una cierta realización, el anticuerpo que se enlaza al mismo epítipo sobre la esclerostina humana como los anticuerpos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden ser preparados y aislados como se describe en los ejemplos.

Anticuerpos manipulados y modificados

Un anticuerpo de la invención puede ser preparado adicionalmente utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL mostradas aquí como material de partida para manipular un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado el cual tiene propiedades alteradas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede ser manipulado modificando uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (esto es, VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicional o

alternativamente, un anticuerpo puede ser manipulado modificando residuos dentro de la región constante, por ejemplo, para alterar las funciones de efecto del anticuerpo.

5 Un tipo de manipulación de la región variable que puede ser llevada a cabo es el injerto en CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de los CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias por fuera de CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables por la mayor parte de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar los anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR a partir del anticuerpo específico de origen natural injertado sobre secuencias marco a partir de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Patente de los Estados Unidos No. 5,225,539 de Winter, y Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen et al.).

15 De acuerdo con lo anterior, otra realización de la divulgación es pertinente a un anticuerpo monoclonal aislado, o una proteína funcional que comprende una porción de enlazamiento a antígeno de la misma, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 1 – 11; secuencias CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 12 – 22; secuencias de CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 23 – 33, respectivamente; y una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 34 – 44; secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 45 – 55; y secuencias de CDR3 que consisten de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 56 – 66, respectivamente. Así, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR de V_H y V_L de anticuerpos monoclonales, si bien pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

20 Tales secuencias marco pueden ser obtenidas a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes de regiones variables de cadena pesada y ligera humanas pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de línea germinal humana "VBase" (disponible en internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A. et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836.

35 Un ejemplo de secuencias marco para uso en los anticuerpos divulgados son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, secuencias en consenso y/o secuencias marco utilizadas por anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_H , y las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_L pueden ser injertadas en regiones marco que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de línea germinal a partir de la cual deriva la secuencia marco, o las secuencias CDR pueden ser injertadas sobre regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es benéfico hacer mutar residuos dentro de las regiones marco para mantener o potenciar la capacidad de enlazamiento al antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 530,101; 5, 585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen et al).

45 Otro tipo de modificación en la región variable es hacer mutar los residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L para de esta manera mejorar una o más propiedades de enlazamiento (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés, conocida como "maduración por afinidad". La mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR puede ejecutarse para introducir las mutaciones y el efecto sobre el enlazamiento del anticuerpo, u otras propiedades funcionales de interés, puede ser evaluada en ensayos *in vivo* o *in vitro* tal como se describe aquí y se provee en los ejemplos. Pueden introducirse modificaciones conservadoras (como se discutió anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

55 De acuerdo con lo anterior, en otra realización, la divulgación provee anticuerpos monoclonales antiesclerostina aislados, o una proteína funcional que comprende una porción de enlazamiento de antígeno en la misma, que consiste de una región variable de cadena pesada que tiene: una región de CDR1 de V_H que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 1 – 11 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 1 -11; una región CDR2 de V_H que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 12 – 22, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco

5 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 12 -22; una región CDR3 de V_H que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 23 – 33, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 23 -33; una región CDR1 de V_L que tiene de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 34 – 44, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 34 - 44; una región CDR2 de V_L que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 45 – 55, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 45 -55; y una región CDR3 de V_L que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 56 – 66, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 56 -66.

Manipulación de marco o Fc

15 Los anticuerpos manipulados divulgados aquí incluyen aquellos en los cuales se han hecho modificaciones a los residuos marco dentro de V_H y/o V_L, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente tales modificaciones marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una metodología es “retromutar” uno o más residuos marco a las correspondientes secuencias de línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido mutación somática puede contener residuos marco que difieren de la secuencia germinal de la cual se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden ser identificados por comparación de las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las cuales se deriva el anticuerpo. Para regresar las secuencias de la región marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser “retromutadas” a la secuencia de línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR.

20 Otro tipo de modificación de marco involucra la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más de las regiones CDR, para eliminar epítomos de células T para de esta forma reducir la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Esta metodología también se denomina como “desinmunización” y está descrita en mayor detalle en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20030153043 de Carr et al.

25 Además o alternativamente las modificaciones hechas con las regiones marco o CDR, los anticuerpos divulgados aquí pueden ser manipulados para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación de complementos, enlazamiento al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Adicionalmente, un anticuerpo divulgado puede ser modificado químicamente (por ejemplo, una o más unidades estructurales químicas pueden ser enlazadas al anticuerpo) o puede ser modificado para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe en mayor detalle más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

30 En una realización, la región bisagra de CH1 es modificada de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, se incrementa o disminuye. Esta metodología está descrita adicionalmente en la Patente de los Estados Unidos No. 5, 677,425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas liviana y pesada o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

35 En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo se hace mutar para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más modificaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra Fc de tal forma que el anticuerpo tiene un enlazamiento a la proteína A (SpA) de estafilococo con respecto al enlazamiento SpA del dominio de bisagra Fc nativo. Esta metodología se describe en mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos No. 6, 165,745 de Ward et al.

40 En otra realización, el anticuerpo se modifica para incrementar su vida media biológica. Son posibles diversas metodologías. Por ejemplo, pueden introducirse una de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6, 277,375 de Ward. Alternativamente, para incrementar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítomo de enlazamiento al receptor silvestre tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 869,046 y 6, 121,022 de Presta et al.

45 En todavía otras realizaciones, la región Fc es alterada por reemplazo de al menos un residuo de aminoácido con un diferente residuo de aminoácido para alterar las funciones de efecto del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser reemplazados con un diferente residuo de aminoácido de tal forma que el anticuerpo tiene una afinidad alterada para un ligando de efecto pero retiene la capacidad de enlazamiento del antígeno del anticuerpo original. El ligando de efecto al cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el

componente C1 del complemento. Esta metodología está descrita en mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 624,821 y 5, 648,260 ambas de Winter et al.

5 En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos puede ser reemplazado con un residuo de aminoácido diferente de tal forma que el anticuerpo tiene enlazamiento C1q alterado y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o eliminada. Esta metodología está descrita en mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos No. 6, 194,551 de Idusogie et al.

En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos son alterados para de esta manera alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Esta metodología está descrita en la Publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

10 En todavía otra realización, la región Fc es modificada para incrementar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Esta metodología está descrita adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de enlazamiento sobre IgG1 humano para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn han sido mapeados y se han descrito variantes con enlazamiento mejorado (véase Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem., 276: 6591 – 6604).

15 En todavía otra realización, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede hacerse un anticuerpo aglicosilado (esto es, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada para, por ejemplo, incrementar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Tales modificaciones en carbohidratos pueden ser logradas por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco en la región variable para por lo tanto eliminar la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal metodología está descrita en mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 714,350 y 6, 350,861 de Co et al.

20 Adicional o alternativamente, puede ser un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras GLcNac bisectadas incrementadas. Tales patrones de glicosilación alteradas han demostrado incrementar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones en carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula anfitriona con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en la técnica y pueden ser utilizadas como células anfitrionas en las cuales se expresan anticuerpos recombinantes para producir por lo tanto un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, la EP 1,176,195 de Hang et al., describe una línea celular con un gen FUT8 de funcionalidad perturbada, el cual codifica una fucosil transferasa, tal que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación. La Publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para enlazar fucosa a carbohidratos enlazados con Asn(297), dando como resultado también la hipofucosilación de anticuerpos expresada en esa célula anfitriona (véase también Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733 – 26740). La Publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al., describe líneas celulares manipuladas para expresar glicosil transferasas modificantes de la glicoproteína (por ejemplo, beta (1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal forma que los anticuerpos expresados en la línea celular es manipulada exhiben estructuras de GlcNac bisectadas incrementadas lo que da como resultado una actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176 – 180).

25 Otra modificación de los anticuerpos aquí que se contempla es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado, por ejemplo, para incrementar la vida media biológica (por ejemplo en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento del mismo, se hacen reaccionar típicamente con polietilén glicol (PEG), de tal manera que un éster reactivo o derivado aldehído del PEG, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. La pegilación puede ser llevada a cabo por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se utiliza aquí, el término "polietilén glicol" se entiende que abarca cualquiera de las zonas de PEG que han sido utilizadas para derivar otras proteínas, tales como (C1 – C10) alcoxi o ariloxi-polietilén glicol o polietilén glicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se va a pegilar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase por ejemplo, EP 0 154 316 de Nishimura et al. y EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

30 Otra modificación de los anticuerpos que se contempla es un conjugado o una fusión de proteína de al menos la región de enlazamiento al antígeno del anticuerpo de la invención a la proteína del suero, tal como albumina de suero humano o un fragmento de la misma para incrementar la vida media de la molécula resultante. Tal metodología se describe por ejemplo en Ballance et al. EP 0322094.

Otra posibilidad es una fusión de al menos la región de enlazamiento al antígeno del anticuerpo a proteínas capaces de enlazarse a proteínas de suero, tal como albumina de suero humano para incrementar la vida media de la molécula resultante. Tal metodología se describe por ejemplo en Nygren et al., EP 0 486 525.

Métodos para manipular anticuerpos alterados

5 Como se discutió anteriormente, los anticuerpos antiesclerostina que tienen secuencias V_H y V_L o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa mostrados aquí pueden ser utilizados para crear nuevos anticuerpos antiesclerostina modificando las secuencias de cadena pesada y/o ligera de longitud completa, secuencias V_H y/o V_L ,
 10 o las regiones constantes unidas a las mismas. Así, en otro aspecto las características estructurales de un anticuerpo antiesclerostina de la invención se utiliza para crear anticuerpos antiesclerostina relacionados estructuralmente que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como el enlazamiento a la esclerostina humana y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de la esclerostina (por ejemplo, enlazamiento a receptor, prevención o mejora de la osteólisis).

Por ejemplo, una o más regiones CDR de los anticuerpos divulgados, o mutaciones de los mismos, pueden ser combinados de manera recombinante con regiones marco conocidas y/o otro CDR para crear anticuerpos
 15 antiesclerostina adicionales, manipulados por vía recombinante de la invención, tal como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección previa. El material de partida para el método de manipulaciones una o más de las secuencias V_H y/o V_L provistas aquí, o una o más de las regiones CDR de las mismas. Para crear un anticuerpo manipulado, no es necesario preparar realmente (esto es, expresar como proteína)
 20 un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o V_L provistas aquí, o una o más de las regiones CDR de las mismas. En vez de esto, la información contenida en las secuencias se utiliza como material de partida para crear una secuencia de "segunda generación" derivada de las secuencias originales y luego se prepara la secuencia de "segunda generación" y se expresa como una proteína.

De acuerdo con lo anterior, en otra realización, la divulgación provee un método para preparar un anticuerpo antiesclerostina que consiste de: una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que tiene una
 25 secuencia CDR1 seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 1 – 11, una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 12 – 22, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 23 – 33; y una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia CDR1 seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 34 – 44, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo
 30 consistente of SEQ ID NOs: 45 – 55, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo consistente of SEQ ID NOs: 56 – 66; alterar al menos un residuo de aminoácidos dentro de la secuencia del anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia del anticuerpo de región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterado; y expresar la secuencia del anticuerpo alterada como una proteína.

De acuerdo con lo anterior, en otra realización, la divulgación provee un método para preparar un anticuerpo antiesclerostina utilizado para expresión en una célula de mamífero que consiste de: una secuencia de anticuerpo de
 35 cadena pesada de longitud completa que tiene una secuencia seleccionada del grupo of SEQ ID NOs: 111 – 121; y una secuencia de anticuerpo de cadena ligera de longitud completa que tiene una secuencia seleccionada del grupo de 122 – 132; alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de cadena pesada de longitud completa y/o la secuencia de anticuerpo de cadena ligera de longitud completa para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

40 La secuencia del anticuerpo alterado puede ser preparada seleccionando bibliotecas de anticuerpos que tengan secuencias de CDR fijas seleccionadas entre el grupo consistente of SEQ ID NOs: 23 – 33 o determinantes de enlazamientos esenciales mínimos como se describe en US 20050255552 y diversidad sobre las secuencias CDR1 y CDR2. La selección puede ser llevada a cabo de acuerdo con cualquier tecnología de selección apropiada para seleccionar anticuerpos a partir de librerías de anticuerpos, tales como la tecnología de fagos apropiada para
 45 seleccionar anticuerpos a partir de librerías de anticuerpos, tal como una tecnología de despliegue de fagos.

Pueden utilizarse técnicas de biología molecular estándar para preparar y expresar la secuencia de anticuerpos alterada. El anticuerpo codificado por la secuencia de anticuerpos alterada es aquella que retiene una, algunas, o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos antiesclerostina descritos aquí, propiedades funcionales que incluyen, pero no se limitan a, enlazamiento específico a la esclerostina humana, y el anticuerpo exhibe al menos
 50 una de las siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt basado en células, el anticuerpo bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células o bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de fosforilación de Smad1 o el anticuerpo inhibe el enlazamiento de esclerostina al LRP-6 o el anticuerpo incrementa la formación y masa y densidad óseas.

55 El anticuerpo alterado puede exhibir una o más, dos o más, o tres o más de las propiedades funcionales discutidas anteriormente.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden ser establecidas utilizando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos aquí, tales como los definidos en los ejemplos (por ejemplo, ELISAS).

5 En ciertas realizaciones de los métodos de anticuerpos manipulados, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente o selectivamente a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación del anticuerpo antiesclerostina y los anticuerpos antiesclerostina modificados resultantes pueden ser seleccionados en cuanto a su actividad de enlazamiento y/o otras propiedades funcionales tal como se describe aquí en métodos mutacionales que han sido descritos en la técnica. Por ejemplo, la Publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y seleccionar mutaciones en anticuerpos utilizando mutagénesis por saturación, ensamblaje de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la Publicación PCT WO 03/074679 de Lazar et al., describe métodos para utilizar métodos de selección computacional para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

15 Otro aspecto de la invención es pertinente a las moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de la invención. Ejemplos de secuencias de nucleótidos de origen de cadena ligera de longitud completa se muestran en SEQ ID NOs 144 – 145. Ejemplos de secuencias de nucleótidos de origen de cadena pesada de longitud completa se muestran en SEQ ID NOs 133 – 134. Ejemplos de secuencias de nucleótidos de cadena ligera de longitud completa optimizados para expresión en una célula de mamífero se muestran en SEQ ID NOs: 146 – 154. Ejemplos de secuencias de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa optimizadas para expresión en una célula de mamífero se muestran en SEQ ID NOs: 135 – 143.

20 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado de células, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es “aislado” o “se hace sustancialmente puro” cuando se purifica a partir de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandedo con CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase F. Ausubel et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la invención, puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o puede no contener secuencias intrónicas. En una realización, el ácido nucleico es una molécula de cADN. El ácido nucleico puede estar presente en un vector tal como un vector de despliegue de fago, o en un vector plásmido recombinante.

30 Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser obtenidos utilizando técnicas estándar de biología molecular. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe posteriormente más adelante), cADN que codifica las cadenas ligera y pesada del anticuerpo hecho por el hibridoma pueden ser obtenidos por técnicas estándar de amplificación por PCR o clonación de cADN. Para anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, utilizando técnicas de despliegue de fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede ser recuperado a partir de varios clones de fago que son miembros de la biblioteca.

40 Una vez que los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L son obtenidos, estos fragmentos de ADN pueden ser manipulados adicionalmente por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H está enlazado operativamente a otra molécula de ADN o a un fragmento que codifica a otra proteína, tal como una región constante de un anticuerpo o un enlazante flexible. El término “enlazado operativamente”, tal como se utiliza en este contexto pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de una manera funcional, por ejemplo, de tal forma que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN se retienen en marco, o de tal forma que la proteína se exprese bajo el control de un promotor deseado.

45 El ADN aislado que codifica la región V_H puede ser convertido en un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN de codificación de V_H a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo Kabat E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación estándar por PCR. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada se selecciona entre isotipos de IgG2. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede ser enlazado operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

55 El ADN aislado que codifica la región V_L puede ser convertido en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también en un gen Fab de cadena ligera) enlazando operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. La secuencia de genes de región constante de

cadena ligera humanos son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo Kabat E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden ser obtenidos por amplificación estándar por PCR. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

- 5 Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L son enlazados operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4 – Ser)₃, de tal manera que las secuencias de V_H y V_L pueden ser expresadas como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242: 423-426; Huston et al., 1988 Proc Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990 Nature 348: 552-554).

10 Generación de anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden ser producidos por una variedad de técnicas, incluyendo la metodología de anticuerpo monoclonal convencional por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, 1975 Nature 256: 495. Pueden emplearse muchas técnicas para producir un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

- 15 Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murínico. La producción de hibridoma en ratones es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas de aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Los asociados de fusión (por ejemplo, células de mieloma murínico) y los procedimientos de fusión son conocidos también.

- 20 Los anticuerpos quiméricos o humanizados pueden ser preparados con base en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murínico preparado como se describió anteriormente. El ADN que codifica la inmunoglobulina de cadena pesada y ligera puede ser obtenido a partir del hibridoma murínico de interés y manipulado para contener secuencias de inmunoglobulina no murínicas (por ejemplo humanas) usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murínicas pueden ser enlazadas a regiones humanas constantes utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4, 816,567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado las regiones CDR murínicas pueden ser insertadas en un marco humano utilizando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5225539 de Winter, y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen et al.

- 30 En una cierta realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la esclerostina pueden ser generados utilizando parte transgénica o transcromosómica de ratones que portan partes del sistema humano inmune en vez del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados aquí como ratones HuMAB y ratones KM, respectivamente, y se denominan aquí colectivamente como "ratones con Ig humanas".

- 35 El ratón HuMAB[®] (Medarex, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ no reordenadas, junto con mutaciones direccionadas que inactivan los locus de las cadenas endógenas μ y κ (véase por ejemplo, Lonberg et al., 1994 Nature 368(6474). De acuerdo con lo anterior, los ratones exhiben expresión reducida de IgM de ~~ratón~~ respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos sufren conmutación de clases y mutación somática para generar IgG κ monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg, N. y Huszar, D., 1995 supra; reviewed in Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol.13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de los ratones HuMAB, y de las modificaciones genéticas portadas por tales ratones, está descrita adicionalmente en Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; and Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851. Véase adicionalmente, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625, 126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; y de Lonberg y Kay; Patente de los Estados Unidos No. 5,545,807 de Surani et al.; las Publicaciones PCT Nos. WO 92/103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la Publicación PCT No. WO 01/14424 de Korman et al.

- 55 En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden ser elevados utilizando un ratón que porte secuencias de inmunoglobulina humana sobre transgenes y transcromosomas tal como un ratón que porta un transgen de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Tales ratones, denominados aquí como "ratones KM", están descritos en detalle en la Publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

5 Aún adicionalmente, sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden ser utilizados para elevar los anticuerpos de antiesclerostina de la invención. Por ejemplo, puede ser utilizado un sistema transgénico alternativo denominado como Xenomouse (Abgenix, Inc.). Tales ratones están descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 939,598; 6, 075,181; 6,114,598; 6,150,584 y 6,162,963 de Kucherlapati et al.

10 Además, sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden ser utilizados para elevar los anticuerpos de antiesclerostina de la invención. Por ejemplo, pueden utilizarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena liviana humana, denominados como "ratones TC"; tales ratones están descritos en Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727. Adicionalmente, se han descrito vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humanas en la técnica (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20: 889-894) y pueden ser utilizados para elevar los anticuerpos antiesclerostina de la invención.

15 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden ser preparados utilizando métodos de despliegue de fagos para seleccionar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humanos. Tales métodos de despliegue de fago para aislamiento de anticuerpos humanos están establecidos en la técnica o están descritos en los ejemplos más adelante. Véanse por ejemplo las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 de Ladner et al; las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,427,908 y 5,580,717 de Dower et al., las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,969,108 y 6,172,197 de McCafferty et al; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 de Griffiths et al.

20 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden ser preparados utilizando ratones SCID en los cuales se han reconstituido células inmunes humanas de tal forma que puede generarse una respuesta anticuerpo humana por inmunización. Tales ratones están descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 476,996 y 5, 698,767 de Wilson et al.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

25 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, esplenocitos y/o células nodulares linfáticas de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden ser seleccionados para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos a partir de ratones inmunizados pueden ser fusionadas a un sexto del número de células de mielomas de ratón no secretadoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células son sembradas en placa a aproximadamente 2 x 145 en placas de microtitulación de fondo plano, seguidas por incubación de dos semanas en un medio selectivo que contiene 20% de suero de clon fetal, medio condicionado "653" al 18%, origen al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0.055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT es agregado 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden ser cultivadas en un medio en el cual el HAT es reemplazado con HT. Los pozos individuales pueden entonces ser seleccionados por ELISA en búsqueda de anticuerpos monoclonales IgM e IgG humanos. Una vez que ocurre el crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede ser observado usualmente después de 10 – 14 días. Los hibridomas que secretan el anticuerpo pueden ser reseleccionados, seleccionados de nuevo, y si todavía son positivos en cuanto a IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden ser subclonados al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden ser entonces cultivados *in vitro* para generar pequeñas cantidades del anticuerpo en un medio para cultivo de tejidos para su caracterización.

45 Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden ser cultivados en matraces rotatorios de dos litros para purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden ser filtrados y concentrados antes de la cromatografía de afinidad con A-sefarosa de proteína (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida puede ser verificada por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución reguladora puede ser intercambiada en PBS, y la concentración puede ser determinada por OD₂₈₀ utilizando un coeficiente de extinción de 1.43. Se pueden extraer alícuotas de los anticuerpos monoclonales y almacenarse en al -80°C.

50 Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención también pueden ser producidos en un transfectoma de célula huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

55 Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, los ADN que codifican cadenas ligera y pesada o de longitud completa, pueden obtenerse por técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés)

y los ADN pueden ser insertados en vectores de expresión de tal forma que los genes se enlazan operativamente a secuencias de control transcripcionales y translacionales. En este contexto, el término “enlazado operativamente” se entiende con el significado de que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de tal forma que las secuencias de control transcripcionales y translacionales dentro del vector sirven para su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se escogen de manera que sean compatibles con la célula anfitriona de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden ser insertados en un vector separado o, más típicamente, ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo son insertados en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios sobre el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación en el extremo romo si no están presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos aquí pueden ser utilizadas para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de cadena pesada y constante de cadena ligera del isotipo deseado de tal forma que el segmento V_H está enlazado operativamente a los segmentos CH dentro del vector y el segmento V_L está enlazado operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señalización que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo a partir de una célula anfitriona. El gen de la cadena del anticuerpo puede ser clonado en el vector de tal forma que el péptido de señalización se enlaza en marco al terminal amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señalización puede ser un péptido de señalización de inmunoglobulina o un péptido de señalización heteróloga (esto es, un péptido de señalización a partir de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. El término “secuencia reguladora” pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Será evidente para los experimentados en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la selección de la célula anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión en células anfitrionas de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen niveles altos de expresión de proteína en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivado del citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Alternativamente, pueden utilizarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de P-globina. Aún adicionalmente, los elementos reguladores compuestos de las secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y el repetidor de terminal largo del virus tipo 1 de leucemia de células T humana (Takebe, Y. et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8: 466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (por ejemplo, orígenes de la replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células anfitrionas en las cuales se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4, 399,216; 4, 634,665 y 5, 179,017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen del marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metrotrexato, sobre una célula anfitriona en la cual se ha introducido el vector. Los genes del marcador seleccionable incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células anfitrionas dhfr con selección/amplificación con metrotrexato) y el neogen (para selección por G418).

Para expresión de las cadenas ligeras y pesadas, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan hacia una célula anfitriona por técnicas estándar. Las diversas formas del término “transfección” se entiende que abarcan una amplia variedad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula anfitriona procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención bien sea en células anfitrionas procariotas o eucariotas. La expresión de los anticuerpos en células eucariotas, en particular células anfitrionas de mamíferos, es discutida porque tales células eucariotas, y en particular las células de mamífero, son más probablemente propensas que las células procariotas para el ensamblaje y secretan un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. La expresión procariota de los genes del anticuerpo ha sido reportada como inefectiva para la producción de grandes rendimientos de anticuerpo activo (Boos, M. A. y Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6: 12 – 13).

Las células anfitrionas de mamíferos para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr, descritas por Urlaub y Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 usadas con un marcador seleccionable DH FR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621, células de mieloma de NSO, células COS y células SP2. En particular, para uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión del gen GS

mostrado en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes del anticuerpo se introducen en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos son producidos por el cultivo de células anfitrionas durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o la secreción del anticuerpo hacia el medio de cultivo en el cual están cultivadas las células anfitrionas. Los anticuerpos pueden ser recuperados a partir del medio de cultivo utilizando métodos estándar de purificación de proteínas.

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente divulgación caracteriza moléculas biespecíficas o multiespecíficas que comprende un anticuerpo anti-esclerostina o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o regiones de enlazamiento al antígeno del mismo, pueden ser derivados o enlazados a otras moléculas funcionales, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se enlaza o a al menos dos sitios de enlazamiento o moléculas objetivo diferentes. El anticuerpo de la invención puede en efecto ser derivado o enlazado a más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se enlazan a más de dos sitios de enlazamiento y/o moléculas objetivo diferentes; tales moléculas biespecíficas también pretenden ser abarcadas por el término "molécula biespecífica" tal como se utiliza aquí. Para crear una molécula biespecífica, un anticuerpo de la invención puede ser enlazado funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o alguna otra) a una o más moléculas de enlazamiento, tal como otro anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, péptido o imitador de enlazamiento, de tal forma que da como resultado una molécula biespecífica.

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de enlazamiento a la esclerostina y una segunda especificidad de enlazamiento para un segundo epítipo objetivo. Por ejemplo, el segundo epítipo objetivo es otro epítipo de esclerostina diferente del primer epítipo objetivo. Otro ejemplo es una molécula biespecífica que comprende al menos una primera especificidad de enlazamiento para esclerostina y una segunda especificidad de enlazamiento para un epítipo dentro del Dkk-1. Otro ejemplo es una molécula biespecífica que comprende al menos una primera especificidad de enlazamiento para esclerostina y una segunda especificidad de enlazamiento para un epítipo dentro de LRP4.

Adicionalmente, para la divulgación en la cual la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir adicionalmente una tercera especificidad de enlazamiento, además del primero y segundo epítipo objetivos.

En una realización, las moléculas biespecíficas comprenden como especificidad de enlazamiento al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o una cadena Fv sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o un fragmento mínimo de las mismas tal como un Fv o un constructo de cadena sencilla tal como se describe en Ladner et al. Patente de los Estados Unidos No. 4,946,778.

Otros anticuerpos que pueden ser empleados en tales moléculas biespecíficas son anticuerpos murínicos, quiméricos y humanizados monoclonales.

Las moléculas biespecíficas pueden ser preparadas conjugando las especificidades de enlazamiento constituyentes, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de enlazamiento de la molécula biespecífica puede ser generada separadamente y luego conjugada al otro. Cuando las especificidades de enlazamiento son proteínas o péptidos, puede utilizarse una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) y sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-l-carboxylate (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, 1985 Behring Ins, Mitt. No. 78,118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83, and Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375. Agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de enlazamiento son anticuerpos, pueden ser conjugados por puentes de sulfhidrilo de las regiones bisagra del terminal C de las dos cadenas pesadas. En una realización particular, la región bisagra es modificada para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, por ejemplo uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de enlazamiento pueden ser codificadas en el mismo sector y expresadas y ensambladas en la misma célula anfitriona. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es mAb, x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o la proteína de fusión ligando x Fab. Una molécula biespecífica puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de enlazamiento, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de enlazamiento. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para

preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos No. 5,260,203; la Patente de los Estados Unidos 5,455,030; Patente de los Estados Unidos No. 4,881,175; Patente de los Estados Unidos No. 5,132,405; Patente de los Estados Unidos No. 5,091,513; Patente de los Estados Unidos No. 5,476,786; Patente de los Estados Unidos No. 5,013,653; Patente de los Estados Unidos No. 5,258,498; y Patente de los Estados Unidos No. 5,013,653; Patente de los Estados Unidos No. 5,258,498; y Patente de los Estados Unidos No. 5,482,858.

El enlazamiento de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos puede ser confirmado, por ejemplo, mediante el ensayo de inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis por FACS, bioensayo (por ejemplo inhibición de crecimiento), o el ensayo de inmunoprecipitación Western Blot. Cada uno de estos ensayos detecta en general la presencia de complejos proteínas-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

Anticuerpos multivalentes

En otro aspecto, la presente divulgación provee compuestos multivalentes comprenden al menos dos porciones de enlazamiento a antígeno idénticas o diferentes de los anticuerpos de la invención en que enlazan a la esclerostina. Preferiblemente, dada la naturaleza trimérica de la esclerostina, tales compuestos proveen al menos tres o cuatro porciones de enlazamiento al antígeno del anticuerpo. Las porciones de enlazamiento al antígeno pueden ser enlazadas entre sí a través de fusión con proteína o un enlace covalente o no covalente. Alternativamente, se han descrito métodos de enlazamiento para moléculas biespecíficas. Los compuestos tetravalentes pueden ser obtenidos por ejemplo entrecruzamiento de anticuerpos de los anticuerpos de la invención con un anticuerpo que se enlace a las regiones constantes de los anticuerpos de la invención, por ejemplo el Fc o la región bisagra.

Los dominios de trimerización están descritos por ejemplo, en la Patente Boreau EP 1 012 280B1. Los módulos pentamerizantes están descritos por ejemplo en PCT/EP97/05697 (WO98/18943).

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención provee una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o regiones de enlazamiento a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos que enlazan a diferentes epítomos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ser administradas en una terapia de combinación, por ejemplo, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-esclerostina de la presente invención combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o antiosteoporótico. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden ser usados en terapia de combinación se describe en mayor detalle más adelante en la sección de usos de los anticuerpos de la invención. Las composiciones se formulan preferiblemente a pH fisiológico.

Tal como se utiliza aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardamiento isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El vehículo debería ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, esto es, anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica puede ser recubierto con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico indeseado (véase por ejemplo Berge, S.M., et al., 1977 J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodihídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxí alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y aromáticos sulfónicos, y similares. Las sales de adición básica incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietalonamina, etilendiamina y procaina.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido

ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascórbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico y ácido fosfórico.

5 Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden ser empleados en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilen glicol, polietilen glicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersiones, y mediante el uso de surfactantes.

10 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, y preservativos, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede ser asegurada bien sea por procedimientos de esterilización, supra, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéuticamente inyectable puede llevarse a cabo mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción, tales como, monoestearato de aluminio y gelatina.

15 Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en el caso de cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

20 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura organizada adecuada para concentraciones altas del fármaco. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol y polietilen glicol líquido), y mezclas de los mismos. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser llevada a cabo incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

25 Las soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes numerados anteriormente, según se requiera, seguida por esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

30 La cantidad de ingrediente activo que puede ser combinada con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del sujeto que está siendo tratado, y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede ser combinada con un material portador para producir una forma de dosificación individual generalmente será aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, a parte de un cien por ciento, esta cantidad variará desde 0.01 por ciento aproximadamente hasta aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, desde aproximadamente 0.1 por ciento hasta aproximadamente 70 por ciento, o desde aproximadamente 1 por ciento hasta aproximadamente 30 por ciento del ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Los regímenes de dosificación se ajustan para proveer la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo individual, varias dosis divididas pueden ser administradas con el tiempo o la dosis puede ser proporcionalmente reducida o incrementada según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Esencialmente es ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación tal como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención son dictadas por y directamente en dependencia de las

características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a alcanzar, y las limitaciones inherentes en el arte de la composición tales como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

5 Para la administración del anticuerpo, la dosificación varía desde aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente de 0.01 a 5 mg/kg, de peso corporal del anfitrión. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1 – 10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo comprende la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez de cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación para un anticuerpo antiesclerostina de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa siendo dado el anticuerpo utilizando uno de las siguientes programaciones de dosificación: cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; cada tres semanas; 3 mg/kg de peso corporal seguido una vez por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

15 En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de enlazamiento se administran simultánea o secuencialmente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cabe dentro de los rangos indicados. El anticuerpo se administra usualmente en ocasiones múltiples. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos pueden ser irregulares según lo indiquen los niveles de medición en sangre de anticuerpo con respecto al antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plaza de aproximadamente 1-1000 µg/ml y algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

20 Alternativamente, el anticuerpo puede ser administrado como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varía dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguida por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de la administración pueden variar si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente no frecuentes sobre un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos se requiere algunas veces hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine o hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de esto, el paciente puede recibir la administración de un régimen profiláctico.

25 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse de tal manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o del éster, sal o amida del mismo, la ruta de administración, el tiempo de administración, la rata de expresión del compuesto en particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente que está siendo tratado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

30 Una “dosificación terapéuticamente efectiva” de un anticuerpo antiesclerostina de la invención puede dar como resultado un descenso en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y duración de los periodos libres de los síntomas de la enfermedad, o una prevención de la incapacidad o discapacidad debida a la aflicción de la enfermedad.

35 Una composición de la presente invención puede ser administrada por una o más rutas de administración utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como será evidente para el experimentado en la técnica, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración de los anticuerpos de la invención incluyen administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La expresión “administración parenteral” tal como se utiliza aquí significa modos de administración diferentes a administración entérica y tópica, usualmente por inyección incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intrastemal.

40 Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede ser administrado mediante una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden ser preparados con vehículos que protegen el compuesto contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general para los experimentados en la técnica véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición de la invención puede ser administrada con un dispositivo de inyección hipodérmico sin agujas, tales como los dispositivos mostrados en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 o 4,596,556. Ejemplos de implante y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de los Estados Unidos No. 4,487,603, la cual muestra una bomba de microinfusión implantable para dispensar mediación a una rata controlada; la Patente de los Estados Unidos No. 4,486,194, la cual muestra un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel. La Patente de los Estados Unidos No. 4,447,233, la cual muestra una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una rata de infusión precisa; la Patente de los Estados Unidos No. 4,447,224, la cual muestra un aparato de infusión implantable de flujo variable para administración continua de fármaco; la Patente de los Estados Unidos No. 4,439,196, la cual muestra un sistema de administración de fármacos osmótico que tiene compartimientos de cámaras múltiples; y la Patente de los Estados Unidos No. 4,475,196, la cual muestra un sistema de administración osmótico de fármacos. Muchos otros tales implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos para los experimentados en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden ser formulados para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de manufactura de liposomas, véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más unidades estructurales que se transportan selectivamente hacia dentro de células u órganos específicos, potenciando así la administración programada de fármacos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). Unidades estructurales objetivo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5,416,016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor surfactante de proteína A (Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos de la presente invención tienen utilidades en el diagnóstico y terapia *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden ser administradas a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, o en un sujeto, por ejemplo, *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de trastornos. El término "sujeto" tal como se utiliza aquí pretende incluir animales humanos y no humanos. Animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles.

Los métodos son particularmente adecuados para tratar, prevenir o diagnosticar trastornos relacionados con la esclerostina y/o trastornos aberrantes de la densidad mineral ósea, por ejemplo, osteoporosis.

La invención también provee métodos para incrementar el contenido mineral y/o densidad mineral del hueso. Las composiciones de la presente invención también pueden ser útiles para mejorar los resultados en los procedimientos ortopédicos, procedimientos dentales, cirugías de implante, reemplazo de articulaciones, injerto óseo, cirugía cosmética de huesos y reparación de huesos tal como curación de fracturas, curación sin unión, curación de uniones retardadas y reconstrucción facial. Una o más composiciones pueden ser administradas antes, durante y/o después del procedimiento, reemplazo, injerto, cirugía o reparación.

Tal como se utiliza aquí, un "trastorno relacionado con la esclerostina" incluye trastornos en los cuales la densidad mineral ósea (BMD) es anormal y/o patológicamente baja con respecto a sujetos saludables. Los trastornos caracterizados por BMD baja y/o fragilidad ósea incluyen pero no se limitan a osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta (OI), necrosis avascular (osteonecrosis), fracturas y curación de implantes (implantes dentales e implantes de cadera), pérdida de hueso debido a otros trastornos (por ejemplo asociados con infección por VIH, cánceres y artritis). Otros "trastornos relacionados con la esclerostina" incluyen pero no se limitan a artritis reumatoide, osteoartritis, artritis y la formación y/o presencia de lesiones osteolíticas.

- 5 Tal como se utiliza aquí “un trastorno relacionado con esclerostina” incluye condiciones asociadas con o caracterizadas por niveles aberrantes de esclerostina. Estos incluyen cánceres y condiciones osteoporóticas (por ejemplo, osteoporosis u osteopenia), algunos de los cuales se superponen con “trastornos relacionados con la esclerostina” tal como se define aquí. Los cánceres relacionados con la esclerostina pueden incluir mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple con lesiones osteolíticas), cáncer de seno, cáncer de colon, melanoma, cáncer hepatocelular, cáncer epitelial, cáncer esofágico, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer pancreático, así como muchas metástasis de los mismos.
- 10 Un “trastorno relacionado con la esclerostina” también puede incluir condiciones renales y cardiovasculares, debidas al menos a la expresión de la esclerostina en el riñón y en la cardiovascular. Dichos trastornos incluyen pero no se limitan a trastornos renales tales como enfermedades glomerulares (por ejemplo, glomerulonefritis aguda y crónica, glomerulonefritis rápidamente progresiva, síndrome nefrótico, glomerulonefritis focal proliferativa, lesiones glomerulares asociadas con enfermedad sistémica, tales como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, mieloma múltiple, diabetes, enfermedad policística del riñón, neoplasia, enfermedad de células falciformes, y enfermedades inflamatorias crónicas), enfermedades tubulares (por ejemplo, necrosis tubular aguda y fallo renal agudo, enfermedad renal policística, riñón medularmente esponjoso, enfermedad cística medular, diabetes nefrogénica, y acidosis tubular renal), enfermedades túbulointersticiales (por ejemplo, pielonefritis, nefritis túbulointersticial inducida por fármacos y toxinas, nefropatía hipercalcémica, y nefropatía hipocálemica) fallo renal agudo y rápidamente progresivo, fallo renal crónico, nefrolitiasis, gota, enfermedades vasculares (por ejemplo, hipertensión y nefrosclerosis, anemia hemolítica microangiopática, enfermedad renal ateroembólica, necrosis cortical difusa e infartos renales), o tumores (por ejemplo, carcinoma de células renales y nefroblastomas).
- 15 Dichos trastornos incluyen también pero no se limitan a trastornos cardiovasculares tales como enfermedad cardíaca isquémica (por ejemplo angina pectoris, infarto del miocardio, y enfermedad cardíaca isquémica crónica), enfermedad cardíaca por hipertensión, enfermedad cardiopulmonar, enfermedad cardiovalvular (por ejemplo, fiebre reumática y enfermedad de corazón reumático, endocarditis, prolapso de la válvula mitral y estenosis de la válvula aortica), enfermedades cardíacas congénitas (por ejemplo, lesiones valvulares y vasculares obstructivas, defecto de los septums atriales o ventriculares, y ductus arteriosus patentes), o enfermedad del miocardio (por ejemplo miocarditis, cardiomiopatía congestiva, y cardiomiopatía hipertrófica).
- 20 Cuando los anticuerpos para la esclerostina se administran junto con otro agente, los dos pueden ser administrados en cualquier orden (esto es secuencialmente) o simultáneamente.
- 30 De acuerdo con una realización adicional de la invención, los anticuerpos de la invención pueden ser empleados como adjuntos o adyuvantes para otra terapia, por ejemplo, una terapia que utilice un inhibidor de resorción ósea, por ejemplo una terapia para osteoporosis, en particular una terapia que emplee calcio, una calcitonona o un análogo o un derivado de la misma, por ejemplo, calcitonina de salmón, anguila o humana, calcilíticos, calcimiméticos (por ejemplo cinacalcet), una hormona esteroide, por ejemplo un estrógeno, un agonista de estrógeno parcial o una combinación estrógeno-gestágeno, un SERM (modulador del receptor de estrógenos selectivo), por ejemplo raloxifeno, lasofoxifeno, bazedoxifeno, arzoxifeno, FC1271, Tibolona (Livial®), un SARM (modulador del receptor selectivo de andrógeno), un anticuerpo RANKL (tal como denosumab), un inhibidor de la catepsina K, vitamina D o un análogo del mismo o PTH, un fragmento de PTH o un derivado de PTH, por ejemplo PTH (1-84) (tal como Preys™), PTH (1-34) (tal como Fortes™), PTH (1-36), PTH (1-38), PTH (1-31)NH2 o PTS 893.
- 35 De acuerdo con otra realización, los anticuerpos de la invención pueden ser empleados en combinación con otras metodologías de terapia de osteoporosis actuales, incluyendo bisfosfonatos (por ejemplo, Fosamax™ (alendronato), Actonel™ (risedronato sodio), Bonviva™ (ácido ibandronico), Zometa™ (ácido zoledrónico), Aclasta™/Reclast™ (ácido zoledrónico), olpadronato, neridronato, skelid, bonefos), estatinas, esteroides anabólicos, sales de lantano y estroncio, y fluoruro de sodio.
- 40 En una realización específica, los anticuerpos de la invención pueden ser administrados en combinación con un agente modulador de LRP4, esto es, un agente que modula la expresión o la actividad del LRP4, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante de LRP4.
- 45 En otra realización específica, los anticuerpos de la invención pueden ser administrados en combinación con un agente modulador de DKK1, esto es como un agente que interfiere o neutraliza el antagonismo mediado por Dkk1 de la señalización de Wnt, por ejemplo, un anticuerpo neutralizador de DKK1.
- 50 Así, la invención también provee el uso de un anticuerpo o proteína funcional de la invención y (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes liberadores de hormona paratiroides (calcilíticos), y la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina.
- 55 En otra realización, la invención provee el uso de un anticuerpo o proteína funcional de la invención y la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el medicamento se utiliza en conjunción con (i) ácido

zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroides (calcilíticos).

5 En otra realización, la invención provee el uso de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide (calcilíticos) en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el medicamento se utiliza en conjunción con un anticuerpo o proteína funcional de la invención.

10 En otra realización, la invención provee el uso de un anticuerpo o proteína funcional de la invención y la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el paciente ha sido preadministrado con (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroides (calcilíticos).

15 En otra realización, la invención provee el uso de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroides (calcilíticos), y la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el paciente ha sido preadministrado con un anticuerpo, o proteína funcional de la invención.

En una realización de las combinaciones citadas anteriormente, el hPTH es hPTH (1-34).

20 En una realización, los anticuerpos de la invención pueden ser utilizados para detectar niveles de esclerostina, o niveles de células que contienen esclerostina. Esto puede lograrse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra *in vitro*) y una muestra de control con el anticuerpo antiesclerostina bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y la esclerostina. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la esclerostina se detecta y compara en la muestra y en el control. Por ejemplo, los métodos de detección estándar, bien conocidos en la técnica, tales como ELISA y análisis citométrico de flujo pueden ser
25 ejecutados utilizando las composiciones de la invención.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención provee adicionalmente métodos para detectar la presencia de esclerostina (por ejemplo, antígeno de esclerostina humana) en una muestra, o medir la cantidad de esclerostina, comprendiendo poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo de la invención o una región de enlazamiento al antígeno del mismo, el cual específicamente se enlaza a la esclerostina, bajo condiciones
30 que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y esclerostina. La formación de un complejo se detecta entonces, en donde una diferencia en la formación de complejo entre la muestra comparada con la muestra de control es indicativa de la presencia de esclerostina en la muestra.

También dentro del alcance de la invención están los kits que consisten de las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, anticuerpos humanos y moléculas biespecíficas) de la invención e instrucciones para el uso. El kit
35 puede contener adicionalmente al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria el cual se enlaza a un epítipo sobre el antígeno objetivo distinto del primer anticuerpo). Por ejemplo, tales kits pueden comprender un anticuerpo o proteína funcional de la invención y uno o más de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y (vi) agentes de liberación de hormona paratiroides (calcilíticos). Los kits incluyen típicamente
40 una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier escrito, o material registrado suministrado sobre o con el kit, o que de alguna otra manera acompañe al kit.

La invención que ha sido descrita completamente, es ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos y reivindicaciones, los cuales son ilustrativos y no implican ser limitantes adicionalmente. Los experimentados en la
45 técnica reconocerán o serán capaces de establecer usando no más allá de experimentación de rutina, equivalentes numerosos a los procedimientos específicos descritos aquí. Tales equivalentes están dentro del alcance de la presente invención y reivindicaciones.

Ejemplos:

Ensayos funcionales

Ensayos de fosfatasa alcalina (ALP)

50 Células

Las células MC3T3 1 b son un clon de las células MC3T3-JP que expresan OSE2-luc. Este clon fue obtenido después de transfección estable de MC3T3-JP (osteoblasto de ratón MC3T3-E1, clon en Japón, Jp; un obsequio amable del Dr. T. Kokkubo, Novartis, Japón) utilizando 8x-OSE2wt-mOG2luc en pcDNA3.1+.

Medio de cultivo

Las células MC3T3-1b fueron cultivadas de manera rutinaria en un medio esencial mínimo alfa (MEM; Invitrogen, Cat#22561-021) complementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS; Amimed Cat#2-01F100-I), L-glutamina 2 mM (Gibco Cat#25030-024), 50 IU de penicilina/50 µg/ml de estreptomycin (Amimed Cat#4-01F00-H) y Hepes 10 mM (Gibco Cat#15630-056) y 0.75 mg/ml de G418 (Gibco Cat#10131-027) (medio de cultivo de mantenimiento).

Soluciones de reserva

Ácido ascórbico 10 mM (Wako Pure Chemical Cat#013-12061) en DMEM-LG, BMP-2 14 nM (R&D Cat#355-BM-010) en ácido acético 5 mM y albúmina de suero bovino al 0.1% (BSA, Sigma Cat#A-8806); β-glicerofosfato 1 M (Sigma Cat#G9891) en solución Tyrode; solución Tyrode: 9.72g de sal de Tyrode (Sigma Cat#T2145) y 1g de NaHCO₃ en 1L de H₂O, regulador de sustrato ALP: glicina 25 mM y MgCL₂ 0.5 mM, pH 10.5; solución de sustrato ALP: 5mg de p-nitrofenil fosfato (sustrato Sigma 104, Sigma Cat#50942-200TAB) en 3.75ml de regulador de sustrato ALP, pH 10.5; p-nitrofenol 1 mM (Sigma Cat#104-1) en solución de sustrato ALP.

Ensayo

Para los ensayos ALP, las células MC3T3 1b fueron cultivadas en medio de cultivo de ensayo (correspondiente al medio de cultivo de mantenimiento en ausencia de G418). Las MC3T3 1 b fueron sembradas en 200 µl 3x10⁴ células/ml si la inducción comenzó 72 horas después o 2x10⁴ células/ml si la inducción comenzó 96 horas después. Las placas fueron incubadas durante 72 horas o 96 horas a 37°C y 5% de CO₂, antes de que se iniciara la inducción utilizando medio completo (complementando el medio de cultivo con b-glicerofosfato 10 mM (bGP) y ácido ascórbico 50 µM (AA)). Los anticuerpos por probar fueron diluidos con medio completo. El anticuerpo junto con BMP-2 (0.7 nM) y esclerostina (50 nM) fueron agregados a los pozos (por triplicado) en un volumen final de 200 µl de medio completo. En cada placa, se incluyeron 4 controles internos en triplicado: un control de solvente (BSA), un control de BMP-2 (0.7 nM), BMP-2 + esclerostina (BMP-2 (0.7 nM) y esclerostina (50 nM)) y un control de esclerostina (50 nM). Las placas fueron incubadas durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Al final del periodo de inducción el ensayo fue terminado eliminando el medio y agregando 150 µl de solución de sustrato de ALP (recién preparada) a cada pozo. Las placas fueron incubadas durante 3 – 30 minutos. Se agregaron 100 µl de NaOH 1M para detener la reacción y las placas fueron agitadas sobre un agitador de placas. Se leyó la OD contra un blanco a 405 nM y se calculó la actividad de ALP en nmol/minuto. Se utilizó esclerostina 50 nM para obtener al menos 70% de inhibición de producción de ALP inducida por BMP-2 [0.7 nM BMP-2].

Ensayo de WNT

Este ensayo fue establecido para probar anticuerpos con base en la capacidad de la esclerostina para inhibir la inducción mediada por Wnt1 del gen informador STF.

Transfección de células HEK293

En el día 1, se sembraron las células HEK293 a 1.3 - 1.4 x 10⁵ células por pozo (en volumen de 0.5 ml) de una placa de poli-D-lisina de 24 pozos (BD-BioCoat #356414) en DMEM (Gibco, Cat#61965-026) que contenía 10% de suero de ternera fetal (FCS), 1% de L-glutamina (Gibco, Cat #25030.024), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, cat #11140) sin antibióticos. La transfección fue llevada a cabo en el día 2 con lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat#11668-019). Para cada pozo que se iba a transfectar, se agregaron las siguientes cantidades de plásmidos hasta un volumen final de 50 µl OptiMEM[®]1 (Gibco, Cat#31985-047): para pozos de control (pcDNA3+, 480 ng; SuperTopFlash (STF) 20 ng; phRL-CMV, 0.5 ng) y para pozos de tratamiento con Wnt1 (pcDNA-wnt1, 20 ng; pcDNA3+, 460 ng; SuperTopFlash (STF) 20 ng; phRL-CMV, 0.5 ng).

En un segundo tubo, se diluyeron 1.6 µl de lipofectamina 2000 en 50 µl de OptiMEM[®]1 y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. El contenido de los dos tubos fue mezclado entonces agregando el contenido del tubo de lípido al tubo de ADN y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo ADN-lípido. El complejo ADN-lípido (100 µl) fue agregado entonces de manera homogénea a los pozos y se incubó a 37°C en CO₂ al 5% durante 5 horas. Al final de la incubación de 5 horas, las celdas estaban listas para tratamiento con los reactivos de prueba tales como SOST, anticuerpos etc.

Establecimiento de la inhibición dependiente de la dosis de SOST

Para establecer la curva de inhibición de la dosis, se preparó una serie de diluciones de dos veces de rhSOST en DMEM que contenía FCS al 10%, L-glutamina al 1% y 1% de aminoácidos no esenciales sin antibióticos, comenzando a 160 nM. La concentración de reserva de rhSOST fue de 260 µg/ml en DMEM con FCS al 1%. De rutina, cada condición fue probada en duplicados. Por lo tanto, se preparó 1 ml de medio para cada condición y se agregaron 450 µl por pozo después de eliminar el medio que contenía la mezcla de transfección de los pozos. El tiempo de tratamiento fue de 18-20 horas. Al final de la incubación, se llevó a cabo el ensayo de luciferasa tal como se delinea más abajo.

Prueba de los anticuerpos anti SOST

5 Los anticuerpos fueron premezclados con SOST antes de agregarlos a las células. Para este propósito, se preparó un medio DMEM (FCS al 10%, L-glutamina al 1% y 1% de aminoácidos no esenciales sin antibióticos) con 20 a 30 nM de rhSOST. Luego, se agregaron diferentes diluciones de los anticuerpos probados al medio que contenía SOST de acuerdo con el diseño experimental. Estas mezclas fueron preparadas 40 minutos antes del tratamiento. Cada condición fue probada de rutina en duplicados. Para hacerlo así, se preparó 1 ml de medio para cada condición y se agregaron 450 µl por pozo después de eliminar la mezcla de transfección que contenía el medio de los pozos. El tiempo de tratamiento fue de 18 – 20 horas. Al final de la incubación, se llevó a cabo el ensayo con luciferasa como se delinea más abajo.

10 Ensayo con luciferasa

15 Al final de la incubación, se retiró el medio, y se agregaron 300 µl de regulador de lisis pasivo 1X (Promega, Cat#E194A) a las células lisadas. La actividad de la luciferasa fue medida entonces utilizando el Dual-Glo Luciferase System (Promega, Cat#E2940) con 30 µl de lisados en duplicados. El ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con el folleto de instrucciones provisto con el kit. Típicamente, se usaron 30 µl de Dual-Glo luciferasa (luciferasa de luciérnaga); para STF) y 30 µl de Dual-Glo Stop and Glo (luciferasa de Renilla; para control de la eficiencia de la transfección). Las señales luminiscentes fueron medidas con el instrumento Mithras LB940 (Berthold Technologies).

Cálculo de los datos

Se calculó la relación de las luciferasas de luciérnaga a renilla. Los resultados finales se expresan fijando el valor de Wnt1 sin SOST como 1.

20 Ensayo de mineralización

Células

Las células MC3T3 1b son un clon de las células MC3T3-JP que expresan OSE2-luc. Este clon fue obtenido después de transfección de MC3T3-JP (osteoblastos de ratón MC3T3-E1, clon de Japón, Jp; un amable obsequio del Dr. T. Kokkubo, Novartis, Japón) utilizando 8x-OSE2wt-mOG2luc en pcDNA3.1+.

25 Medio de cultivo

Las células MC3T3-1b fueron cultivadas de rutina en medio esencial mínimo alfa (MEM In vitrogen, Cat#22561-021) complementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS; Amimed Cat#2-01F100-I), L-glutamina 2 mM (Gibco Cat#25030-024), 50 IU de penicilina/50 µg/ml de estreptomycin (Amimed Cat#4-01F00-H) y Hepes 10 mM (Gibco Cat#15630-056) y 0.75 mg/ml de G418 (Gibco Cat#10131-027) (medio de cultivo de mantenimiento).

30 Ensayo de Mineralización

35 El calcio asociado con la matriz depositado en los pozos fue determinado en células MC3T3-1b utilizando el kit de calcio (Axon Lab, Cat#AXON0012). Las células fueron sembradas a 6×10^3 células/pozo o 2×10^3 células/pozo para mejorar la respuesta de las células en placas de 96 pozos en 100 µl de medio de cultivo de ensayo (medio de cultivo de mantenimiento sin G418) y se incubaron durante 3 días hasta alcanzar la confluencia. El medio de cultivo de ensayo fue cambiado entonces y se probaron los compuestos agregados junto con β-glicerofosfato 10 mM (bGP; Sigma Cat#G9891) y ácido ascórbico 50 µM (AA; Wako Pure Chemical Cat#013-12061). Antes de su adición a las células, la esclerostina y los Fab que se iban a probar fueron preincubados en una placa separada durante 2 horas a temperatura ambiente; entre tanto las placas de ensayo de 96 pozos recibieron BMP-2 2.1 o 2.8 nM (R&D Systems, Cat#355-BM-010) antes de recibir la mezcla esclerostina-Fab. Las células fueron incubadas durante 14 días y el medio de ensayo se reemplazó cada 3-4 días. En resumen, al final de la incubación, las células fueron lavadas dos veces con 200 µl de PBS/pozo, se agregaron 50 µl de HCl 0.5 M en cada pozo y las placas fueron congeladas a -20°C durante un mínimo de 24 horas. En el momento apropiado, las placas fueron descongeladas hasta temperatura ambiente durante 2 horas y se transfirieron 10 µl de cada pozo a una nueva placa de 96 pozos. Se agregó entonces Solución de Trabajo de Calcio (1:5) (200 µl) y 5-30 minutos después, las placas fueron leídas a 595 nM sobre un lector de microplacas.

45 La absorbancia fue convertida en µg de calcio de acuerdo con una curva estándar, el valor del pozo de control (ácido ascórbico y beta-glicerofosfato) fue sustraído de los datos de cada pozo y los resultados finales fueron expresados como % de mineralización inducida por BMP- 2.

Fosforilación de SMAD1 Western

50 Material

ES 2 448 542 T3

Osteoblastos de ratón MC3T3-E1 (clon de Japón, amable obsequio del Dr. T. Kokkubo, Novartis, Japón) células C3H10T1/2 (embrión mesenquimal de ratón; ATCC, Cat.Nb.: CCL-226)

SCL no-glicosilado, derivado de E. coli (Novartis, PSU5257)

15N SCL no-glicosilado, derivado de E. coli (Novartis, PSU11274)

5 hSOST-APP, glicosilado, derivado de HEK-EBNA (Novartis, BTP11100)

rhSCL, glicosilado, derivado de células de mieloma de ratón (R&D Systems, Cat.Nb.: 1406-ST/CF)

Anticuerpo anti hSOST (R&D Systems, Cat.Nb.: AF1406)

Reactivo de extracción phosphoSafe (Novagen, Cat. Nb.: 71296-3)

Coctel inhibidor de proteasa conjunto III (Calbiochem, Cat. Nb.: 539134)

10 Gel de tris acetato NuPAGE Novex al 7%, 1.5 mm, 15 pozos (Invitrogen, Cat. Nb.: EA03585)

Regulador de desarrollo tris-acetato SDS 20x (Invitrogen, Cat. Nb.: LA0041)

Antioxidante NuPAGE (Invitrogen, Cat. Nb.: NP0005)

Membrana de transferencia inmobilon-P de 0.45 μ m (Millipore, Cat. Nb.: IPVH00010)

Papel de cromatografía Wattman (Merck, Cat. Nb.: 3587600)

15 XCell SureLock Mini-Cell and XCell II Blot Module (Invitrogen)

Lector de microplacas VersaMax (Bucher)

Cultivo y extracción de células

20 Las células MC3T3-E1 y C3H10T1/2 fueron cultivadas de rutina en medio alfa mínimo esencial (MEM, Invitrogen, Cat#22561-021) o en DMEM con alta glucosa (Invitrogen, Cat#41965-039), respectivamente. Todos los medios de cultivo fueron complementados con suero de ternera fetal al 10% (FCS; BioConcept Cat#2-01F10-I, lot. Z04459P), L-glutamina 2 mM (Invitrogen Cat#25030-024), 50 IU de penicilina/50 μ g/ml de estreptomycin (Invitrogen Cat#15140-122) y Hepes 10 mM (Invitrogen Cat#15630-056) (medio de cultivo de mantenimiento).

25 Las células fueron sembradas en medio de cultivo de mantenimiento en placas de 6 pozos (3 ml/pozo) y cultivadas hasta la confluencia (con 1.4×10^5 células de MC3T3-1b/pozo, la confluencia fue alcanzada en el día 3; con las células C3H10T1/2 a 1.0×10^5 células/pozo, la confluencia fue alcanzada en el día 3). Después de la caída del suero durante la noche en el medio de cultivo que contenía FBS al 1%, el medio fue reemplazado con uno fresco complementado con FBS al 1%, BMP-6 (R&D Systems, Cat#507-BP) y las sustancias que se iban a probar. Antes de su adición a las células, el BMP-6 y las sustancias que se iban a probar fueron preincubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, tal como había sido descrito para un fosfo-Smad 1/3/5 en C3H10T1/2 (Winkler, EMBO J., 2003, 22(23):6267-76). Cuando se prueban los anticuerpos antisclerostina, fueron preincubados con esclerostina durante la noche a 4°C, antes de ser incubados con BMP-6 0.2 nM durante 1 hora a temperatura ambiente y ser finalmente agregados a las células confluentes. Después del tiempo de tratamiento adecuado, las células fueron lavadas con 2 ml de PBS enfriado con hielo. Se agregaron entonces 100 μ l/pozo de reactivo de extracción fosfoSafe y coctel inhibidor de proteasa diluido 1:200 a las células las cuales fueron incubadas entonces sobre hielo durante 5 minutos. Las células fueron raspadas de los pozos y transferidas a un tubo de microcentrifuga. El extracto celular fue mantenido en hielo durante 15 minutos, interrumpido por una etapa de vórtex cada 5 minutos. Después de esto, el extracto celular fue centrifugado durante 5 minutos a 16.000 g y 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue transferido a un tubo de microcentrifuga nuevo para determinación de proteína.

40 La concentración de proteína en el lisado celular fue determinado utilizando el kit de ensayo de proteína BCA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó BSA como estándar. Para la desnaturalización, el lisado celular fue diluido con regulador Laemmli 1:2 (Bio-Rad, Cat#161-0737, que contienen β -mercaptoetanol (1:20, Merck, Cat#1.12006) agregado fresco) y hervido durante 5 minutos a 95°C. Después del enfriamiento, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta uso posterior.

Inmunoprecipitación Western

45 El anticuerpo Smad (H-465) (Santa Cruz, Cat.Nb.; sc-7153) es una IgG policlonal de conejo, elevada contra aminoácidos 1-465 que representan el Smad1 de longitud completa de origen humano. Debería reconocer Smad1,

Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8 de origen humano, de rata y ratón. El anticuerpo fosfo-Smad1 (Ser463/465)/Smad5 (Ser463/465)/Smad8 (Ser426/428) (Cell Signalling, Cat#9511) es una IgG policlonal de conejo, elevada contra un fosfopéptido sintético correspondiente a residuos que circundan la Ser463/465 de mad5 humano. Debe detectar niveles endógenos de Smad1 solamente cuando son fosforilados de manera dual en la serina 463 y serina 465, así como Smad5 y Smad8 solamente cuando son fosforilados en los sitios equivalentes de origen humano, de ratón, de rata, de mink y de xenopus. El anticuerpo no tiene reacción cruzada con otras proteínas relacionadas con Smad.

El sistema XCell SureLock Mini Cell (Invitrogen) fue preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de proteína (2 µg para un Smad, 5 µg para un análisis de fosfo-Smad Western) fueron cargados en un volumen final igual sobre el gel tris-acetato NuPAGE Novex al 7% en 1 x regulador de desarrollo. Un estándar preteñido SeeBlue Plus2 (10 µl, 1:10; Invitrogen, Cat# LC5925) y un estándar de proteína MagicMark XP Western (10 µl, 1:100; Invitrogen, Cat# LC5602) fueron utilizados como marcadores del peso molecular. El gel fue desarrollado durante 75 minutos con voltaje constante (150V).

Los lechos de siembra y los papeles de filtro fueron sumergidos en 700 ml de regulador de transferencia NuPAGE 1x. Una membrana de transferencia de PVDF fue sumergida primero durante 30 segundos en metanol y luego transferida a un regulador de transferencia 1x NuPAGE (Invitrogen, Cat#NP0006, regulador de transferencia: Metanol 10:1 recién preparado). Las placas del casete del gel fueron separadas con un cuchillo para gel, un papel de filtro presumergido fue colocado sobre la parte superior del gel y se retiraron cuidadosamente las burbujas de aire atrapadas. La placa fue invertida sobre una envoltura Saran y después de la remoción de la placa, la membrana de transferencia presumergida fue colocada sobre el gel y se eliminó cualquier burbuja de aire presente. Un segundo papel de filtro presumergido fue colocado sobre la parte superior y se retiró cualquier burbuja. Dos lechos de siembra sumergidos fueron colocados en el núcleo del cátodo del Cell II Blot Module. El sándwich gel/membrana fue levantado cuidadosamente y colocado sobre los lechos de siembra (con el gel lo más cercano posible al núcleo del cátodo). Finalmente, 3 lechos de siembra presumergidos fueron colocados sobre el ensamblaje de la membrana y el núcleo del ánodo fue agregado sobre la parte superior. El módulo de siembra fue deslizado dentro de los rieles de guía de la cámara de regulador inferior y la unión fue asegurada en posición de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El módulo de siembra fue llenado con regulador de transferencia 1x NuPAGE hasta que se cubrió el ensamblaje gel/membrana. La otra cámara de regulador externa fue llenada con 650 ml de agua desionizada y la transferencia de proteína a la membrana PVDF fue llevada a cabo con voltaje constante (30 V) durante 2 horas.

Después de la siembra, la membrana fue lavada primero durante 10 minutos en Tween 20 al 0.05% en PBS y luego bloqueada con agitación suave durante 1 hora en 25ml de regulador de bloqueo SuperBlock T20 a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (fosfo-Smad 1/5/8 o Smad (H-465)) fue agregado a la membrana en una dilución 1:1000 en regulador de bloqueo SuperBlock T20 (Pierce, Cat#37516) y la membrana fue incubada durante la noche a 4°C bajo agitación. La membrana fue luego lavada 3 veces durante 10 minutos con Tween 20 (Fluka, Cat#93773) al 0.05% en PBS antes de ser incubado con el anticuerpo secundario conjugado con RP (1:1000 en regulador de bloqueo SuperBlock T20) durante 60 minutos a temperatura ambiente bajo agitación. Se llevaron a cabo al menos 3 etapas de lavado de 10 minutos cada una antes de que la membrana fuera incubada durante 5 minutos con la solución de trabajo de sustrato SuperSignal West Femto (Pierce, Cat#34095). Finalmente, la membrana fue colocada en una bolsa plástica y se sometió a estudio de imágenes con Fluor-S Multimager (Bio-Rad) and Camera. Se determinó un tiempo de exposición óptimo de 1 a 2 minutos por comparación de imágenes tomadas desde 30 segundos hasta 5 minutos.

Análisis de datos

Las actividades de quimioluminiscencia fueron medidas utilizando Quantity One (Bio-Rad) y los valores EC₅₀ fueron calculados utilizando el software XLFit4. Cada señal de fosfo-Smad fue normalizada por su correspondiente señal total de Smad.

ELISA de LRP6 / Esclerostina

Placas no tratadas de microtitulación de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µl/pozo de LRP6/Fc (1 µg/ml, R&D Systems, Cat#1505-LR) diluido en PBS. Como control para enlazamiento no específico (NSB), algunos pozos fueron llenados con 100 µl/pozo de PBS. Las placas fueron recubiertas con película plástica e incubadas durante la noche a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, las placas fueron lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 (Fluka, Cat#93773) al 0.05% en PBS y los pozos fueron bloqueados durante 1 hora a 37°C agregando 300 µl/pozo de regulador de bloqueo SuperBlock (Pierce, Cat#37535) en TBS. Después de la incubación, la solución de bloqueo fue retirada y se agregaron 100 µl/pozo de esclerostina (derivada de E.coli, Novartis; 1 – 1000 ng/ml,) diluida en BSA al 1% en PBS. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Después de esto, se agregaron 100 µl/ pozo de anticuerpo anti-esclerostina (1µg/ml) diluido en BSA al 1% en PBS y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Finalmente, se agregaron 100 µl/pozo de IgG Ab anticabra conjugado con ALP (1:5000; Sigma Cat#A-7888) diluido en BSA al 1% (Sigma Cat.

Nb.:A-7888) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y las placas fueron lavadas entonces 3 veces con 200 μ l/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Para determinar la ALP, se agregaron 100 μ l/pozo de sustrato ALP (Sigma, Cat#S0942) en solución (1 tableta por 5ml de regulador de sustrato de dietanolamina 1x; Pierce, Cat#34064) a las placas durante 90 minutos y se midió la densidad óptica a 405 nm.

5 Sobreexpresión de LRP4 en células HEK293

Las células HEK293 (ATCC Cat#CRL-1573) fueron cultivadas de rutina en DMEM/F12 (Invitrogen Cat#21331-020) complementado con FCS al 10% (BioConcept Cat#2-01F10-I, lote Z04459P), L-glutamina 2 mM (Invitrogen Cat#25030-024), 100 IU de penicilina/100 μ g/ml de estreptomycin (Invitrogen Cat#15140-122) y HEPES 10 mM (Invitrogen Cat#15630-056). Las células Hek293 fueron sembradas a 5×10^4 células/pozo en poli-D-lisina en formato de placa de 48 pozos y se incubó durante 24 horas antes de llevar a cabo la transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen Cat#11668-019). Para cada pozo que se iba a transfectar, se agregaron las siguientes cantidades de plásmidos hasta un volumen final de 25 μ l de OptiMEM[®]I (Gibco, Cat#31985-047) y se mezclaron suavemente: para pozos de control (pmaxGFP, 62.5 ng, pcDNA3+, 125 ng; SuperTopFlash (STF) 62.5 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 0.75 ng) y para pozos de tratamiento con Wnt1 (pmaxGFP, 62.5 ng, pcDNA-wnt1, 62.5 ng; pcDNA3+, 62.5 ng; Super-TopFlash (STF) 62.5 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 0.75 ng) y para pozos de tratamiento de LRP4-Wnt1 (pcDNA3+-LRP4, 62.5 ng, pcDNA3+-wnt1, 62.5 ng; pcDNA3+, 62.5 ng; SuperTopFlash (STF) 62.5 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 0.75 ng). En un segundo tubo, se diluyeron 0.8 μ l de Lipofectamina 2000 hasta un volumen final de 25 ml de OptiMEM[®]I y se incubó a temperatura ambiente a durante 5 minutos. El contenido de los dos tubos fue mezclado entonces agregando el contenido en el tubo de lípido al tubo de ADN y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo ADN-lípido. El complejo ADN-lípido (50 μ l) fue agregado entonces homogéneamente a los pozos e incubado a 37°C en CO₂ al 5% durante 5 horas. Al final de la incubación de 5 horas, las células estaban listas para un tratamiento de 20 horas con reactivos de prueba tales como SOST, DKK1 (R&D Cat#1096- DK), anticuerpos, etc. El ensayo con luciferasa fue llevado a cabo como se describe bajo "Ensayo Wnt" agregando alternativamente 150 μ l de regulador de lisis pasivo.

Sobreexpresión de LRP4 en células C28A2

Las células C28a2 (de Mary Goldring, Harvard Institutes of Medicine, Boston, MA, US) fueron cultivadas en el mismo medio que las HEK293 (véase arriba) excepto que no estaba presente el HEPES y se agregó un suplemento de aminoácidos no esenciales (Gibco Cat#11140). Las células C28a2 fueron sembradas a 1×10^5 células /pozo en un formato de placa de 24 pozos en un medio de cultivo libre de antibióticos e incubadas durante la noche antes de llevar a cabo la transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen Cat#11668-019). Para cada pozo que se iba a transfectar, se agregó la siguiente cantidad de plásmidos (600 ng/pozo total) a un volumen final de 50 μ l de OptiMEM[®]I (Gibco, Cat#31985-047) y se mezcló suavemente: para pozos de control (SuperTopFlash (STF) 100 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 2 ng y pcADN3+, 500 ng para compensar) y para tratamiento de pozos con Wnt1 (plásmido de pcADN-wnt1, 100 ng; plásmido de LRP5, 100 ng; SuperTopFlash (STF) 100 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 2 ng y pcADN3+, 300 ng) y para pozos de tratamiento con LRP4-Wnt1 (plásmido de pcADN-wnt1, 100 ng; plásmido de LRP5, 100 ng; plásmido de LRP4, 100 ng; SuperTopFlash (STF) 100 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 2 ng y pcADN3+, 200 ng). En un segundo tubo, se diluyeron 1.6 μ l de Lipofectamina 2000 en 48.4 μ l de OptiMEM[®]I y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. El contenido de los dos tubos fue mezclado entonces por la adición del contenido del tubo de lípidos al tubo de ADN y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo ADN-lípido. El complejo ADN-Lípido (100 μ l) fue entonces agregado de manera homogénea a los pozos y se incubó a 37°C. en CO₂ al 5% durante 2 horas. Al final de la incubación de 2 horas, el medio de transfección fue reemplazado por 400 μ l/pozo de medio de cultivo libre de antibióticos y las células fueron incubadas durante 24 horas. Las células fueron tratadas entonces durante 20 horas con reactivos de prueba tales como SOST, o DKK1 (R&D Cat#1096-DK). El ensayo de luciferasa se llevó a cabo como se describe bajo "ensayo Wnt".

Anulación de LRP4 en células HEK293

Las células Hek293 Wnt1/STF/Renilla (un clon estable obtenido a partir de la transfección estable de células de Hek293 (ATCC Cat#CRL-1573)) con el plásmido de expresión Wnt1, el plásmido informador SuperTopFlash, y el plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40) fueron cultivados de manera rutinaria en DMEM 4500 g/L de glucosa (Invitrogen Cat#41965-035) suplementado con FCS al 10% (Amimed Cat#2-0F100-I), L-glutamina 2 mM (Invitrogen Cat#25030-081), 100 IU/ml de penicilina/100 μ g/ml de estreptomycin (Gibco Cat#15140-163), 6 μ g/ml de puromicina (Invitrogen Cat#ant-pr-1), 150 μ g/ml de zeocina (Invitrogen Cat#45-0430) y 150 μ g/ml de higromicina (Invitrogen Cat#10687-010). Los antibióticos de la selección fueron dejados durante los experimentos de anulación. Las células fueron sembradas a 0.6×10^5 células/pozo en un formato de placas de 24 pozos de poli-D-lisina y se dejaron unir durante la noche antes de llevar a cabo la transfección de siARN de LRP4 con HiPerFect (Qiagen Cat#301707). Las secuencias sentido y antisentido del ARNsi de LRP4 usada son como siguen: LRP4a: TAAATTATCATAAAGTCCTAA / AGGACTTTATGATAATTTATT; (SEQ ID NOS:160/161) LRP4b: ATAGTGTTAAATAACTCCAG / GGAGTTATTTAACCCTATTT; (SEQ ID NOS:162/163) LRP4c:

TAAATTCTCGTGATGTGCCAT / GGCACATCACGAGAATTTATT; (SEQ ID NOS:164/165) LRP4d:
 TTTCTTATAGCACAGCTGGTT / CCAGCTGTGCTATAAGAAATT; (SEQ ID NOS:166/167) LRP4e:
 TAGACCTTTCCATCCACGCTG / GCGTGGATGGAAAGGTCTATT; (SEQ 10 NOS:168/169). Para cada pozo que se
 iba a transfectar, se prepararon dos tubos eppendorf: el primero contenía 0.2 µl de una solución de reserva 20 nM
 5 de uno de los ARNsi de LRP4 o 0.1 µl de una solución de reserva 20 nM de dos ARNsi LRP4 (la concentración final
 de ARNsi/pozo es 6.6 nM) y 50 µl de Optimem y el segundo, 3 µl de HiPerFect y 47 µl de Optimem. El contenido del
 segundo tubo fue agregado al primero, se sometió rápidamente a vórtex y se dejó durante 10 minutos a temperatura
 ambiente. Se agregaron 100 µl de esta mezcla entonces al pozo respectivo, y las células fueron incubadas a 37°C
 10 bajo CO₂ al 5% durante 30 horas. Después de esto, la mezcla de transfección fue retirada y se reemplazó por medio
 de cultivo fresco libre de antibiótico (450 µl/pozo) y se dejó incubar por otras 24 horas. Antes del tratamiento con
 SOST o DKK1, se retiró el medio, se reemplazó por medio de cultivo fresco libre de antibióticos que contenía una
 dilución apropiada de SOST o DKK1 (R&D Cat#1096-DK) y las células fueron incubadas durante 20 horas a 37°C
 bajo CO₂ al 5%. La determinación de luciferasa se lleva a cabo entonces como se describe bajo "ensayo de Wnt".

Modelos animales

15 Ratones OF1/IC hembra de 18 meses de edad (n=16/grupo, Charles River, Francia) recibieron la administración dos
 veces a la semana por vía intravenosa del anticuerpo antiesclerostina ANTICUERPO A (25 mg/kg, h/mlgG2a)
 (MOR05813) o de anticuerpo de control (anti-PC-h/mlgG2a). Los grupos de control recibieron diariamente por vía
 subcutánea 100 microg/kg de PTH (1-34) o vehículo PBS. El tratamiento duró 2.5 semanas para todos los animales.
 La mitad de los animales (n = 8 / grupo) fue sacrificado en ese punto del tiempo para análisis histomorfométrico. El
 20 tratamiento continuó para el resto de los animales (n= 8 / grupo) hasta 5 semanas.

Se midió la masa y geometría del hueso de la tibia de los animales al inicio del tratamiento por tomografía
 computarizada cuantitativa periférica (pQCT) y micro tomografía computarizada (microCT). Los animales fueron
 distribuidos homogéneamente de acuerdo con el peso corporal y la densidad mineral total del hueso de la tibia fue
 medida tal como se midió por pQCT en grupos. Los cambios en densidad mineral, masa y geometría del hueso
 25 fueron evaluados después de 2.5 y 5 semanas de tratamiento. El peso corporal fue monitoreado semanalmente. Los
 animales fueron sacrificados después de 2.5 semanas de tratamiento y se les administraron dos marcadores de
 fluorocromo para marcar la mineralización ósea 10 y 3 días antes de la necropsia. Se tomó sangre en la necropsia.
 Las mediciones de absorciometría por energía dual de rayos x (DEXA) fueron llevados a cabo en la necropsia sobre
 la tibia, fémur y vértebras lumbares seccionadas. Los huesos fueron fijados, deshidratados y embebidos para el
 30 seccionamiento por micrótopo y análisis histomorfométrico de la dinámica de formación de hueso.

Protocolo de tratamiento

Anticuerpo de control: anti-PC-h/mlgG2a,

concentración: 2.5 mg/ml, volumen de aplicación : 10ml/kg

Vehículo: Citrato 50 mM, NaCl 140 mM

35 Anticuerpo antiesclerostina: anti-SOST-MOR05813, h/mlgG2a,

2.45 mg/ml, volumen de aplicación: 10 ml/kg

Vehículo: Citrato 50 mM, NaCl 140 mM

hPTH (1-34) (Bachem, Bubendorf, Suiza) 100 µg/kg

vehículo: PBS+BSA 0.1 %

40 GRUPOS DE TRATAMIENTO:

1 control de isotipo iv. = anti-PC-mlgG2a

2 anti-SOST-MOR05813 iv.

3 control sc de vehículo = PBS+BSA 0.1%

4 hPTH (1-34) sc.

45 Condiciones de mantenimiento

Los animales fueron alojados en grupos de cuatro a cinco animales a 25°C con un ciclo de luz oscuridad de 12:12 horas. Fueron alimentados con una dieta estándar de laboratorio que contenía 0.8% de fósforo y 0.75% de calcio (NAFAG 3893.0.25, Kliba, Basel, Suiza). Se proveyeron alimento y agua ad libitum.

Establecimiento del bienestar animal

- 5 La experimentación animal fue llevada a cabo de acuerdo con las regulaciones efectivas en el Cantón de Ciudad de Basilea, Suiza.

Métodos

Tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT)

- 10 Los animales fueron colocados en una posición lateral bajo narcosis por inhalación (Isoflurano, 2.5%). La pierna izquierda fue estirada y fijada en esta posición.

15 La masa, densidad y geometría del hueso en sección transversal fue monitoreado en la metáfisis de la tibia proximal a nivel de la cabeza de la fibula media y 1.8 mm distal al extremo proximal de la tibia tal como se detecta en el barrido de exploración utilizando un Stratec-Norland XCT-2000 acoplado con un tubo de rayos X Oxford 50 AM y un colimador de 0.5 mm de diámetro. Los siguientes parámetros fueron escogidos para las mediciones: tamaño de voxel: 0.1 x 0.1 x 0.5 mm; velocidad de barrido: vista de exploración 10 mm/s; barrido final 3 mm/s, un bloque, modo 1 de contorno, modo 2 de desprendimiento; umbral cortical: 610 mg/cm³, umbral interno: 610 mg/cm³.

Microtomografía computarizada (microCT)

Los animales fueron colocados en una posición lateral bajo narcosis por inhalación (Isoflurano, 2.5%). La pierna izquierda fue estirada y fijada en esta posición.

- 20 La estructura del hueso esponjoso fue evaluada en la metáfisis de la tibia proximal izquierda utilizando un Scanco vivaCT20 (Scanco Medical AG, Suiza). Los vóxeles no isométricos tenían una dimensión de 10.5 x 10.5 x 10.5 µm. A partir de las imágenes en sección transversal, el compartimiento del hueso esponjoso fue delineado a partir del hueso cortical trazando su contorno. En todos los otros cortes, los límites fueron interpolados con base en el trazado para definir el volumen de interés. Se evaluaron 143 cortes dentro del área de la esponjosa secundaria (comenzando por debajo de los bordes inferiores laterales de la placa de crecimiento). Se utilizó un valor de umbral de 370 para la evaluación tridimensional de los parámetros estructurales.

Absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA)

- 30 Las mediciones de DEXA *ex vivo* fueron llevadas a cabo sobre la tibia izquierda, el fémur izquierdo y las vértebras lumbares 1 – 4. Se utilizó etanol (70%) para la simulación del tejido blando. Las mediciones fueron llevadas a cabo utilizando un instrumento regular Hologic QDR-1000 adaptado para mediciones de animales pequeños. Se utilizó un colimador con 0.9 cm de diámetro y un modo de resolución ultra alta (espaciado de línea de 0.0254 cm, resolución de 0.0127 cm).

Marcación con fluorocromo:

- 35 La alizarina (20 mg/kg, subcutánea, complexon de alizarina, Merck, Dietikon, Suiza) fue 10 días antes de la necropsia.

Calceína (30 mg/kg, subcutáneo, Fluka, Buchs, Suiza), 3 días antes de la necropsia.

Histología e histomorfometría

- 40 Después de la disección, el fémur derecho y las vértebras lumbares 5 y 6 fueron colocadas durante 24 horas en un fijador Karnovsky, deshidratados en etanol a 4°C y embebidos en resina (metil metacrilato). Utilizando un micrótopo 2050 Supercut (Reichert Jung, Arnsberg, Alemania), se cortó un conjunto de 5 secciones de micrótopo no consecutivas de 5 µm de espesor en el plano del cuerpo medio frontal para evaluación de la formación ósea basada en marcación con fluorocromo. Las secciones fueron examinadas utilizando un microscopio Leica DM (Leica, Heerbrugg, Suiza) dotado con una cámara (SONY DXC-950P, Tokyo, Japón) y el software Quantimet 600 (Leica, Cambridge, Reino Unido). Se tomó muestra de una sección por animal. Las imágenes microscópicas de los especímenes fueron digitalizadas y evaluadas semiautomáticamente sobre la pantalla. Fueron medidos (X200 de magnificación) el perímetro del hueso, el perímetro del hueso marcado individual y doble, y la anchura intermarcación. Los valores de perímetro mineralizado (por ciento) las ratas de aposición mineral (micrómetros/día) (corregidos para la oblicuidad de la sección en el compartimiento óseo de esponjoso), y fueron calculados los valores de las ratas de formación de hueso diarias (rata de formación de hueso diaria/perímetro de hueso [micrómetros/día]). Todos los parámetros fueron evaluados en la segunda esponjosa de la metafisis del fémur distal

y en una vértebra lumbar. Otro conjunto de sesiones fueron teñidas con fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). La superficie de los osteoclastos por superficie de hueso (%) fue evaluada en la espongiosis secundaria:

Análisis estadístico

- 5 Los resultados se expresan como +/-SEM medio. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando la prueba t de Student (dos colas; desapareados). El tratamiento anticuerpo anti-esclerostina o hPTH (1-34) fue probado en cuanto a la diferencia con respecto al control (anticuerpo de control o PBS), *, $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$.

Determinación de afinidad

Determinación de afinidad de Fab de esclerostina antihumana seleccionada usando resonancia de plasmón en superficie (Biacore).

- 10 Las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} fueron determinadas con diluciones seriadas del respectivo enlazamiento de Fab a esclerostina del antígeno inmovilizada por vía covalente utilizando el instrumento BIAcore 3000 (BIAcore, Uppsala, Suecia). Para el estándar de inmovilización del antígeno covalente se utilizó química de acoplamiento EDC-NHS amina. Las mediciones cinéticas fueron hechas en PBS (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄ pH 7.4) a una rata de flujo de 20 μ l/minuto utilizando un rango de concentración de Fab desde 1.5 - 500 nM. El tiempo de inyección para cada concentración fue 1 minuto, seguido por 3 minutos de fase de disociación. Para la regeneración se utilizó 2 x 5 μ l de glicina 10 mM pH 1.5. Todos los sensoogramas fueron acoplados utilizando el software de evaluación BIA 3.1 (BIAcore).

Análisis de enlazamiento basado en electroquimioluminiscencia (BioVeris) para medición de afinidades de esclerostina que enlaza Fab en lisados.

- 20 Para la medición de la afinidad de los fragmentos de anticuerpo que enlazan esclerostina en lisados de *E. coli* (extractos BEL), se analizó el enlazamiento mediante una BioVeris M-384 SERIES® Workstation (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, Reino Unido).

- 25 El experimento fue llevado a cabo en placas de microtitulación de polipropileno de 96 pozos y PBS suplementado con BSA al 0.5% y Tween 20 al 0.02% como regulador de ensayo. La proteína esclerostina humana biotinilada fue inmovilizada sobre perlas paramagnéticas de estreptavidina M-280 (Dyna) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se agregó por pozo una dilución 1:25 de la solución de reserva de perlas. 100 μ l del extracto de BEL diluido y las perlas fueron incubadas durante la noche a temperatura ambiente sobre un agitador. Para la detección, se utilizó (Fab)'2 antihumana (Dianova) marcada con BV-tag™ de acuerdo con las instrucciones del proveedor (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, Reino Unido).

- 30 Los clones seleccionados aleatoriamente fueron analizados con el método descrito anteriormente. Los clones que dieron los valores más altos fueron escogidos para análisis posterior en la titulación de equilibrio en solución.

Determinación de las afinidades de los Fab a la esclerostina utilizando titulación de equilibrio en solución (SET)

- 35 Para la determinación de KD fueron usadas, las fracciones de monómeros (al menos 90% de contenido de monómero, analizado por SEC analítico; Superdex75, Amersham Pharmacia) de Fab. La determinación de afinidad con base en electroquimioluminiscencia (ECL) en solución y la evaluación de los datos se llevaron a cabo básicamente como se describe por Haenel *et al.*, 2005. Una cantidad constante de Fab (25 pM) fue equilibrada con diferentes concentraciones (diluciones en serie 3ⁿ) de esclerostina humana, de ratón o *Cynomolgus* no marcadas (concentración de partida: 500 pM) en solución. Se agregaron la esclerostina humana biotinilada (0.5 μ g/ml) acoplada con perlas paramagnéticas M-280 estreptavidina, Dynal) y BV-tag™ (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, Reino Unido) de anticuerpo antihumano marcado (Fab)'2 y se incubó durante 30 minutos. Subsecuentemente, la concentración del Fab no enlazado fue cuantificada a través de detección por ECL utilizando el analizador M-SERIES® 384 (BioVeris Europe).

La afinidad de los clones Fab fue identificada por un ensayo BioVeris de selección de afinidad de alto rendimiento basada en ECL. Después de la selección de aciertos se consolidaron 4 subclones mediante el mismo método.

- 45 Ensayo de potencia de inhibición de enlazamiento al receptor utilizando BioVeris TM

- 50 Para el ensayo de potencia de inhibición de enlazamiento con base en BioVeris™ se acopló BMP-2 humano recombinante directamente (química NHS/EDC) a perlas magnéticas de ácido carboxílico M-270 (Dyna) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo fue llevado a cabo en una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pozos (Nunc). Se diluyeron 50 μ l/pozo de Fab purificado en regulador de ensayo (PBS + Tween 20 al 1% (restringido) o Tween 20 al 0.1% (menos restringido) + BSA al 1%) en etapas de dilución 1:3 (concentración de partida: 1000 nM). Se agregaron 50 μ l/pozo de esclerostina humana biotinilada (4 nM) a cada dilución de Fab. Después de la incubación durante 90 minutos agitando a 400 rpm en un Eppendorf Thermomixer a 22°C, se agregaron 25 μ l de las

perlas recubiertas con BMP-2 (2.7E07 perlas x ml) y estreptavidina diluida 1:500 marcada con BV-tag™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante BioVeris Europa) a cada pozo y se incubaron durante 30 minutos (800 rpm, a 22°C). La detección se llevó a cabo utilizando la BioVeris M-384 SERIES® Workstation (BioVeris Europe). Para la determinación del EC₅₀ se utilizó un modelo de ajuste logístico de 4 parámetros (XLfit, IDBS).

5 Producción de Inmunoglobulinas

Conversión en el formato IgG1 humana y formato IgG2a humana/ratón

Con el fin de expresar la IgG de longitud completa, se subclonaron fragmentos de dominio variable de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de vectores de expresión de Fab en vectores pMorph®Ig apropiados: se usaron pMorph®_h_Ig1 y pMorph®2_h/m_Ig2a quimérico humano/ratón. Las enzimas de restricción *EcoRI*, *MfeI*, *BlnI* se utilizaron para subclonar el fragmento del dominio de VH en pMorph®_h_IgG1 o pMorph®2_h/m_IgG2a y *EcoRV*, *BsWI*, *HpaI* para subclonar el fragmento del dominio VL en vectores pMorph®_h_IgK, pMorph®_h_Igλ y pMorph®2_h/m_Igλ respectivamente. Las enzimas de restricción *EcoRI*, *MfeI* y *BlnI* fueron utilizadas para subclonar el fragmento del dominio VH en pMORPH®_h_IgG1: el esqueleto del vector fue generado por digestión de *EcoRI/BlnI* y extracción del fragmento de 6400 bp mientras que el fragmento VH (350 bp) fue producido por digestión con *MfeI* y *BlnI* y purificación subsecuente. El vector y el inserto fueron ligados a través de sobrantes compatibles generados por las digestiones de *EcoRI* y *MfeI*, respectivamente, y a través del sitio *BlnI*. Por lo tanto, los sitios de restricción *EcoRI* y *MfeI* son destruidos.

Las enzimas de restricción *MfeI* y *BlnI* fueron utilizadas para subclonar el fragmento del dominio VH en pMORPH®2_h/m_IgG2a. En esta nueva generación de vectores IgG, por otras modificaciones, el sitio *EcoRI* (el cual permitió solamente la subclonación a través de sobrantes compatibles) fue reemplazado por el sitio *MfeI* permitiendo así la digestión de *MfeI/BlnI* de ambos, vector e inserto.

La subclonación del fragmento del dominio VL en pMORPH®_h_Igk fue llevada a cabo a través de los sitios *EcoRV* y *BsWI*, mientras que la subclonación en pMORPH®_h_Igλ y pMORPH®2_h/m_Igλ fueron hechas utilizando *EcoRV* y *HpaI*.

25 Expresión transiente y purificación de la IgG humana

Las células HEK293 o HKB11 fueron transfectadas con una cantidad equimolar de vectores de expresión de cadena pesada y ligera. Al cabo de los días 4 o 5 postransfección el sobrenadante del cultivo celular fue recolectado. Después de ajustar el pH del sobrenadante a pH 8.0 y filtración estéril, la solución fue sometida a cromatografía de columna estándar de proteína A (Poros 20A, PE Biosystems).

30 Ejemplo 1: Generación de proteínas de esclerostina recombinante humanas y cyno

La codificación de ADNc de longitud completa para el precursor de esclerostina humana (GenBank Acc.No AF326739) con la característica de un péptido de señalización natural (aa 1-213, NPL 005002) fue clonada en el vector de expresión de mamífero pRS5a por inserción en los sitios de restricción *Asp718* y *Xba1*. Se agregó una etiqueta de detección y purificación de proteína (APP = EFRH) al terminal C del gen.

Después de la verificación de la expresión a escala pequeña en ensayos de transfección transientes en placa de 6 pozos, la generación de las reservas de transfección estable fue iniciada por transfección de cuatro reservas (1.0x10E6 células cada uno) por lipofección. 48 horas después de la transfección la selección de los transfectantes fue iniciada mediante la adición del antibiótico Zeocin™ a una concentración de 100 µg/ml. Una vez que todas las cuatro reservas habían reiniciado el crecimiento normal se establecieron los títulos de proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad analítica sobre anti APP HPLC y la reserva de producción más alta – reserva2 – fue seleccionada para la adaptación a un medio libre de suero y escalamiento posterior. Simultáneamente, los ensayos de expresión transiente de escala grande sobre la escala 10-l fueron llevados a cabo también utilizando polietilenimina como transportador del ADN plásmido durante la transfección del sistema biorreactor Wave™ (C20SPS-F, Art.-No. 100.001, Wave Biotech) como sistema de cultivo. Los sobrenadantes del cultivo celular de 12-22 fueron recolectados 7-10 días después de la transfección y se concentraron mediante filtración de flujo cruzado y diafiltración antes de la purificación.

Los SOST humano y cyno fueron purificados por cromatografía de inmutafinidad. En resumen, los lotes de sobrenadantes de cultivo de tejidos 10-20 L fueron concentrados a 1-2 L por filtración cruzada (corte de 10 kDa) y se aplicaron a 2 ml/minuto sobre una columna de Sepharose anti APP de 50 ml preparada por acoplamiento del anti-Ab1-40/APP (6E10-A5) monoclonal exclusivo a Sepharose 4B activada con CNBr de acuerdo con las instrucciones del fabricante (10 mg de anticuerpo por ml resina). Después del lavado de línea base con PBS, el material enlazado fue eluido con glicina 100 mM, el pH 2.7 fue neutralizado y se filtró para esterilidad. La concentración de proteína fue determinada por A280 utilizando factores de absorción computarizados. Las proteínas purificadas fueron caracterizadas finalmente por SDS-PAGE, secuenciamiento en terminal N y LC-MS. Una alícuota de SOST humana

fue biotinilada en PBS durante 1 hora a 37°C utilizando sulfo-NHS-Ic-biotina 1 mM (Uptima; UP54398A). El reactivo en exceso fue retirado entonces por diálisis extensa contra PBS.

SOST humano derivado de *E. coli*

5 SOST aa24-213 (NPL006071, plásmido pXI504) marcado con His₆-PreScission y SOST aa24-213 (NPL006690, plásmido pXI515) fueron producidos por replicación. Se transformaron *E. coli* Tuner (DE3) con cada plásmido.

El lote PSU5257 fue fermentado a una escala de 20 litros (V9405) utilizando medio TB modificado (versión lab 112). Las células fueron inducidas a una OD₆₀₀ de 3.90 con IPTG 1 mM e inducidas durante 3 horas 30 minutos a 37°C. La recolección fue llevada a cabo utilizando una centrifuga de flujo continuo, dando como resultado una pella de células húmeda que pesaba 190 g.

10 El lote PSU11274 fue fermentado en una escala de 20 litros en 16L de medio M9-1 mínimo suplementado con cloruro de amonio marcado con ¹⁵N. Las células fueron inducidas con IPTG 1 mM una vez que se había alcanzado un OD₆₀₀ de 1.5 y se recolectaron a un OD₆₀₀ de 3.3 utilizando una centrifuga de flujo continuo, dando como resultado una pella de células húmeda que pesaba 50 g.

15 Las pellas de células húmedas de la fermentación anterior fueron lisadas en 8 volúmenes de Tris pH 8.0 50 mM (que contenía EDTA, DTT y Benzamidina-HCl cada uno 5 mM) utilizando un emulsificador Avestin C-50 y se centrifugaron durante 30 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante fue descartado y la pella resultante fue resuspendida en 10 volúmenes de regulador de lisis y se centrifugó de nuevo. El proceso fue repetido 3 veces más, después de lo cual el regulador de lisis fue reemplazado con agua Milli-Q, que contenía DTT 5mM. Las pellas fueron lavadas dos veces adicionales bajo estas condiciones. Los cuerpos de inclusión fueron disueltos en guanidina-HCl 8 M (que contenía DTT 100mM, Tris pH 8 50 Mm y EDTA 5mM) durante 3-4 horas a temperatura ambiente, luego se centrifugaron a 20,000 rpm durante 30 minutos, se filtraron a través de un filtro 0.45 µM. La replicación fue iniciada con una dilución rápida con 88 volúmenes (PSU11274) y 92 volúmenes (PSU5257) de regulador de replicación helado (Tris 0.5M que contenía arginina-HCl 0.9 M, GSH 5 mM y GSSG pH 8 0.5 mM). La solución fue almacenada a 4°C durante 1 semana. En este punto, las dos preparaciones fueron tratadas de forma ligeramente diferente, debido al requerimiento para retirar la etiqueta his₆ del PSU5257 antes de completar la replicación.

20

25

PSU5257

La solución replicada diluida fue diafiltrada contra 1.5 volúmenes de Tris pH 8 50 mM, GSH 5 mM, GSSG 0.5 mM concentrándola dos veces, y luego diluyéndola de nuevo a su volumen original. Esto se llevó a cabo 3 veces, tiempo después del cual se agregó proteasa PreScission y la solución se dejó durante 48 horas a 4°C. Todas las concentraciones/día filtraciones fueron llevadas a cabo utilizando un casete de ultrafiltración Pellicon II con una membrana de corte de 10 KDa. Finalmente la solución fue concentrada 10 veces.

30

PSU11274

La solución replicada diluida fue concentrada 10 veces. Se utilizó LC-MS para confirmar la formación de todos los 4 puentes disulfuro antes de la concentración.

35 Ambas preparaciones fueron entonces dializadas contra 2 x 10 volúmenes de acetato de sodio 50 mM pH 5. Después de la filtración sucesiva a través de lana de vidrio y una membrana de 3.0 µm para eliminar la proteína precipitada, la purificación se llevó a cabo utilizando cromatografía de intercambio de cationes de alto rendimiento en SP-Sepharose™. La columna fue equilibrada con el regulador de diálisis y subsecuentemente eluida con un gradiente de NaCl 0 – 1 M en el mismo regulador a lo largo de 20 volúmenes de columna. La esclerostina eluyó como un pico individual con un hombro ligero, el cual fue descartado. En el caso de PSU5257, se recolectó el pico principal, se concentró sometido a cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna de Superdex 75™, equilibrada con Tris 50 mM, NaCl 150 mM. Con PSU11274, la muestra fue provista directamente después del intercambio de cationes.

40

45 El ADNc de SOST de mono *Cynomolgus* (cySOST) fue amplificado por RT-PCR con cebadores basados en la secuencia de SOST del mono verde africano (GenBank Accession # AF326742). El cebador 5' (ATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCTTGT) (SEQ ID NO: 170) corresponde al terminal N de la secuencia de péptidos de señalización y no está en la proteína final secretada. El cebador 3' (AATCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCTACTAG) (SEQ ID NO: 171) corresponde a una región que es conservada entre humanos, mono verde africano y ratones. El fragmento amplificado fue subclonado en los sitios Bam HI/Eco RI del pcDNA3.1 (+) y se confirmó la secuencia. Este plásmido sirvió adicionalmente como patrón para una amplificación por PCR de SOST de cyno para agregar una etiqueta APP en el terminal C y sitios de recombinación attB para la clonación final en pDESTRS5a de acuerdo con la tecnología Gateway [cySOST-pDESTRS5a].

50

La expresión fue hecha por transfección transiente a gran escala en la escala de 10L en el sistema biorreactor Wave™, recolectada después de 9 días postransfección y purificada como se describe anteriormente.

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos específicos de esclerostina humana a partir de la biblioteca HuCAL GOLD®

Los anticuerpos terapéuticos contra la proteína de esclerostina humana fueron generados por selección de clones que tienen altas afinidades de enlazamiento, utilizando como fuente de las proteínas variables del anticuerpo una biblioteca de despliegue de fago disponible comercialmente, la biblioteca MorphoSys HuCAL GOLD®. La biblioteca HuCAL GOLD® es una biblioteca de Fab (Knappik *et al.*, 2000), en la cual todos los seis CDR están diversificados por mutación apropiada, y la cual emplea la tecnología CysDisplay™ para enlazar el Fab a la superficie del fago (WO01/05950, Löhning *et al.*, 2001).

Selección por criba de anticuerpos específicos para esclerostina a partir de la biblioteca

Para la selección de anticuerpos que reconocen la esclerostina humana se aplicaron varias estrategias de criba.

10 En resumen, los fagos de anticuerpo HuCAL GOLD® fueron divididos en tres reservas que comprendían diferentes genes maestros VH.

Estas reservas fueron sometidas individualmente a

a) una criba en fase sólida donde los antígenos (esclerostina humana y de ratón) fueron recubiertos directamente sobre placas de microtitulación Maxisorp de 96 pozos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) o

15 b) una criba de captura y semisolución en donde el antígeno (esclerostina biotinilada), respectivamente el complejo fago-antígeno fue capturado sobre bandas limpias de N/A o

c) una criba de soluciones con esclerostina biotinilada en donde el complejo fago-antígeno fue capturado por perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads M-280; Dynal) para cada reserva de criba.

- Criba en fase sólida sobre esclerostina

20 Para la primera ronda de criba sobre esclerostina, los pozos de la placa de Maxisorp fueron recubiertos durante la noche con 300 µl (5 µl/ml) de esclerostina humana (producida en células HEK) diluidas en PBS. Después de dos etapas de lavado, con 400 µl de PBS, los pozos fueron incubados con regulador de bloqueo que contenía leche en polvo al 5% diluida en PBS.

25 Antes de las selecciones, los fagos HuCAL GOLD® fueron preadsorbidos en regulador de bloqueo (leche en polvo al 5%/PBS, Tween 20 al 0.5%) durante 2 horas a temperatura ambiente para evitar la selección no específica de los anticuerpos.

30 Después de lavado (2 x 400 µl de PBS) de la placa de Maxisorb recubierta y bloqueada, se agregaron 300 µl de los fagos preadsorbidos a los pozos recubiertos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Esta incubación fue seguida por 10 ciclos de lavado con PBS y PBS/Tween 20 al 0.05% a temperatura ambiente. Los fagos enlazados fueron eluidos agregando 300 µl de DDT 20 mM en Tris/HCl 10 mM pH 8.0 por pozo durante 10 minutos a temperatura ambiente. El eluido fue retirado y se agregó a 15 ml de células de *E. coli* TG1F⁺ cultivadas hasta 1 OD_{600nm} de 0.6 – 0.8. La infección por fago del *E. coli* fue permitida durante 45 minutos a 37°C sin agitación. Después de centrifugación durante 5 minutos a 4120 x g, las pellas bacterianas fueron resuspendidas cada una en 600 µl de medio 2xYT, sembradas sobre placas de agar LB-CG e incubadas O/N a 30°C. Las colonias fueron entonces raspadas de las placas y los fagos fueron rescatados y amplificados.

40 La segunda y tercera rondas de selección fueron llevadas a cabo de manera idéntica a la primera ronda de selección con la única diferencia de que las condiciones de lavado después del enlazamiento del fago fueron más restrictivas. La segunda ronda de selección para algunas condiciones de criba se utilizó esclerostina de ratón como antígeno con el fin de enriquecer los anticuerpos de reacción cruzada de ratón. Para algunas condiciones de criba se recubrió otro lote de esclerostina recombinante humana (producida en *E. coli*).

- Criba por semisolución en esclerostina

Se ejecutaron dos métodos diferentes para esta clase de criba: una criba por semisolución de captura y el procedimiento de criba en semisolución estándar.

45 En detalle, para la criba en semisolución por captura sobre esclerostina biotinilada, se recubrieron 100 µl de antígeno durante 2 horas a temperatura ambiente sobre tiras limpias de NeutrAvidin (N/A) (de Pierce, nivel de activación 100 µl, capacidad de enlazamiento 15 pmol por pozo). Las tiras N/A fueron bloqueadas O/N a 4°C con 200 µl de Chemiblock y se lavaron dos veces con PBS.

La solución de fago bloqueada (Chemiblock/Tween 20 al 0.05%) fue agregada a los pozos N/A bloqueados durante 30 minutos y esta etapa fue repetida durante otros 30 minutos con el fin de retirar los enlazantes NeutrAvidin. Los

fagos prelimpiados fueron transferidos y la esclerostina biotinilada fue inmovilizada sobre tiras limpias de N/A, selladas con una lámina e incubadas O/N a temperatura ambiente con agitación.

Al día siguiente la solución de fago fue retirada de los pozos recubiertos con antígeno y los pozos fueron lavados.

5 Para las criba por semisolución estándar los fagos prelimpiados bloqueados (Chemiblock/Tween 20 al 0.05%), fueron agregados a un nuevo tubo de reacción prebloqueado de 1.5 ml (Chemiblock/Tween 20 al 0.05%) y luego se agregó esclerostina humana biotinilada hasta una concentración final de 100 nM y se incubó O/N a temperatura ambiente con agitación.

10 Al día siguiente la solución fago-antígeno del tubo de reacción de 1.5 ml fue agregada a los nuevos pozos bloqueados de las tiras de NeutrAvidin y se dejó en enlazamiento durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron.

15 Para ambos procedimientos de criba los fagos enlazados fueron eluidos después de lavado agregando 300 μ l de DDT 20 nM en Tris/HCl pH 8.0 10 mM por pozo durante 10 minutos a temperatura ambiente. El eluido fue retirado y agregado a 15 ml de células de *E. coli* TG1 cultivadas hasta un OD_{600 nm} de 0.6 – 0.8. La infección con fago de la *E. coli* fue permitida durante 45 minutos a 37°C sin agitación. Después de la centrifugación durante 5 minutos a 4120 x g, las pellas bacterianas fueron cada una resuspendidas en 600 μ l de medio 2xYT, sembradas sobre placas de agar LB-CG e incubadas O/N a 30°C. Las colonias fueron entonces raspadas de las placas y los fagos fueron rescatados y amplificados.

La segunda y tercera rondas de selección fueron llevadas a cabo de manera idéntica a la primera ronda de selección con la única diferencia de que las condiciones de lavado después del enlazamiento del fago fueron más restrictivas.

20 •Criba en solución sobre esclerostina

25 Para este tipo de criba se lavaron 200 μ l de perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads M-280; Dynal) con PBS y se bloquearon con Chemiblock durante 2 horas a temperatura ambiente. Se bloquearon 500 μ l de fagos con Chemiblock durante 1 hora a temperatura ambiente en rotación. Los fagos bloqueados fueron preabsorbidos dos veces contra 50 μ l de perlas magnéticas de estreptavidina bloqueadas durante 30 minutos. El sobrenadante del fago fue transferido a un nuevo tubo de reacción bloqueado de 2 ml y se agregaron diferentes concentraciones de esclerostina biotinilada humana (véase Tablas 5, 6 y 7) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación. Se agregaron 100 μ l de las perlas magnéticas de estreptavidina bloqueadas a cada reserva de criba y se incubaron durante 10 minutos sobre un rotador. Las perlas fueron recolectadas con un separador de partículas (Dynal MPC-E) durante aproximadamente 2.5 minutos y la solución fue retirada cuidadosamente. Después de los ciclos de lavado (Tabla 2), los fagos enlazados fueron eluidos agregando 300 μ l de DDT 20 mM en Tris/HCl pH 8.0 10 mM por pozo durante 10 minutos a temperatura ambiente. El eluido fue retirado y se agregó a 15 ml de células de *E. coli* TG1 F⁺ cultivadas hasta un OD_{600 nm} de 0.6 – 0.8. La infección por fago de *E. coli* fue permitida durante 45 minutos a 37°C sin agitación. Después de la centrifugación durante 5 minutos a 4120 x g, las pellas bacterianas fueron resuspendidas cada una en 600 μ l de medio 2xYT, sembradas sobre placas de agar LB-CG e incubadas O/N a 30°C. Las colonias fueron entonces raspadas de las placas y los fagos fueron rescatados y amplificados.

La segunda y tercera rondas de selección fueron llevadas a cabo de manera idéntica a la primera ronda con la única diferencia de que las condiciones de lavado después del enlazamiento del fago fueron más restrictivas. En la segunda y tercera ronda de selección para algunas condiciones de criba se redujo la concentración de antígeno.

Subclonación y expresión de fragmentos Fab seleccionados

40 Microexpresión de fragmentos Fab seleccionados

45 Para facilitar la expresión rápida de Fab solubles, los insertos de codificación de Fab de los fagos HuCAL GOLD[®] seleccionados fueron subclonados a través de XbaI y EcoRI a partir del vector de despliegue respectivo en el vector de expresión de *E. coli* pMORPH[®]X9_MH (Rauchenberger *et al.*, 2003). Después de la transformación de los plásmidos de expresión en las células de *E. coli* TG1 F⁺ se seleccionaron clones individuales resistentes al cloranfenicol en los pozos de una placa de microtitulación estéril de 96 pozos prellenada con 100 μ l de medio 2xYT-CG y se cultivaron O/N a 37°C. Se transfirieron 5 μ l de cada cultivo de *E. coli* TG-1 a una placa de microtitulación estéril de 96 pozos prellena con 100 μ l de medio 2xYT suplementado con 34 μ g/ml de cloranfenicol y 0.1 % de glucosa por pozo. Las placas de microtitulación fueron incubadas a 30°C agitando a 400 rpm sobre un agitador de microplacas hasta que los cultivos estuvieron ligeramente turbios (aproximadamente 2-4 horas) con un OD_{600nm} de aproximadamente 0.5. A estas placas de expresión, se agregaron 20 μ l de medio 2xYT suplementado con 34 μ g/ml de cloranfenicol e IPTG 3 mM (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) por pozo (concentración final: IPTG 0.5 mM), las placas de microtitulación fueron selladas con una cinta permeable al gas, y se incubaron durante la noche a 30°C con agitación a 400 rpm.

Generación de lisados de células enteras (extractos BEL): a cada pozo de las placas de expresión, se agregaron 40 µl de regulador BEL y se incubaron durante 1 hora a 22°C sobre un agitador de placas de microtitulación (400 rpm).

Expresión y purificación de anticuerpos HuCAL[®]-Fab en *E.coli*

- 5 La expresión de los fragmentos Fab codificada por pMORPH[®]X9_Fab_MH en células de *E. coli* TG1 F- en escala mayor fue llevada a cabo en cultivos en matraces agitados utilizando 750 ml de medio 2xYT suplementado con 34 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos fueron agitados a 30°C hasta que el OD_{600nm} alcanzó 0.5. La expresión de Fab fue inducida por la adición de IPTG 0.75 mM (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) y cultivó durante 20 horas adicionales a 30°C. Las células fueron recolectadas y perturbadas utilizando lisozima y fragmentos Fab aislados por cromatografía sobre Ni-NTA. Los pesos moleculares aparentes fueron determinados por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con estándares de calibración. Las concentraciones fueron determinadas por espectrofotometría UV (Krebs *et al.*, 2001).

Ejemplo 2: Identificación de anticuerpos HuCAL[®] específicos de esclerostina

Ensayo inmunsorbente enlazado por enzimas (ELISA) para detección de esclerostina que enlaza Fab sobre esclerostina directamente recubierta

- 15 Se recubrieron placas de 384 pozos Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, Estados Unidos) con 20 µl de antígeno (esclerostina humana-producida en células HEK, esclerostina humana producida en células de *E. coli* y esclerostina de ratón) 2.5 µg/ml en PBS, pH 7.4 O/N 4°C.

- 20 Las placas fueron bloqueadas con PBS/ Tween 20 al 0.05% (PBST) que contenía leche en polvo al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos con PBST, se agregaron extracto de BEL, Fab de HuCAL GOLD[®] purificados o Fab de control diluidos en PBS a los pozos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para detectar los anticuerpos primarios, los siguientes anticuerpos secundarios fueron aplicados: fosfatasa alcalina (AP)-fragmento de F(ab')₂ AffiniPure, antihumano de cabra, IgG antiratón (Jackson ImmunoResearch). Para la detección de conjugados de AP se utilizaron sustratos fluorogénicos como AttoPhos (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Entre todas las etapas de incubación, los pozos de la placa de microtitulación fueron lavados con PBST tres veces y cinco veces después de la incubación final con el anticuerpo secundario. La fluorescencia fue medida en un lector de placas TECAN Spectrafluor.

Selección por captura con esclerostina biotinilada

Esta clase de ELISA fue utilizada para seleccionar Fab de HuCAL GOLD[®] después de proceder con las cribas en solución.

- 30 Placas de 384 pozos Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, Estados Unidos) fueron recubiertas con 20 µl de IgG, antihumana de oveja 5 µg/ml específica para el fragmento Fd (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido), diluida en PBS, pH 7.4.

- 35 Después de bloquear con BSA al 3% en TBS, se agregaron Tween 20 al 0.05% durante 2 horas a temperatura ambiente, extractos periplásmicos o Fab purificados de HuCAL GOLD[®] y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas cinco veces con PBST se agregaron 20 µl de esclerostina biotinilada para enlazamiento específico o transferina biotinilada para enlazamiento no específico en los pozos.

- 40 Subsecuentemente la esclerostina del antígeno biotinilado se dejó enlazar a los fragmentos de Fab de HuCAL[®] capturados. Después del lavado se incubó con estreptavidina (Zymex) conjugada con fosfatasa alcalina. Para la detección de AP-estreptavidina se utilizaron sustratos fluorogénicos como AttoPhos (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La emisión de fluorescencia a 535 nm fue registrada con excitación a 430 nm.

Resultados:

- 45 Después de las cribas las reservas de fago enriquecidas fueron subclonadas a partir del vector de la biblioteca pMORPH[®]23 (permitiendo un despliegue del anticuerpo eficiente sobre la superficie del fago) en el vector de expresión pMORPH[®]X9_Fab_MH el cual media en la expresión periplásmica de los Fab solubles. Los clones individuales fueron seleccionados y los Fab solubles fueron expresados a partir de estos clones individuales. En total, se analizaron aproximadamente 4600 clones en selección primaria la cual fue ejecutada por enlazamiento de los Fab directamente a partir de los lisados bacterianos a esclerostina humana y de ratón y movilizadas sobre placas de microtitulación Maxisorp o por captura de los Fab a través del anticuerpo anti Fd en placas de microtitulación Maxisorp seguido por enlazamiento de la esclerostina humana biotinilada. La detección fue llevada a cabo en ELISA después de marcación con un anticuerpo (Fab)'₂ antihumano marcado con fosfatasa alcalina o utilizando estreptavidina fosfatasa alcalina.

Los aciertos obtenidos a partir de la primera selección sobre la esclerostina recombinante con señales de más de 5 veces sobre la señal de fondo fueron analizados posteriormente en cuanto al enlazamiento a HEK y esclerostina de *E. coli* y a esclerostina de ratón bien sea directamente recubierta o en solución utilizando esclerostina biotinilada. Los aciertos que reconocen todos los derivados de esclerostina fueron seleccionados y secuenciados.

5 **Caracterización de los Fab de HuCAL GOLD®**

Determinación de afinidad utilizando Biacore

10 Con el fin de caracterizar adicionalmente los anticuerpos antiesclerostina, se determinó la afinidad a esclerostina humana, de ratón o *Cynomolgus*. La proteína esclerostina recombinante fue inmovilizada sobre un chip CM5 Biacore y los Fab fueron aplicados en la fase móvil en diferentes concentraciones. Para una determinación confiable de las afinidades monovalentes solamente se utilizaron tales lotes de Fab para las mediciones en Biacore que mostraron $\geq 90\%$ de fracción monomérica en una cromatografía de exclusión por tamaño cualitativa.

De las afinidades para la esclerostina humana, de *Cynomolgus* y de ratón fueron determinadas en Biacore. Las afinidades varían desde subnanomolar hasta por encima de 500 nM sobre esclerostina humana, a casi 5000 nM de *Cynomolgus* y a 4500 nM de ratón.

15 **Ejemplo 3:** Identificación de candidatos Fab de esclerostina antihumana que inhiben el enlazamiento de esclerostina a BMP-2 inmovilizado utilizando el dispositivo BioVeris™

20 Todos los Fab generados y purificados fueron probados en una potencia de inhibición de enlazamiento basada en BioVeris para su capacidad de inhibir el enlazamiento de la esclerostina a BMP-2 recombinante humano. Se probaron dos condiciones de restricción diferentes (0.1% versus 1% de Tween 20 en sistema regulado). 9 de 27 Fab fueron capaces de inhibir el enlazamiento de la esclerostina a BMP-2 inmovilizado bajo condiciones de regulación restrictivas.

Ejemplo 4: Reversión de la inhibición de esclerostina de producción de ALP inducida por BMP-2 en células MC3T3

Conversiones de IgG de enlazamientos originales y caracterización de IgG

25 Se convirtieron 21 candidatos en el formato de IgG1 humana subclonando en el vector de expresión pMORPH®_h_Ig y los constructos de cadena ligera correspondientes de las series del vector pMORPH®_h_Ig , respectivamente. La expresión fue llevada a cabo por transfección transiente de células HEK293 o HKB11 y las inmunoglobulinas de longitud completa fueron purificadas a partir del sobrenadante del cultivo celular. La funcionalidad de la IgG1 después de la purificación fue establecida mediante enlazamiento por ELISA a esclerostina humana, de ratón y de *Cynomolgus* inmovilizada.

30 **IgG en Bioensayo primario**

Todas las hIgG purificadas fueron tituladas y probadas en el ensayo ALP. Este ensayo fue confiable con respecto a la inhibición de la esclerostina por BMP-2 pero los candidatos seleccionados no pudieron mostrar inhibición de la esclerostina en todos los experimentos (variación de actividad de ensayo a ensayo, variación de placa a placa, alta varianza con pozos en triplicado). Por lo tanto solo fue posible una clasificación de actividad de la IgG.

35 **Ejemplo 5:** Maduración de afinidad de Fab antiesclerostina seleccionados por intercambio paralelo de casetes LCDR3 y HCDR2

Los resultados de la prueba de las IgG en el ensayo ALP permitió solamente una clasificación. A partir de esta clasificación, se seleccionaron 4 Fab sobre alto riesgo para maduración por afinidad. Todos los candidatos fueron seleccionados optimizados como candidatos probables individuales en L-CDR3 y H-CDR2.

40 Para incrementar la afinidad y la actividad biológica de los cuatro fragmentos de anticuerpos seleccionados, la regiones LCDR3 y LCDR2 fueron optimizadas en paralelo por mutagénesis en casete utilizando mutagénesis dirigida (Virnekas et al., 1994), en donde las regiones marco fueron mantenidas constantes. Antes de la clonación de las bibliotecas de maduración, todos los fragmentos Fab originales fueron transferidos desde el vector de expresión pMORPH®x9_MH al vector de maduración CysDisplay™ pMORPH®25 a través de los sitios de restricción *Xba*I/*Eco*RI. Este vector provee la proteína de fago pIII fusionada en el terminal N a un residuo de cisteína así como una cisteína terminal en C fusionada a la cadena del anticuerpo Fd y permite así un despliegue enlazado por disulfuro de los respectivos fragmentos de Fab sobre la superficie del fago.

50 Para la generación de las bibliotecas de HCDR2 la región HCDR2 de cada Fab original fue escindida y reemplazada por un relleno de 590 bp. Este relleno de ADN facilita la separación de las bandas de vector de digestión sencilla con respecto a aquellas de digestión doble y reduce la señal de fondo para los Fab originales de alta afinidad durante las

cribas de maduración. En una etapa subsecuente, el agente de relleno fue escindido de los plásmidos que codifican Fab de cada clon original y reemplazado por el casete de maduración HCDR2 altamente diversificado.

En paralelo, la región LCDR3 de cinco de los cuatro clones originales fue reemplazada por un casete de maduración diversificado LCDR3 sin clonación intermediaria de un agente de relleno.

- 5 Los tamaños de las bibliotecas de maduración variaron entre 1×10^7 y 4×10^8 clones con un fondo de clonación por debajo del 1%, y el control de calidad por secuenciamiento reveló una buena calidad de cada biblioteca. Solamente la biblioteca LCDR3 del clon original MOR04520 tenía un tamaño bajo ($< 10^6$) y muchos clones incorrectos y por lo tanto no fue incluida en las cribas de maduración.

- 10 Para cada biblioteca de maduración LCDR3 y HCDR2, se prepararon los fagos que despliegan anticuerpos y los títulos del fago fueron determinados por titulación de la mancha.

Estrategias de criba para maduración por afinidad

Los fagos que despliegan anticuerpo a partir de las siguientes bibliotecas de maduración fueron sometidos a cribas y selecciones separadas:

Candidato 1: MOR04518 (L-CDR3 maduración)

- 15 Candidato 1: MOR04518 (H-CDR2 maduración)

Candidato 2: MOR04520 (H-CDR2 maduración)

Candidato 3: MOR04532 (L-CDR3 maduración)

Candidato 3: MOR04532 (H-CDR2 maduración)

Candidato 4: MOR04799 (L-CDR3 maduración)

- 20 Candidato 4: MOR04799 (H-CDR2 maduración)

- 25 Para cada biblioteca candidato se ejecutaron tres diferentes cribas. Para cada estrategia de criba fueron aplicadas diferentes condiciones de restricción. Para incrementar la restricción de la criba y para seleccionar ratas mejoradas, se llevaron a cabo lavado y competición con Fab originales o con esclerostina recombinante soluble. Después de las cribas de maduración, las reservas de fagémidos enriquecidos fueron subclonadas en el vector de expresión pMORPH[®]x9_MH. Aproximadamente se seleccionaron 2900 clones y los Fab se expresaron por inducción con IPTG.

Clasificación de afinidad BioVeris TM y selección de afinidades mejoradas

- 30 Para la identificación de Fab específicos de esclerostina mejorados en afinidad los lisados bacterianos de aproximadamente 2900 clones fueron diluidos y verificados en cuanto al enlazamiento de Fab con esclerostina humana biotilada inmovilizada sobre perlas recubiertas con estreptavidina. El enlazamiento fue analizado con una BioVeris Workstation. Estos clones que dan las señales más altas indican una afinidad mejorada y fueron por lo tanto escogidos para análisis posterior por titulación en equilibrio en solución. Para este propósito, se seleccionaron 176 clones individuales y las afinidades preliminares fueron determinadas a través de una titulación de equilibrio en solución de 4 puntos (SET) en BioVeris. A partir de estos datos, se seleccionaron 24 clones que mostraban las mejores afinidades. Estos Fab fueron purificados en la escala mg.

- 35 Las afinidades finales fueron determinadas utilizando una medición SET de 8 puntos y esclerostina humana, de ratón y cynomolgus.

Fab optimizados en bioensayo primario

- 40 Los Fab optimizados fueron probados en el ensayo de ALP celular. La mayor parte de ellos fueron inactivos; y se observó una reversión variable de la inhibición de esclerostina con algunos Fab. Por lo tanto, una selección de clones fue convertida en formato IgG2a humano/ratón y se probó de la misma manera. Pero estos clones en el formato IgG2a humano/ratón no pudieron reversar completamente la inhibición de esclerostina y no se pudo alcanzar el criterio de EC_{50} deseado (< 10 nM). El candidato mejor madurado MOR05177 (VL madurado a partir del MOR04518 original) mostró un Fab de 50 nM o a 140 – 467 nM de IgG2a humana/de ratón con restauración de 75 – 85% de la señal ALP.

- 45 **Ejemplo 6:** Identificación de anticuerpos antiesclerostina a partir de Fab e IgG originales y optimizados en un nuevo bioensayo primario

Con base en nuevas publicaciones (Wu et al., JBC 2005, He et al., JBC 2005, Bezooyen et al., ASBMR 2005, Winkler et al., JBC 2005), que muestra que la esclerostina tiene impacto sobre la señalización de Wnt directamente o indirectamente, se desarrolla un nuevo bioensayo funcional.

5 Este ensayo se basa sobre la capacidad de la esclerostina para inhibir la activación de STF mediada por Wnt1 en células HEK293.

En este ensayo, todos los Fab identificados en la selección inicial más todos los Fab identificados en la maduración por afinidad fueron probados. Se hace obvio que la afinidad incrementada de los Fab madurados se refleja en la potencia y eficacia incrementadas en el ensayo de wnt-1.

10 Al probar todos los Fab originales se identificaron dos anticuerpos adicionales como patrones prometedores para una maduración de afinidad adicional. La figura 1 muestra la actividad de MOR05813_IgG2lambda, uno de los anticuerpos más potentes identificados en el ensayo de wnt-1.

Ejemplo 7: Caracterización de Fab originales y madurados por afinidad en otros bioensayos

Actividad de Fab originales y madurados por afinidad en el ensayo de mineralización

15 El ensayo de mineralización se basa en la capacidad de las células MC3T3 para formar una matriz mineralizada, indicando su capacidad para sufrir diferenciación osteogénica. Se midió una fuerte mineralización (>1 µg de calcio depositado por pozo (formato de 96 pozos)) después de 14 días en toda las concentraciones de BMP-2 probadas. La adición de concentraciones incrementadas de esclerostina indujo una inhibición dependiente de la dosis de la mineralización inducida por BMP-2 (2.1 nM) (IC₅₀: 120 nM) (datos no mostrados).

20 La figura 2 muestra un ejemplo de mineralización en presencia de MOR05813_Fab. El anticuerpo podría restaurar la mineralización inducida por BMP-2 hasta un máximo de 80% de la respuesta inicial, en donde un Fab antilisozima usado como control negativo no tuvo efecto.

Actividad de Fab original y madurado por afinidad en ELISA de LRP6 / esclerostina

25 La ELISA de LRP6 / esclerostina se basa en la capacidad de la esclerostina para enlazarse a LRP6. Para caracterizar adicionalmente los Fab producidos, se probó una selección de Fab e IgG en este ensayo. En la presencia de un anticuerpo antesclerostina de R&D (1000 ng/ml≈7 nM), el enlazamiento de esclerostina (0.9 nM) a LRP6 fue inhibido en un 68% en comparación con el control (datos no mostrados).

La MOR05813_IgG2 lambda inhibió el enlazamiento de esclerostina a LRP6 hasta un 90% a 90 nM, mientras que una IgG antilisozima utilizada como control negativo no tuvo efecto sobre el enlazamiento de la esclerostina a LRP6 (figura 3).

30 Actividad de Fab originales y madurados por afinidad en el ensayo fosfo-Smad1

El ensayo fosfo-Smad-1 (Western) se basa en la capacidad de BMP-6 para inducir la fosforilación de Smad1 al cabo de 15 minutos en células MC3T3. La MOR05318_IgG2 lambda inhibió la acción de la esclerostina sobre fosforilación de Smad1 inducida por BMP-6 con un EC₅₀ de 115 nM y restauró la fosforilación de Smad1 hasta un máximo de 66% de la fosforilación inducida por BMP-6. El control negativo de IgG antilisozima (IgG C) no tuvo efecto (figura 4).

35 **Ejemplo 8:** Efecto de LRP4, un novedoso asociado de interacción con SOST, sobre la actividad del anticuerpo anti SOST

40 Con la excepción del ARNsi LRP4 e, la anulación del ARNm LRP4 no afecta la actividad de STF en ausencia de SOST. Sin embargo, reduce la habilidad del SOST para inhibir la actividad de STF, entre 10 y 30%. Esto fue cierto para todos los cinco ARNsi probados individualmente (figura 5A) o en diferentes combinaciones (datos no mostrados). Por sobreexpresión el LRP4 disminuyó el IC₅₀ de SOST en 5 y 16 veces en el ensayo superinstantáneo de HEK y c28a2, respectivamente (figura 5B y C). Este efecto fue específico en el sentido de que el LRP4 sobreexpresado no tenía efecto sobre la anulación del IC₅₀ de DKK1 del LRP4 (ARNsi que disminuye la acción inhibidora de SOST en STF inducido por Wnt-1, mientras que no disminuye la acción inhibidora del DKK1 (figura 5E). A su vez, el LRP4 disminuye la acción del anticuerpo anti SOST incrementando el EC₅₀ del MOR05813_IgG2a desde 17.2 nM hasta 30 nM (figura 5E). Estos datos sugieren que el LRP4 es un facilitador de la acción del SOST.

Ejemplo 9: Nueva maduración

50 Para incrementar la afinidad y la actividad biológica de dos fragmentos de anticuerpos recién seleccionados con base en los resultados obtenidos a partir de los bioensayos, las regiones LCDR3 y HCDR2 fueron optimizadas en paralelo por mutagénesis en casete utilizando mutagénesis dirigida (Virnekas et al., 1994), mediante lo cual las regiones marco fueron mantenidas constantes. Antes de clonar las bibliotecas de maduración, todos los fragmentos

5 de Fab originales fueron transferidos del vector de expresión pMORPH[®]X9_MH en el vector de maduración CysDisplay[™] pMORPH[®]25 a través de los sitios de restricción XbaI/EcoRI. Este vector provee la proteína de fago PIII fusionada en el terminal N a un residuo de cisteína así como una cisteína terminal C fusionada a una cadena del anticuerpo Fd y permite así el despliegue enlazado por disulfuro de los respectivos fragmentos de Fab sobre la superficie del fago.

10 Para la generación de las bibliotecas HCDR2 la región HCDR2 de cada Fab original fue escindida y reemplazada por un agente de relleno de 590 bp. Este agente de relleno de ADN facilita la separación de las bandas de vectores de digestión sencilla con respecto a las de digestión doble y reduce la señal de fondo de los Fab originales de alta afinidad durante las cribas de maduración. En una etapa subsecuente, el agente de relleno fue escindido a partir de los plásmidos que codifican Fab de cada clon original y reemplazado por el casete de maduración HCDR2 altamente diversificado.

En paralelo, la región LCDR3 de cinco de los cuatro clones originales fue reemplazada por un casete de maduración diversificado LCDR3 sin clonación intermedia de un agente de relleno.

15 Los tamaños de las bibliotecas de maduración variaron entre 2×10^7 y 2×10^8 clones con una señal de fondo de clonación por debajo del 1%, y el control de calidad por secuenciamiento reveló una buena calidad de cada biblioteca. Para cada biblioteca de maduración de LCDR3 y HCDR2, los fagos que despliegan el anticuerpo fueron preparados y los títulos de los fagos fueron determinados por titulación de mancha.

Estrategias de criba para maduración por afinidad adicional

20 Los fagos que despliegan anticuerpos a partir de las siguientes bibliotecas de maduración fueron sometidos a cribas y selecciones separadas:

Candidato 1: MOR04525 (L-CDR3 maduración)

Candidato 1: MOR04525 (H-CDR2 maduración)

Candidato 2: MOR04529 (L-CDR3 maduración)

Candidato 2: MOR04529 (H-CDR2 maduración)

25 Para cada candidato o biblioteca de reserva se llevaron a cabo tres cribas diferentes, aplicando para cada estrategia de criba diferentes condiciones de restricción. Para incrementar la restricción de criba y para seleccionar las ratas mejoradas, se llevó a cabo la competición con esclerostina recombinante soluble durante periodos de incubación y lavado prolongados.

30 Después de las cribas las reservas de fagémidos enriquecidas fueron subclonadas en el vector de expresión pMORPH[®]X9_MH. Se seleccionaron aproximadamente 1600 clones individuales y los Fab fueron expresados por inducción con IPTG.

35 El criterio de afinidad de < 100 pM para esclerostina humana fue satisfecho por los derivados de ambos Fab originales. La reactividad cruzada obligada con esclerostina de cynomolgus y con esclerostina de ratón de < 500 pM fue satisfecha con los derivados de ambos Fab originales. El MOR04525 produjo más clones que tienen afinidades más altas con las tres especies.

Ejemplo 10: Caracterización de anticuerpos anti-esclerostina en estudios *in vivo*

40 Ratones OF1/IC hembra de 18 meses de edad (n=16/grupo, Charles River, Francia) recibieron administración dos veces a la semana por vía intravenosa de anticuerpo anti-esclerostina MOR05813 (24.5 mg/kg, mIgG2a) o anticuerpo de control de isotipo (anti-PC-mIgG2a). Los grupos de control recibieron diariamente por vía subcutánea 100 microg/kg de PTH (1-34) o vehículo (PBS + BSA al 0.1%). El tratamiento duró 2.5 semanas para todos los animales. La mitad de los animales (n=8/grupo) fue sacrificada en ese momento para análisis histomorfométrico. Estos animales habían recibido marcadores de fluorocromo 10 y 3 días antes de la necropsia para evaluación histomorfométrica de la dinámica de formación de huesos. El tratamiento continuo para el resto de los animales (n=8/grupo) hasta 5 semanas.

45 Los animales fueron monitoreados en cuanto a los cambios en masa, densidad y geometría ósea. La tomografía computarizada cuantitativa periférica *in vivo* [pQCT] demostró que el MOR05177 es un anabólico óseo fuerte en la tibia proximal de ratones mayores que incrementan el contenido mineral de los huesos (figura 6) y la densidad (figura 7). El efecto anabólico óseo ocurre tanto en el compartimiento óseo cortical (figura 8) como esponjoso (figura 9). Estos datos sugieren que el efecto inhibitor observado de la MOR05813 sobre la acción de la esclerostina en el ensayo de informador de señalización de Wnt en células no osteoblásticas se traduce en inducción de respuestas de

50

formación de hueso debido a la inhibición de la esclerostina *in vivo*. La magnitud de la respuesta anabólica ósea en ratones es comparable con el anabolismo óseo inducido por una alta dosis de hPTH (1-34).

El análisis por microCT demuestra incrementos en el volumen óseo trabecular (figura 9) relacionado principalmente con un engrosamiento de las estructuras ósea trabeculares consistentes con el anabolismo óseo (figura 10).

5 La densidad mineral ósea se incrementó adicionalmente en animales, los cuales fueron tratados hasta por 5 semanas (figura 11). La densidad mineral ósea evaluada *ex vivo* por DEXA se incrementó en el esqueleto apendicular (tibia, fémur), y axial (vértebras lumbares) (figura 12 – 14). El efecto fue comparable con el medido en el grupo de control positivo tratado diariamente con 100 micro/kg de hPTH (1 – 34).

10 Los análisis basados en el marcador de fluorocromo histomorfométricos de la dinámica de formación ósea demostraron que la ganancia en masa ósea fue debida a un incremento sustancial en las ratas de formación de hueso en el esqueleto apendicular (figura 15) y axial (figura 18). Los efectos fueron comparables con los de una alta dosis de PTH (1 – 34). Los incrementos en las ratas de formación óseas estuvieron relacionados ambos con incrementos en las ratas de aposición mineral (figura 16) y en la superficie de mineralización (figura 17). La resorción ósea no se incremento por el tratamiento tal como lo demostró la medición de la superficie de los osteoclastos (figura 19).

Ejemplo 11: Selección de anticuerpos que bloquean por cruzamiento la esclerostina que enlaza a anticuerpos de la presente invención

Ensayo de bloqueo cruzado Biacore

20 Lo que sigue describe en general un ensayo Biacore adecuado para determinar si un anticuerpo u otro agente de enlazamiento hacen bloqueo cruzado o es capaz de hacer bloqueamiento cruzado en anticuerpos de acuerdo con la invención. Será evidente que los ensayos pueden ser utilizados con cualquiera de los agentes de enlazamiento de esclerostina descritos aquí.

La maquina Biacore (por ejemplo la Biacore 3000) se opera en línea con las recomendaciones del fabricante.

25 La esclerostina puede ser acoplada por ejemplo a un chip CM5 Biacore a manera de química de acoplamiento de amina utilizada de rutina, por ejemplo, acoplamiento de amina EDC-NHS, para crear una superficie recubierta con esclerostina. Con el fin de mantener niveles medibles de enlazamiento, pueden acoplarse típicamente 200 – 800 unidades de resonancia de esclerostina al chip (esta cantidad da niveles medibles de enlazamiento y al mismo tiempo es fácilmente saturable por las concentraciones del reactivo de prueba que está siendo usado).

30 Una manera alternativa de enlazar esclerostina al chip de Biacore es utilizando una versión “etiquetada” de la esclerostina, por ejemplo, esclerostina etiquetada con His en terminal N o terminal C. En este formato, un anticuerpo anti-His puede ser acoplado al chip Biacore y luego la esclerostina etiquetada con His puede ser pasada sobre la superficie del chip y capturada por el anticuerpo anti-His.

35 Los dos anticuerpos a los cuales se va a establecer la capacidad para bloqueo cruzado uno con otro se mezclan en cantidades estequiométricas, por ejemplo, en una relación molar uno a uno, de sitios de enlazamiento en un regulador adecuado para crear la mezcla de prueba. El regulador usado es típicamente un regulador que normalmente se utiliza en la química de proteínas, tal como por ejemplo PBS (NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7.4). Cuando se calculan las concentraciones de una base de un sitio de enlazamiento se asume que el peso molecular de un anticuerpo es el peso molecular total del anticuerpo dividido por el número de sitios de enlazamiento objetivo (esto es esclerostina) sobre ese anticuerpo.

40 La concentración de cada anticuerpo en la mezcla de prueba debería ser lo suficientemente alta para asegurar la saturación de los sitios de enlazamiento para ese anticuerpo sobre las moléculas de esclerostina que están enlazadas al chip de Biacore. Los anticuerpos en la mezcla están en la misma concentración molar (sobre una base de enlazamiento) y la concentración estaría típicamente entre 1.0 mM y 1.5 mM (sobre la base de un sitio de enlazamiento).

45 También se preparan soluciones separadas que contienen los anticuerpos separados sobre sí mismos. El regulador utilizado para estas soluciones separadas debería ser del mismo regulador y a la misma concentración que el usado para la mezcla de prueba.

50 La mezcla de prueba se pasa sobre el chip Biacore recubierto con esclerostina y se registra el enlazamiento. Los anticuerpos enlazados se retiran posteriormente por tratamiento del chip con por ejemplo, un ácido, tal como HCl 30 mM durante aproximadamente 1 minuto. Es importante que las moléculas de esclerostina que estén enlazadas al chip no se deterioren.

La solución del primer anticuerpo solo se pasa entonces sobre la superficie recubierta con esclerostina y se registra el enlazamiento. Después de esto, el chip es tratado para retirar todo el anticuerpo enlazado sin deteriorar la esclerostina enlazada al chip, por ejemplo, por medio del tratamiento ácido antes mencionado.

5 La solución del segundo anticuerpo sola es pasada entonces sobre la superficie recubierta con esclerostina y se registra la cantidad de enlazamiento.

El enlazamiento teórico máximo puede ser definido como la suma del enlazamiento de la esclerostina de cada anticuerpo separadamente. Se compara este entonces con el enlazamiento real de la mezcla de anticuerpos medido. Si el enlazamiento real es inferior al del enlazamiento teórico, los dos anticuerpos se están bloqueando cruzadamente uno con otro.

10 Ensayo de bloqueo cruzado basado en ELISA

El bloqueo cruzado de un anticuerpo antiesclerostina u otro agente enlazante de esclerostina puede ser detectado también utilizando un ensayo ELISA.

15 El principio general del ensayo ELISA involucra el recubrimiento de un anticuerpo antiesclerostina sobre los pozos de una placa de ELISA. Una cantidad en exceso de un segundo anticuerpo antiesclerostina, potencialmente bloqueador cruzado se agrega entonces en solución (esto es no enlazado a la placa de ELISA). Se agrega entonces una cantidad limitada de esclerostina a los pozos.

20 El anticuerpo que ha sido recubierto sobre los pozos y el anticuerpo en solución competirán por el enlazamiento del número limitado de moléculas de esclerostina. La placa se lava entonces para eliminar la esclerostina que no ha sido enlazada al anticuerpo de la recubierta y también para retirar el segundo anticuerpo, en fase de solución, así como cualquier complejo formado entre el segundo anticuerpo en fase de solución y la esclerostina. La cantidad de esclerostina enlazada se mide entonces utilizando un reactivo apropiado de detección de esclerostina. Un anticuerpo en solución que es capaz de bloquear en cruzado el anticuerpo recubierto será capaz de producir un descenso en el número de moléculas de esclerostina que el anticuerpo recubierto puede enlazar con respecto al número de moléculas de esclerostina que el anticuerpo recubierto puede enlazar en ausencia del segundo anticuerpo en fase de solución.

25 Este ensayo se describe en más detalle más adelante para dos anticuerpos denominados Ab-X y Ab-Y. en el caso en el que se escoge Ab-X para ser el anticuerpo inmovilizado, se recubre sobre los pozos de la placa de ELISA, después de lo cual las placas se bloquean con una solución bloqueadora adecuada para minimizar el enlazamiento no específico de reactivos que se agregan subsecuentemente. Una cantidad en exceso de Ab-Y se agrega entonces a la placa de ELISA de tal manera que las moles de los sitios de enlazamiento de esclerostina Ab-Y por pozo son al menos 10 veces más altas que las moles de sitios de enlazamiento de esclerostina Ab-X que fueron utilizadas, por pozo, durante el recubrimiento de la placa de ELISA. La esclerostina se agrega de tal manera que las moles de esclerostina agregadas por pozo son al menos 25 veces inferiores que las moles de los sitios de enlazamiento de esclerostina Ab-X que fueron utilizadas para recubrir cada pozo. Después de un periodo de incubación adecuada, la placa de ELISA se lava y se agrega un reactivo de detección de esclerostina para medir la cantidad de esclerostina enlazada específicamente por el anticuerpo antiesclerostina recubierto (en este caso Ab-X). La señal de fondo para el ensayo se define como la señal obtenida en los pozos en donde el anticuerpo recubierto en este caso Ab-X, el segundo anticuerpo en fase de solución (en este caso Ab-Y), el regulador de esclerostina solamente (esto es sin esclerostina) y los reactivos de detección de esclerostina. La señal de control positivo para el ensayo se define como la señal obtenida en pozos en donde el anticuerpo recubierto (en este caso Ab-X), el regulador del segundo anticuerpo en fase de solución solamente (esto es, sin segundo anticuerpo en fase de solución), esclerostina y los reactivos de detección de la esclerostina. El ensayo de ELISA necesita ser desarrollado de manera tal que tenga la señal de control positiva al menos 6 veces la señal de fondo.

45 Para evitar que cualquier artefacto (por ejemplo afinidades significativamente diferentes entre Ab-X y Ab-Y para la esclerostina) resultante de la selección de cual anticuerpo utilizar como anticuerpo de recubrimiento y cual utilizar como segundo anticuerpo (competidor), el ensayo de bloqueo cruzado necesita ser desarrollado en dos formatos: 1) el formato 1 es cuando Ab-X es el anticuerpo que está recubierto sobre la placa de ELISA y Ab-Y es el anticuerpo competidor que está en solución y 2) el formato 2 es cuando Ab-Y es el anticuerpo que está recubierto sobre la placa ELISA y Ab-X es el anticuerpo competidor que está en solución.

50 **Ejemplo 12:** ELISA para detectar el efecto MOR05813_IgG2lambda sobre el enlazamiento de SOST de LRP6

ELISA de LRP6 /Esclerostina

55 Placas no tratadas de microtitulación de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µl/pozo de LRP6/Fc (1 µg/ml, R&D Systems, Cat#1505-LR) diluido en PBS. Como control para el enlazamiento no específico (NSB), algunos pocos pozos fueron rellenos con 100 µl/pozo de PBS. Las placas fueron cubiertas con película plástica e incubadas durante la noche a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, las placas fueron lavadas 3 veces con 200

5 μ l/pozo de Tween 20 al 0,05% (Fluka, Cat#93773) en PBS y los pozos fueron bloqueados durante 1 hora a 37°C agregando 300 μ l/pozo de regulador de bloqueo SuperBlock (Pierce, Cat#37535) en TBS. Después de la incubación, la solución de bloqueo fue retirada y se agregaron 100 μ l/pozo de esclerostina (derivada de *E.coli*, Novartis; 1 – 1000 ng/ml) diluida en BSA al 1% en PBS. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lavadas 3 veces con 200 μ l/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Después de esto, 100 μ l/pozo de anticuerpo anti-esclerostina (1 μ g/ml) diluido en BSA al 1% en PBS fueron agregados y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lavadas 3 veces con 200 μ l/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Finalmente, 100 μ l/pozo de IgG Ab de anti cabra conjugada con ALP (1: 5000; Sigma Cat#A-7888) diluido en BSA al 1% (Sigma Cat. Nb.:A-7888) en PBS fueron agregados durante 1 hora a temperatura ambiente y las placas fueron lavadas entonces 3 veces con 200 μ l/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Para determinar ALP, se agregaron 100 μ l/pozo de sustrato de ALP (Sigma, Cat#S0942) en solución (1 tableta por 5 ml de regulador de sustrato de dietanolamina 1x; Pierce, Cat#34064) a las placas durante 90 minutos y se midió la densidad óptica a 405 nm.

Actividad de Fab original y madurado por afinidad en ELISA LRP6 / esclerostina

15 La ELISA de LRP6 / esclerostina se basa sobre la capacidad de la esclerostina para enlazar LRP6. Para caracterizar adicionalmente los Fab producidos, se prueba una selección de Fab e IgG en este ensayo. En la presencia de un anticuerpo anti-esclerostina de R&D (1000 ng/ml \approx 7nM), el enlazamiento de esclerostina (0.9 nM) a LRP6 fue inhibido en 68% en comparación con el control (datos no mostrados). La MOR05813_IgG2 lambda inhibe el enlazamiento de la esclerostina a LRP6 hasta en 90% a 90 nM, mientras que una IgG antilisoizima usada como control negativo no tuvo efecto sobre el enlazamiento de la esclerostina a LRP6 (figura 20).

Ejemplo 13: Cotratamiento utilizando MOR05813

MOR05813 + ácido zoledrónico

25 Ratones hembra OF1/IC de 8 meses de edad (n=10/grupo, Charles River, Francia) fueron ovariectomizados para inducir la pérdida de hueso por privación de estrógeno o se dejaron intactos. Los animales recibieron la administración 2 veces a la semana por vía intravenosa de anticuerpo anti-esclerostina MOR05813 (24 mg/kg, h/mlgG2a) o anticuerpo de control (anti-PC-h/mlgG2a, intacto y grupos de control OVX). Grupos adicionales recibieron una aplicación individual de ácido zoledrónico solo (100 mg/kg) o en combinación con el anticuerpo anti-esclerostina MOR05813. El tratamiento con anticuerpo duró 3,5 semanas (7 aplicaciones).

30 La masa y geometría ósea de la tibia de los animales se midió antes de la ovariectomía por tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT). Los animales fueron distribuidos de manera homogénea de acuerdo con el peso corporal y la densidad mineral ósea total en la tibia en grupos. Los cambios en densidad mineral, masa y geometría ósea fueron evaluados al final del periodo de tratamiento.

35 Los resultados se expresan como +/- SEM promedio. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando RS1 (serie 1999 para Windows, Domain Manufacturing Corp., Estados Unidos). Los datos fueron sometidos al análisis en una vía de la varianza (ANOVA). La equivalencia de varianzas fue probada por la prueba Levene F y las diferencias entre los grupos utilizando la prueba de Dunnett ajustada según Bonferroni. Los grupos tratados fueron probados en cuanto al significado de diferencias a partir del grupo OVX tratado con el anticuerpo de control ($p < .05^*$, $p < .01^{**}$).

40 La pérdida de hueso inducida por ovariectomía puede ser bloqueada por el tratamiento con anticuerpos en ratones de edad (figura 21). Cuando el anticuerpo se utiliza en combinación con una inyección intravenosa individual del ácido zoledrónico bifosfonato la pérdida de hueso se bloquea y la ganancia de hueso se induce según lo indican los incrementos en el contenido mineral óseo total (figura 21 A) y densidad (figura 21 B), así como los incrementos en el espesor cortical (figura 21 C) y en la densidad mineral ósea del esponjoso (figura 21 D).

MOR05813 + pretratamiento con alendronato

45 Ratones hembra OF1/IC de 4.5 meses de edad (n=10/grupo, Charles River, Francia) recibieron la administración dos veces a la semana de anticuerpo MOR05813 de anti-esclerostina por vía intravenosa (10 mg/kg, h/mlgG2a) o anticuerpo de control (anti-PC-mlgG2a, intacto y con grupos de control de OVX). Grupos adicionales habían recibido pretratamiento con alendronato durante 7 semanas (4 μ g/kg/día; 5 días/semana) antes de recibir bien sea el anticuerpo de control o el anticuerpo anti-esclerostina MOR05813. El tratamiento con anticuerpo duró 3.5 semanas (7 aplicaciones).

50 La masa y geometría del hueso tibial de los animales fueron medidas antes de la iniciación del tratamiento con anticuerpo mediante tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT). Los animales fueron distribuidos de manera homogénea de acuerdo con el peso corporal y la densidad mineral ósea total en la tibia en grupos. Los cambios en densidad mineral, masa y geometría ósea fueron evaluados al final del periodo de tratamiento.

5 Los resultados se expresan como +/- SEM promedio. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando RS1 (serie 1999 para Windows, Domain Manufacturing Corp., Estados Unidos). Los datos fueron sometidos a un análisis de una vía de la varianza (ANOVA). La igualdad de las varianzas fue probada por la prueba de Levene F y las diferencias entre grupos utilizando la prueba de Dunnett ajustada según Bonferroni. Los grupos pretratados con alendronato fueron probados en cuanto al significado de la diferencia con respecto a los grupos que no recibieron pretratamiento ($p < .05^*$, $p < .01^{**}$).

10 El pretratamiento a largo plazo con bifosfonato alendronato no tiene impacto negativo sobre la acción anabólica ósea de la antiesclerostina MOR05813 según lo reflejan los incrementos en el contenido mineral total de hueso (figura 22 A) y su densidad (figura 22 B) así como por incrementos en el espesor cortical (figura 22 C) y en la densidad mineral del hueso esponjoso (figura 22 D). Debido a las propiedades antiresorventes persistentes del bifosfonato más allá del periodo de administración, se observó un incremento en el contenido mineral óseo total (figura 22 A) y el espesor cortical (figura 22 C).

MOR05813 + DKK1 o hPTH

15 Ratones lampiños hembra de seis meses de edad ($n=8$ /grupo) recibieron la administración dos veces a la semana de vehículo por vía intravenosa, anticuerpo MOR05813 antiesclerostina (10, 20 y 40 mg/kg, IgG2), anticuerpo antiDkk1 (10 mg/kg, IgG1), hPTH(1-34) (100 microg/kg) o combinaciones de los mismos. Los tratamientos con anticuerpo duraron 4 semanas (8 aplicaciones).

20 La masa y geometría del hueso tibial de los animales se midió antes del tratamiento mediante tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT). Los animales fueron distribuidos de manera homogénea de acuerdo con el peso corporal y la densidad mineral ósea total en la tibia en grupos. Los cambios en densidad mineral, masa y geometría ósea fueron evaluados al final del periodo de tratamiento.

25 Los resultados se expresan como +/- SEM promedio. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando RS1 (serie 1999 para Windows, Domain Manufacturing Corp., Estados Unidos). Los datos fueron sometidos a análisis de una vía de la varianza (ANOVA). La igualdad de las varianzas fue probada mediante la prueba de Levene F y las diferencias entre los grupos utilizando la prueba de Dunnett ajustadas según Bonferroni. Los grupos fueron probados en cuanto a significado de la diferencia a partir del grupo tratado con vehículo ($p < .05^*$, $p < .01^{**}$).

30 Los efectos anabólicos en el hueso se incrementan con la dosis de la antiesclerostina MOR05813 (figura 23). El cotratamiento con un anticuerpo antiDkk1 da como resultado un incremento mejorado en el contenido mineral óseo total (figura 23 A) y su densidad (figura 23 B) y el espesor cortical (figura 23 C) y un incremento sinérgico en la densidad mineral ósea del esponjoso (figura 23 D). El cotratamiento con hPTH (1-34) da como resultado un incremento sinérgico en todos los parámetros medidos (figuras 23 A - D).

Listado de secuencias

<110> Novartis AG

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA USO DE ANTICUERPOS CONTRA ESCLEROSTINA

35 <130> 52279

<160> 171

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 10

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Asn
1 5 10

<210> 2

ES 2 448 542 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

5

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Asn
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 5

<211> 10

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 6

25

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 7

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 8

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

15 <210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

20

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 10

ES 2 448 542 T3

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 12

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 13

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

20 <210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 448 542 T3

Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 16

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Trp Val Ser Val Thr Gly Val His Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

15 <210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Trp Val Ser Val Ile Gly Asn Trp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

20

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

ES 2 448 542 T3

<213> Homo sapiens

<400> 18

Trp Val Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 19

5 <211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Trp Val Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

10 <210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

15

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 21

Trp Val Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 22

<211> 19

ES 2 448 542 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Trp Val Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

5 <210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp Phe
1 5 10 15

10

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 24

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 25

Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp Phe
1 5 10 15

<210> 26

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 26

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 27

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 28

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

15 <210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

20

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 30

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 31

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 32

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 33

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

20 <210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

ES 2 448 542 T3

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val His

1 5 10

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 35

Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 36

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val His
1 5 10

<210> 37

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

20 <210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

ES 2 448 542 T3

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 39

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 40

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 41

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

20 <210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

ES 2 448 542 T3

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 44

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 45

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

20 <210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

ES 2 448 542 T3

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 47

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 48

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 49

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

20

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 50

```
Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1           5           10
```

<210> 51

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

```
Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1           5           10
```

<210> 52

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

```
Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1           5           10
```

15 <210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

```
Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1           5           10
```

20

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 54

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 55

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 56

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Ser Trp Ala Gly Ser Ser Gly Ser Tyr
1 5 10

15 <210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

20

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 58

Ala Ser Trp Thr Gly Val Glu Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 59

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Gln Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Glu
1 5 10

<210> 60

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

15

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 61

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 62

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 63

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 64

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ser Thr Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu
1 5 10

15 <210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

20

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 66

ES 2 448 542 T3

Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 67

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp
100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68

<211> 117

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

ES 2 448 542 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
 20 25 30

Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 69

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 69

ES 2 448 542 T3

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

<210> 70

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 70

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

ES 2 448 542 T3

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

<210> 71

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 71

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

ES 2 448 542 T3

Thr Val Ser Ser
115

<210> 72

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Gly Asn Trp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 73

<211> 116

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

ES 2 448 542 T3

Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 74

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 74

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 75

<211> 117

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 75

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

<210> 76

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
 20 25 30
 Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

ES 2 448 542 T3

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 77

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 77

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
20 25 30

Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 78

<211> 110

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

ES 2 448 542 T3

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val
 20 25 30

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

Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Ala Gly Ser Ser Gly Ser
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 79

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 79

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
 20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
 85 90 95

ES 2 448 542 T3

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 80

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 80

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val
 20 25 30

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

Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Thr Gly Val Glu Pro Asp
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 81

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
 20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

ES 2 448 542 T3

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Tyr Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 82

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 82

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 83

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 83

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 84

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

ES 2 448 542 T3

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 85

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 85

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 86

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

ES 2 448 542 T3

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 87

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 87

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser

ES 2 448 542 T3

85

90

95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 88

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 88

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile
20 25 30

Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 89

<211> 372

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 89

ES 2 448 542 T3

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatgtta tgaattgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcttt atctctggtg attctagcaa tacctattat 180

 gcggatagcg tgaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactttt 300
 atgcatggtc atcttgggtg tggcttttct atggattttt ggggccaagg caccctgggtg 360
 acggttagct ca 372

<210> 90

5 <211> 351

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 90

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatgtta tgaattgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat 180
 gcggatagcg tgaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgatact 300
 tatcttcatt ttgattattg gggccaagcc accctgggtga cgggttagctc a 351

10 <210> 91

<211> 372

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 91

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatgtta tgaattgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcttt atctctggtg attctagcaa tacctattat 180
 gcggatagcg tgaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactttt 300
 atgcatggtc atcttgggtg tggcttttct atggattttt ggggccaagg caccctgggtg 360
 acggttagct ca 372

15

<210> 92

ES 2 448 542 T3

<211> 351

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 92

```

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat      180

gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggcctgtg attattgcgc gcgtgatact      300
tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggtagctc a                351

```

5

<210> 93

<211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 93

```

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt actggtgttc atggtgatac ttattatgct      180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg      240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat      300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca                348

```

<210> 94

<211> 348

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 94

```

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attggttaatt ggggtgatac ttattatgct      180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg      240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat      300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca                348

```

ES 2 448 542 T3

<210> 95

<211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 95

```

caggtgcaat tggtgaaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc     120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt actactcacc agggttatac ttattatgct     180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg     240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat     300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca                    348

```

<210> 96

<211> 348

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 96

```

caggtgcaat tggtgaaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc     120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt actaatcgtt atggttatac ttattatgct     180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg     240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat     300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca                    348

```

<210> 97

<211> 351

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 97

```

caggtgcaat tggtgaaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc     120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat     180
gcggatagcg taaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat     240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggcctgtt attattgcgc gcgtgatact     300
tatcttcatt ttgattattg gggccaaggg accctggtga cggttagctc a                    351

```

ES 2 448 542 T3

<210> 98

<211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 98

```
caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attactcctt atggtgatac ttattatgct 180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348
```

<210> 99

<211> 348

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 99

```
caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attactcctt atggtgatac ttattatgct 180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348
```

<210> 100

<211> 330

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 100

ES 2 448 542 T3

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tcgtgtagcg gcgataatat tggttctttt tatgttcatt ggtaccagca gaaaccggg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aataatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg cggttcttgg gctggttctt ctggttctta tgtgtttggc 300
 ggccgcacga agttaaccgt tcttggccag 330

<210> 101

<211> 339

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 101

gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaagcggc aacaccgca gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcgggaag acgaagcggg ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct taettcttat 300
 gtgtttggcg gcggcagaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 102

<211> 330

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 102

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc 60
 tcgtgtagcg gcgataatat tggttctttt tatgttcatt ggtaccagca gaaaccggg 120
 caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aataatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcggaa 240
 gacgaagcgg attattattg cgcttcttgg actggtgttg agcctgatta tgtgtttggc 300
 ggccgcacga agttaaccgt tcttggccag 330

<210> 103

15 <211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 103

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgacat tagcggcctg	240
caagcgggaag acgaagcggga ttattattgc cagtcttatg ctggttctta tctttctgag	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339

<210> 104

<211> 339

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 104

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgacat tagcggcctg	240
caagcgggaag acgaagcggga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339

<210> 105

10 <211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 105

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgacat tagcggcctg	240
caagcgggaag acgaagcggga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339

15 <210> 106

<211> 339

ES 2 448 542 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 106

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339

5 <210> 107

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 107

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339

10

<210> 108

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 108

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tctacttatg atggtcctgg tctttctgag	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339

ES 2 448 542 T3

<210> 109

<211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 109

```

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc      60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag      120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtcc ctcaggcgtg      180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgaccat tagcggcctg      240
caagcggaag acgaagcggg ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat      300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag                               339
    
```

<210> 110

<211> 339

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 110

```

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc      60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag      120
cateccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgtcc ctcaggcgtg      180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgaccat tagcggcctg      240
caagcggaag acgaagcggg ttattattgc tctacttatg atggtcctgg tctttctgag      300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag                               339
    
```

<210> 111

<211> 469

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

ES 2 448 542 T3

	35						40							45	
Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
50						55					60				
Glu	Trp	Val	Ser	Phe	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala
65					70					75					80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
				85					90					95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105						110	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Thr	Phe	Met	His	Gly	His	Leu	Gly	Gly	Gly	Leu
		115					120					125			
Ser	Met	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
	130					135					140				
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser
145					150					155					160
Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
				165					170						175
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
			180					185							190
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
		195					200					205			
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
	210					215					220				
Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr
225					230					235					240
Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro
				245					250					255	
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			260					265						270	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
		275					280						285		

ES 2 448 542 T3

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 112

<211> 462

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 112

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

ES 2 448 542 T3

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 225 230 235 240

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

ES 2 448 542 T3

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu
 115 120 125

Ser Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 145 150 155 160

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 225 230 235 240

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 245 250 255

ES 2 448 542 T3

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 114

<211> 462

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 114

ES 2 448 542 T3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
225 230 235 240

ES 2 448 542 T3

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 115

<211> 461

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 115

ES 2 448 542 T3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Thr Gly Val His Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 225 230 235 240

ES 2 448 542 T3

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 116

<211> 461

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 116

ES 2 448 542 T3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Asn Trp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
195 200 205

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu

ES 2 448 542 T3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220

ES 2 448 542 T3

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 118

<211> 465

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 118

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
 195 200 205

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 210 215 220

ES 2 448 542 T3

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

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
260 265 270

Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
275 280 285

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
290 295 300

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
325 330 335

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
355 360 365

Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
370 375 380

Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
385 390 395 400

Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
420 425 430

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 119

<211> 462

5 <212> PRT

ES 2 448 542 T3

<213> Homo sapiens

<400> 119

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala' Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

ES 2 448 542 T3

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 225 230 235 240

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 120

<211> 461

ES 2 448 542 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

ES 2 448 542 T3

195	200	205																			
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro						
210						215					220										
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu						
225					230					235					240						
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu						
				245					250					255							
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu						
			260					265					270								
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln						
		275					280					285									
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys						
290						295					300										
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu						
305					310					315					320						
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys						
				325					330					335							
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys						
			340					345					350								
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser						
		355					360					365									
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys						
370						375					380										
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln						
385					390					395					400						
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly						
				405					410					415							
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln						
			420					425					430								
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn						
		435					440				445										
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
450							455						460								

ES 2 448 542 T3

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
180 185 190

5

ES 2 448 542 T3

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

ES 2 448 542 T3

435

440

445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 122

<211> 130

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 122

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
 20 25 30

Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly
 35 40 45

Ser Phe Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
 50 55 60

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly
 85 90 95

Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Ala Gly
 100 105 110

Ser Ser Gly Ser Tyr Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

Gly Gln
 130

<210> 123

<211> 237

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

ES 2 448 542 T3

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
 100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 124

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 124

ES 2 448 542 T3

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
 20 25 30

Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly
 35 40 45

Ser Phe Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
 50 55 60

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly
 85 90 95

Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Thr Gly
 100 105 110

Val Glu Pro Asp Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 210 215 220

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230

<210> 125

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 125

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser
 100 105 110

Tyr Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 126

ES 2 448 542 T3

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 126

```

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1          5          10          15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
          20          25          30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
          35          40          45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50          55          60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65          70          75

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100          105          110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115          120          125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130          135          140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145          150          155

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165          170          175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180          185          190

```

ES 2 448 542 T3

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 127

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 127

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
 100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp

ES 2 448 542 T3

165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 128

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 128

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

ES 2 448 542 T3

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 129

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 129

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

ES 2 448 542 T3

115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 130

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 130

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

ES 2 448 542 T3

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr
 100 105 110

Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 131

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 131

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
 20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val

ES 2 448 542 T3

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr
 100 105 110

Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 133

<211> 1410

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 133

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagcgt gcaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcagc tacgtgatga actgggtgcg gcaggcccct 180

 ggcaagggcc tggagtgggt gtccttcacg agcggcgaca gcagcaacac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gaccttcag 360
 cacggccacc tggcgggagg actgagcatg gatttctggg gccagggcac cctggtcacc 420
 gtctctcag cttccaccaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 480
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg 540
 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600
 cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgacag tgcctccag caacttcggc 660
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 720
 gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 900
 gttggacggc tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcacggtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
 gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagacctct ccctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 134

<211> 1389

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 134

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgcccgcca gcggttccac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360
 ctgcaacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420
 ggcccatccg tcttccccct ggcccccctg tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc 540
 gctctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
 ctcagcagcg tgggtgacagt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac 660
 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcga atgttgtgtc 720
 gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctc cttcccccca 780
 aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctg ggtggtggac 840
 gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
 aatgccaaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960
 ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatgcctg tggagtggga gagcaatggg 1200
 cagccggaga acaactaaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctccttcttc 1260
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
 ggtaaatga 1389

<210> 135

<211> 1410

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 135

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagcgt gcaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagctctg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcagc tacgtgatga actgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggagtgggt gtccttcacg agcggcgaca gcagcaaacac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gacottcatg 360
 cacggccacc tgggcgagg actgagcatg gatttctggg gccagggcac cctggtcacc 420
 gtctcctcag cttccaccaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 480
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggccaagg actacttccc cgaaccgggtg 540

 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600
 cagtccctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacag tggcctccag caacttcggc 660
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 720
 gttgagcgc aatggttgtg cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 840
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctgt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggt agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgag 1380
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 136

<211> 1389

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 136

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggtttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360
 ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420
 ggcccacccg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
 ctgggtgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggg 540
 gctctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
 ctcagcagcg tggtgacagt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac 660
 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcggaa atggtgtgtc 720

 gagtgcacc cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 780
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctt ggtggtggac 840
 gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
 aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960
 ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatgcctg tggagtggga gagcaatggg 1200
 cagccggaga acaactaaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctccttcttc 1260
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
 ggtaaatga 1389

<210> 137

<211> 1386

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 137

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggtg gtgcagcctg gggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcaac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgacc ggctgacag gcgacaccta ctacgccgac 240
 agcgtgaagg gccggttcaac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300
 atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagga cacctacctg 360
 cacttcgact actggggcca gggcacctg gtccacctc cctcagcttc caccaagggc 420
 ccatccgtct tccccctggc gcctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgtc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttccggcacc agacctacac ctgcaacgta 660
 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag 720
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc 960
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
 ggctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
 tgctgtgtca aaggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgtggact ccgacggctc cttcttctc 1260
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aatga 1386

<210> 138

<211> 1386

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 138

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc ggcaactggg gcgacaceta ctacgccgac 240
 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300
 atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360
 cacttcgact actggggcca gggcaccttg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttccggcacc agacctacac ctgcaacgta 660
 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcfaatg ttgtgtcgag 720
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa 780
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc 960
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
 ggctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca cctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
 tgctgtgca aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1260
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc 1320
 gtgatgatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aaatga 1386

<210> 139

<211> 1386

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 139

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgcccga ggggcttca cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgacc acccaccagg gctacaccta ctacgcccag 240
 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgag 300
 atgaacagcc tgcggggcca ggacaccgcc gtgtactact gcgccagggg cacctacctg 360
 cacttcgact actggggcca gggaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttccggcacc agacctacac ctgcaacgta 660
 gatcacaagc ccagcaacac caagtgaggc aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag 720
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc 960
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
 ggctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atcccggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
 tgcttggtca aaggcttcta ccccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 ccgagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1260

 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aatga 1386

<210> 140

<211> 1386

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 140

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca ggggcttcac cttcagaage cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgccacc aacagatagc gctacaccta ctacgccgac 240
 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300
 atgaacagcc tgcggggcga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagga cacctacctg 360
 cacttogact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
 ccatccgtct tccccctggc gcctgtctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480
 ggctgcoctgg tcaaggacta cttccccgaa coggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgtc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttgggcaacc agacctacac ctgcaacgta 660
 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgc aaatg ttgtgtcgag 720
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 780
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc 960
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa 1020
 ggctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
 tgctgggtca aaggcttcta ccccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aatga 1386

<210> 141

<211> 1389

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 141

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggtctg gtgcagcctg gggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcy gcaggcccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgogccag ggacacctac 360
 ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420
 ggcccatccg tcttccccct ggcgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc 540
 gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtctcagc actctactcc 600
 ctcagcagcgt tggtgacagt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 660
 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcga atgttgtgtc 720
 gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttccccca 780
 aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 840
 gtgagccacg aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
 aatgccaaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960
 ctaccggtg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
 cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
 ggtaaatga 1389

<210> 142

<211> 1386

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 142

ES 2 448 542 T3

```

atggccttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag    60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc    120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct    180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc accccctacg gcgacaccta ctacgccgac    240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgagc    300
atgaacagcc tgcggggcca ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg    360
cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc    420
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg    480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct    540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc    600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc ccagacctacac ctgcaacgta    660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgctgag    720
tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa    780
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggta cgtgcgtggg ggtggacgtg    840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat    900
gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc    960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa   1020
ggcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca   1080
caggtgtaca cctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc   1140
tgctgtgca aaggttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag   1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc   1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc   1320
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt   1380
aatga                                           1386

```

<210> 143

<211> 1386

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 143

ES 2 448 542 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tgcgagcgg cggaggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180

 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc accccctacg gcgacaccta ctacgccgac 240
 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgacg 300
 atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360
 cacttcgact actggggcca gggcacctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
 ccatcctct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta 660
 gatcacaagc ccagcaacac caagtgagc aagacagttg agcgcgaaatg ttgtgtcgag 720
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780
 cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggta cgtgcgtggt ggtggacgtg 840
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc 960
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
 ggcctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
 tgctgggtca aaggcttcta cccagcggac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1260
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt 1380
 aatga 1386

<210> 144

<211> 393

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 144

ES 2 448 542 T3

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtagcgcag 60
 gccgatatcg aactgaccca gccgccttca gtgagcgttg caccaggcca gaccgcgcgt 120
 atctcgtgta gcggcgataa tattggttct ttttatgttc attggtacca gcagaaaccc 180
 gggcaggcgc cagttcttgt gatttatgat gataataatc gtccctcagg catcccggaa 240
 cgcttttagcg gatccaacag cggcaacacc gcgaccctga ccattagcgg cactcaggcg 300
 gaagacgaag cggattatta ttgcggttct tgggctggtt cttctgggtc ttatgtgttt 360
 ggcggccgca cgaagttaac cgttcttggc cag 393

<210> 145

<211> 714

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 145

atgagtgtgc tcactcaggt cctggcgttg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
 gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
 agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
 caccocggca aggccccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
 agcaaccogt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
 caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac 360
 gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc 420
 actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
 ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggagatag cagccccgtc 540
 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaagca acaacaagta cgcggccagc 600
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
 acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 146

10 <211> 705

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 146

ES 2 448 542 T3

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgagc tgacccagcc ccccagcgtg agcgtggccc ctggccagac cgcccggatc 120
agctgcagcg gcgacaacat cggcagcttc tacgtgcaact ggtatcagca gaagcccggc 180
caggcccccg tgctggtgat ctacgacgac aacaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg 240
ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccgag 300
gacgaggccg actactactg cgccagctgg accggcgtgg agcccgacta cgtgtttggc 360
ggcgaacaa agcttaccgt cctaggtcag cccaaggctg ccccctcggc cactctgttc 420
ccgcccctct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgac 480
ttctaccggg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagcccgt caaggcggga 540
gtggagacaa ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctatctg 600
agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660
gggagcaccg tgmetaagac agtggcccct acagaatggt catag 705

<210> 147

<211> 714

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 147

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
gacatcgccc tgacccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccgccgca aggcccccaa gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggc tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc cagagctacg ccggcagcta cctgagcggg 360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tgagacaaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcgccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcaccgt ggmetaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 148

<211> 714

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 148

```

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcgcttg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc      60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc      120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag      180
caccccgca aggcccccaa gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg      240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc      300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac      360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc      420
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcgccagc      600

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc      660
acgcatgaag ggagaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag          714

```

<210> 149

<211> 714

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 149

```

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcgcttg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc      60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc      120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag      180
caccccgca aggcccccaa gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg      240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc      300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac      360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc      420
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcgccagc      600

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc      660
acgcatgaag ggagaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag          714

```

<210> 150

10 <211> 714

<212> ADN

ES 2 448 542 T3

<213> Homo sapiens

<400> 150

```

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc      60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc      120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag      180
caccocggca agggcccca gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg      240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat cagcggcctc      300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac      360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggtgc cccctcggtc      420
actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      540

aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaagca acaacaagta cgcggccagc      600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc      660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag          714

```

<210> 151

5 <211> 714

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 151

```

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc      60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc      120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag      180
caccocggca agggcccca gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg      240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat cagcggcctc      300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac      360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggtgc cccctcggtc      420
actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      540

aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaagca acaacaagta cgcggccagc      600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc      660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag          714

```

10 <210> 152

<211> 714

ES 2 448 542 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 152

```
atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggttc 60
gacatcgccc tgacccägcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccccgcca aggcccccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcagag 360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc 420
actctgttcc cgcctctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540

aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgga aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714
```

5

<210> 153

<211> 714

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 153

ES 2 448 542 T3

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc 60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccccgcca agggcccaaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag 360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggctcagc ccaaggctgc ccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 154

<211> 714

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 154

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc 60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
caccccgcca agggcccaaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag 360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggctcagc ccaaggctgc ccctcggtc 420
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 155

10 <211> 213

<212> PRT

ES 2 448 542 T3

<213> homo sapiens

<400> 155

```

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

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
 20           25           30

Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35           40           45

Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
 50           55           60

Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
 65           70           75           80

Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
 85           90           95

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

Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
 115          120          125

Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
 130          135          140

Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
 145          150          155          160

Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
 165          170          175

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
 180          185          190

Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
 195          200          205

Leu Glu Asn Ala Tyr
 210

```

5 <210> 156

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 448 542 T3

<400> 156

Ala Arg Leu Leu Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg
1 5 10

<210> 157

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Arg Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His
1 5 10 15

10

<210> 158

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia de enlazamiento a proteína

<400> 158

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

20 <210> 159

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia de enlazamiento a proteína

<400> 159

ES 2 448 542 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly

<210> 160

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> ARNsi

<400> 160

taaattatca taaagtccta a 21

10 <210> 161

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> ARNsi

<400> 161

aggactttat gataattat t 21

<210> 162

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ARNsi

<400> 162

25 atagtggtta aataactcca g 21

<210> 163

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> ARNsi

<400> 163
 ggagttatt aaccactatt t 21
 <210> 164
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 164
 10 taaattctcg tgatgtgcca t 21
 <210> 165
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 165
 ggcacatcac gagaattat t 21
 <210> 166
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 25 <400> 166
 tttcttatag cacagctggt t 21
 <210> 167
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 167

ccagctgtgc tataagaaat t 21
 <210> 168
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 168
 tagaccttc catccagct g 21
 10 <210> 169
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> ARNsi
 <400> 169
 gcgtgatgg aaagtctat t 21
 <210> 170
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador RT-PCT
 <400> 170
 25 atgcagctcc cactggccct gtgtctgt 29
 <210> 171
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador RT-PCR
 <400> 171
 aatcaggccg agctggagaa cgcctactag 30

Referencias

- Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ (2004) Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 18(1):1-12.
- 5 Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, USA
- Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W. (2001) Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 10(5):537-43
- 10 Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, Dioszegi M, Dikkers FG, Hildering P, Willems PJ, Verheij JB, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W. (2002) Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet* 39(2):91-7.
- 15 Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J (2001) Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 68(3):577-89.
- Chen, B.P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73-75. 1994
- 20 Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865-881
- Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B, Hamdy NA, Lowik CW, Hamersma H, Beighton P, Papapoulos SE. (2005) Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers. *J Clin Endocrinol Metab* 90(12):6392-5
- 25 Haenel C, Satzger M, Della Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005) Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration. *Anal Biochem* 339(1):182-4
- Keller H, Kneissel M. (2005) SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 37(2):148-58.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL®) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.
- 30 Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X.Q., Schier, R., Sohlmann, P., Winter, J., Wolle, J., and Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.
- 35 Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 280(20):19883-7
- Löhning, C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.
- 40 Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, Ovcharenko D, Plajzer-Frick I, Rubin EM. (2005) Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 15 (7):928-35
- Low, N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359-368
- 45 Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretzschmar, T., Yayon, A., and Rothe, C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278(40):38194-38205
- Semenov MV, He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem.* 2006 Oct 19;

van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PH, Vrieling H, Papapoulos SE, Ten Dijke P, Lowik CW (2006) Wnt but not BMP Signaling is Involved in the Inhibitory Action of Sclerostin on BMP-Stimulated Bone Formation.

5 Virnekas B, Ge L, Pluckthun A, Schneider KC, Wellnhofer G, Moroney SE (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 22(25): 5600-5607

J Bone Miner Res 2006 Oct 10 Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist.

10 *EMBO J* 22(23):6267-76 Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, Skonier JE, Yu C, Latham JA (2005) Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem.* 28;280(4):2498-502

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antiesclerostina que comprende una secuencia de polipéptido de región variable de cadena pesada que comprenda SEQ ID NO: 70 y una secuencia de polipéptidos de región variable de cadena ligera que comprenda SEQ ID NO: 81.
- 5 2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa que comprenda SEQ ID NO: 114.
3. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa que comprenda SEQ ID NO: 125.
- 10 4. Un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 114 y la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 125.
5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, para uso como medicamento.
6. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
- 15 7. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, para uso en el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4.
- 25 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.
- 30 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que comprende adicionalmente al menos otro agente antiinflamatorio o antiosteoporótico.
12. Una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4.
- 35 13. Un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Un vector de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el vector comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 136 y 147.
15. Una célula anfitriona que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con las reivindicaciones 13 – 14.
- 40 16. Un proceso para la producción de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 15 y aislar dicho anticuerpo.
- 45 17. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 – 11 para uso en el tratamiento o profilaxis de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.

18. Un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4.
19. Un método *in vitro* para identificar una célula o tejido que expresan esclerostina, comprendiendo el método poner en contacto dicha célula o tejido con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, en donde dicho anticuerpo comprende un marcador detectable, tal como un marcador radioactivo, fluorescente, magnético, paramagnético o quimioluminiscente.
20. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 y (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tales como calcilíticos en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
21. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el medicamento se utiliza en conjunción con (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tales como calcilíticos, en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
22. Uso de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tales como calcilíticos, en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el medicamento es usado en conjunción con un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, y en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
23. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el paciente ha recibido la preadministración de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tales como calcilíticos, y en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
24. Uso de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tales como calcilíticos, en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el paciente ha recibido la preadministración de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, y en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
25. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 y (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tal como calcilíticos para uso en el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.

- 5 26. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 usado en conjunción con (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tales como calcilíticos para uso en el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
- 10 27. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 para uso en el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el paciente ha recibido la preadministración de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tales como calcilíticos, en donde el trastorno es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
- 15 28. (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de hormona paratiroide tales como calcilíticos para uso en el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina y que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina, en donde el paciente ha recibido la preadministración de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, y en donde el trastorno patológico es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, curación de fracturas e implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida de hueso debida a otros trastornos tales como pérdida de hueso asociada con infección por VIH, cánceres o artritis.
- 20 29. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 – 28 en donde el hPTH es hPTH (1 – 34).
- 25

Fig. 1

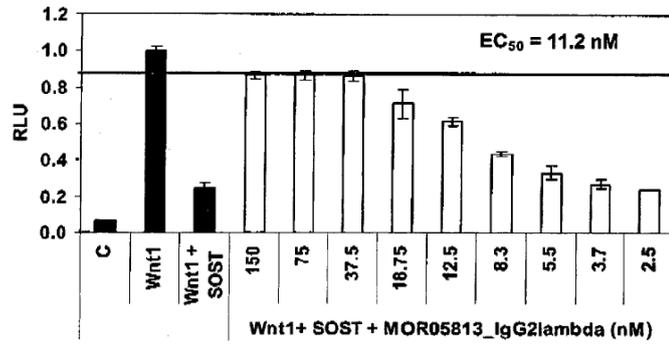


Fig. 2

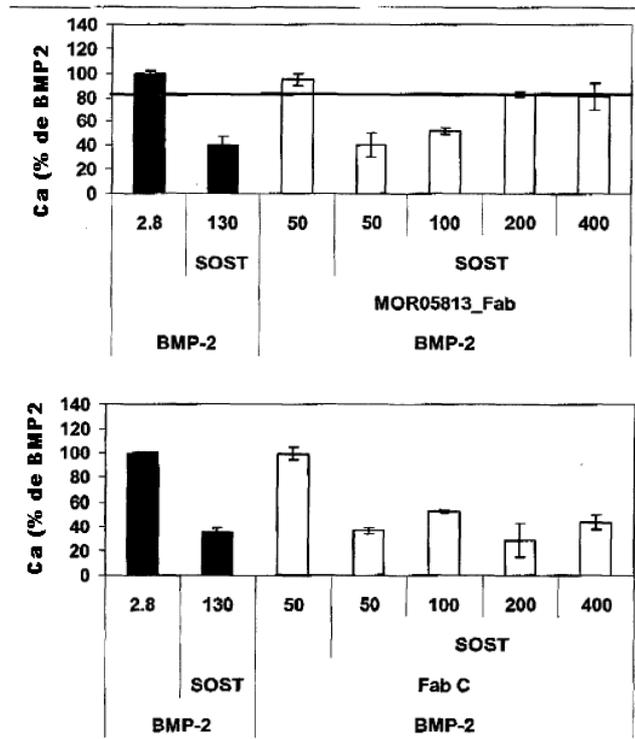


Fig. 3

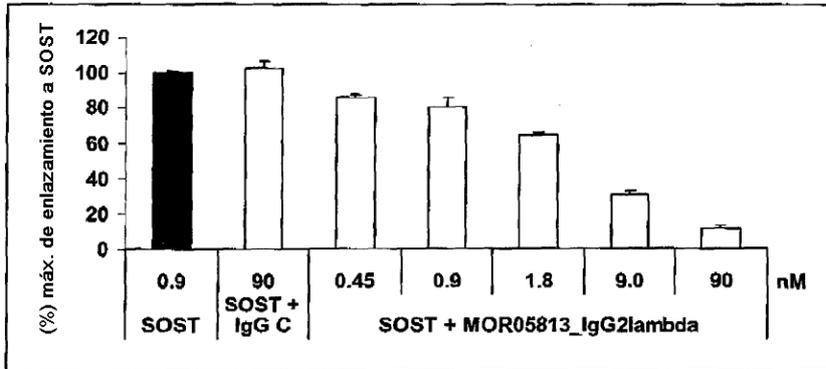


Fig. 4

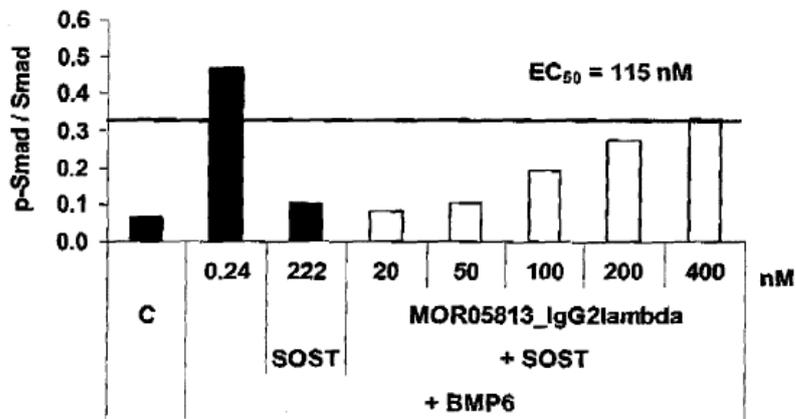
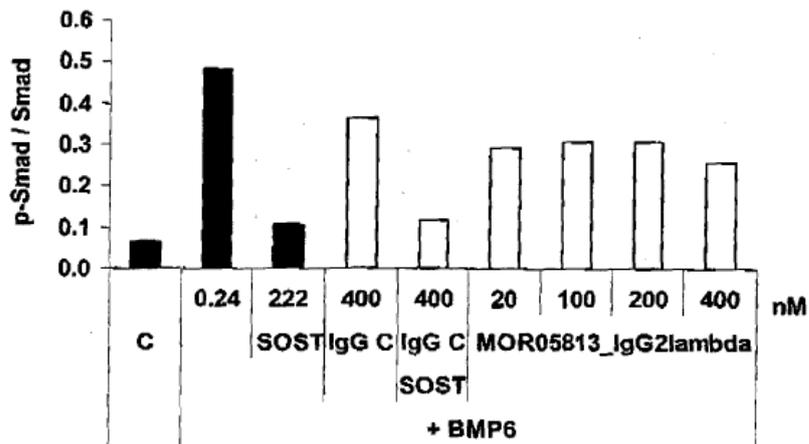
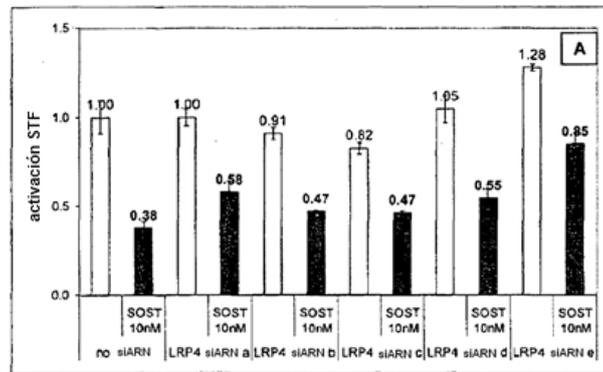


Fig. 5



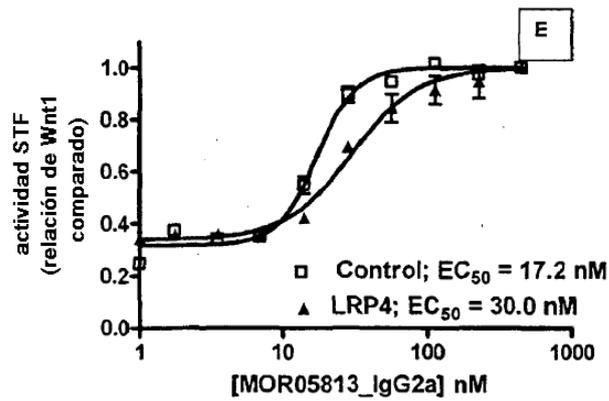
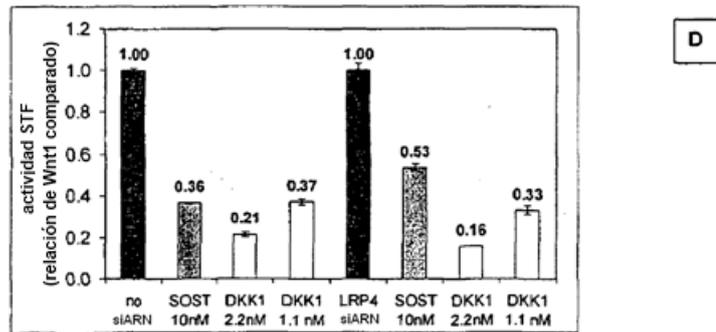
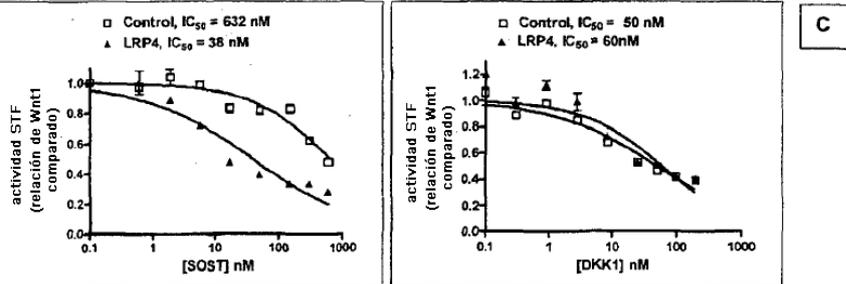
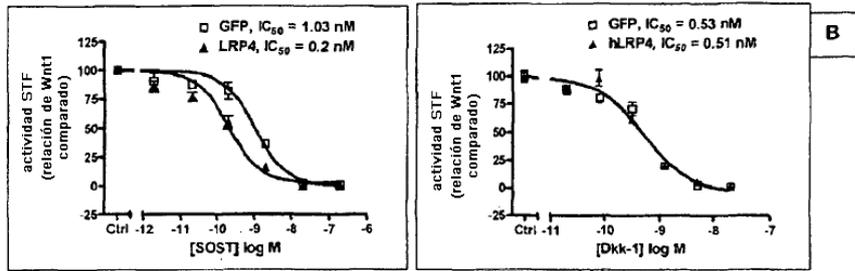


Fig. 6

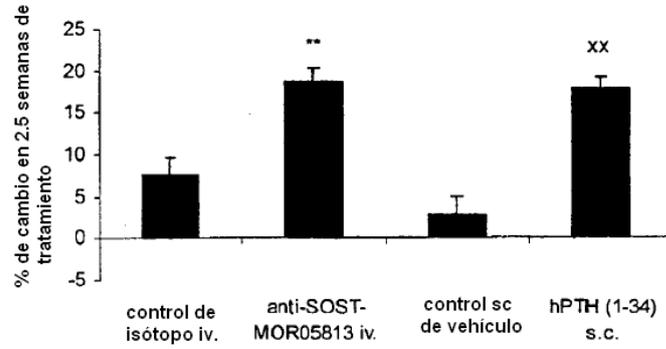


Fig. 7

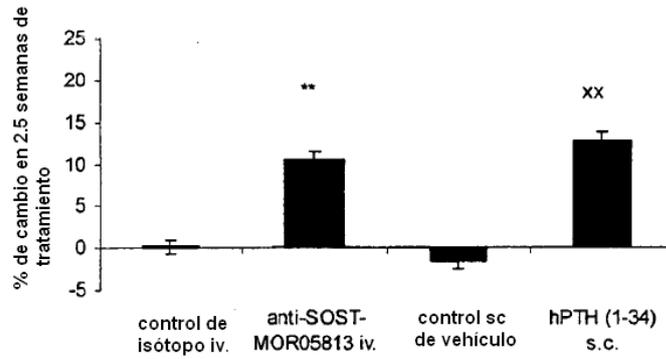


Fig. 8

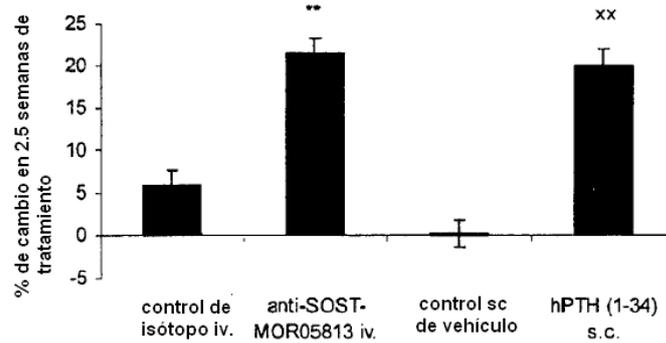


Fig. 9

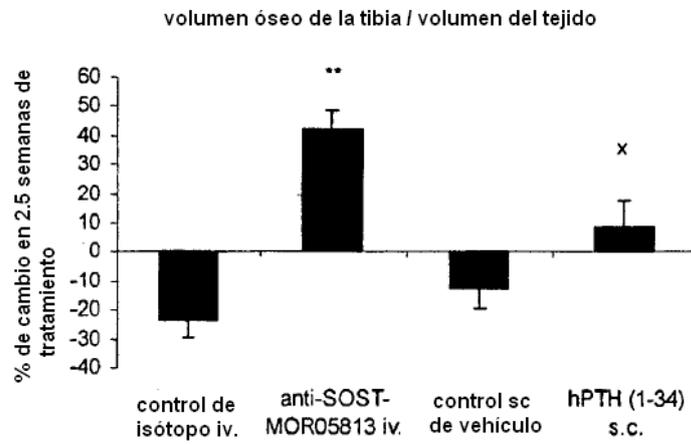


Fig. 10

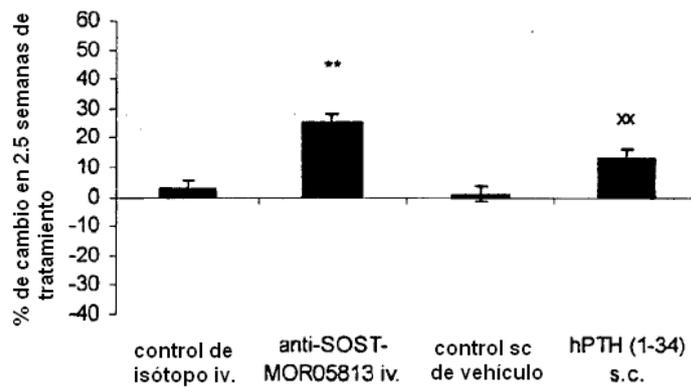


Fig. 11

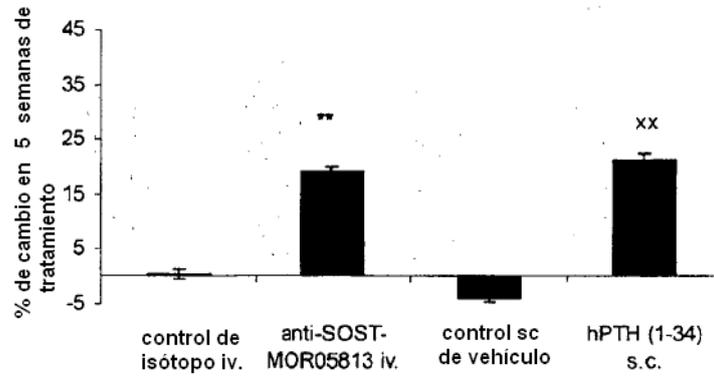


Fig. 12

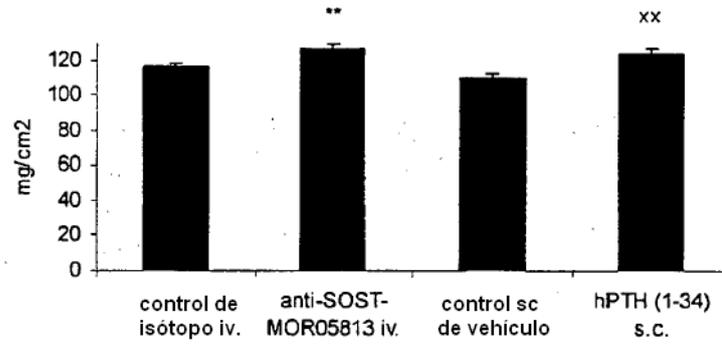


Fig. 13

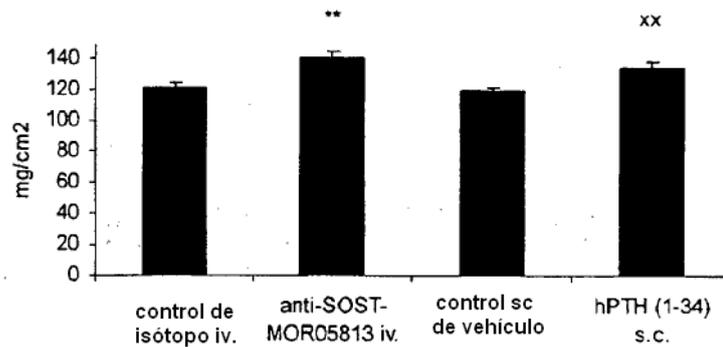


Fig. 14

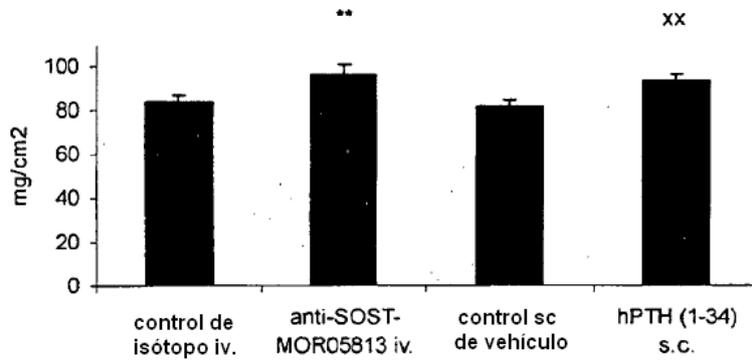


Fig. 15

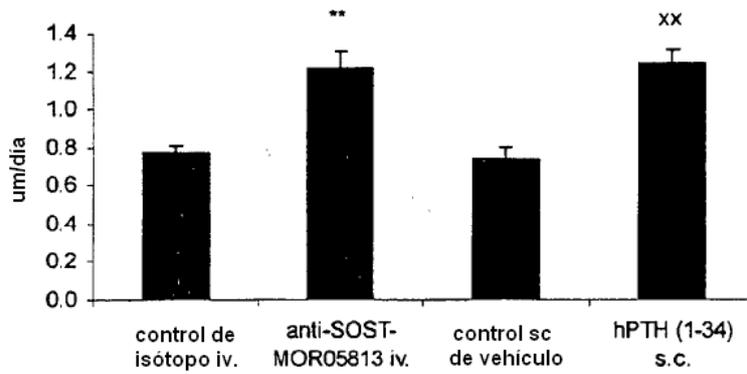


Fig. 16

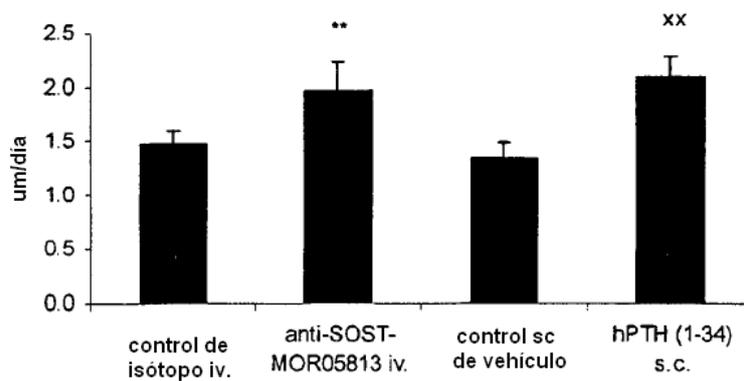


Fig. 17

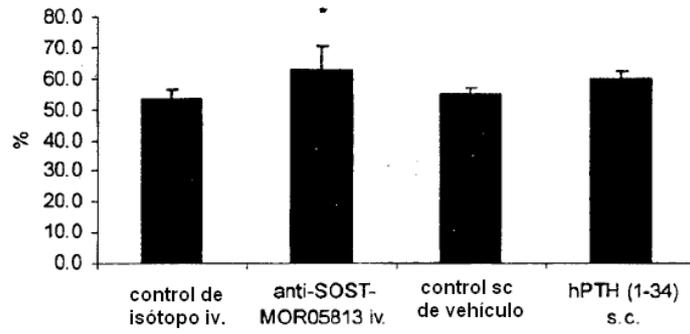


Fig. 18

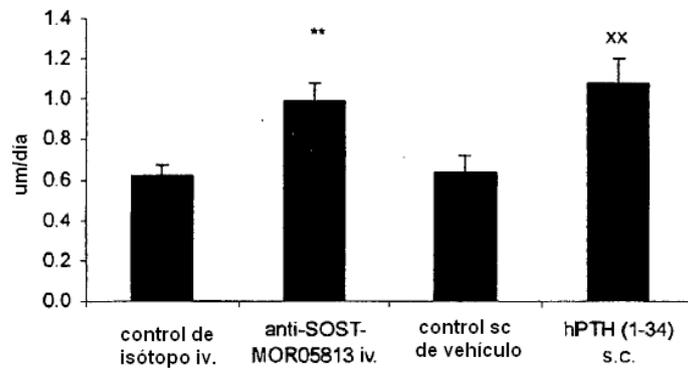


Fig. 19

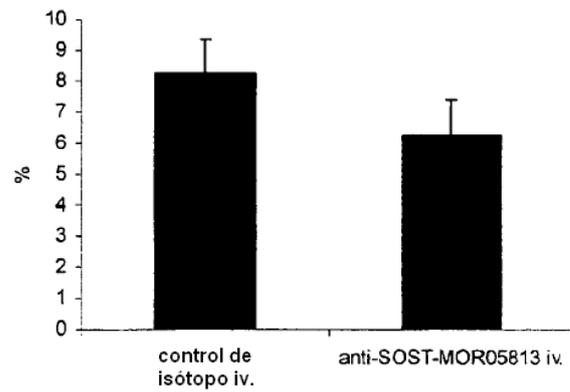


Fig.20

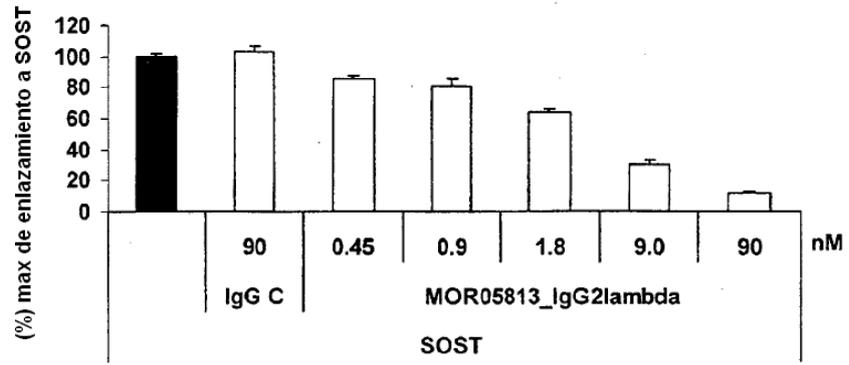


Fig. 21
A

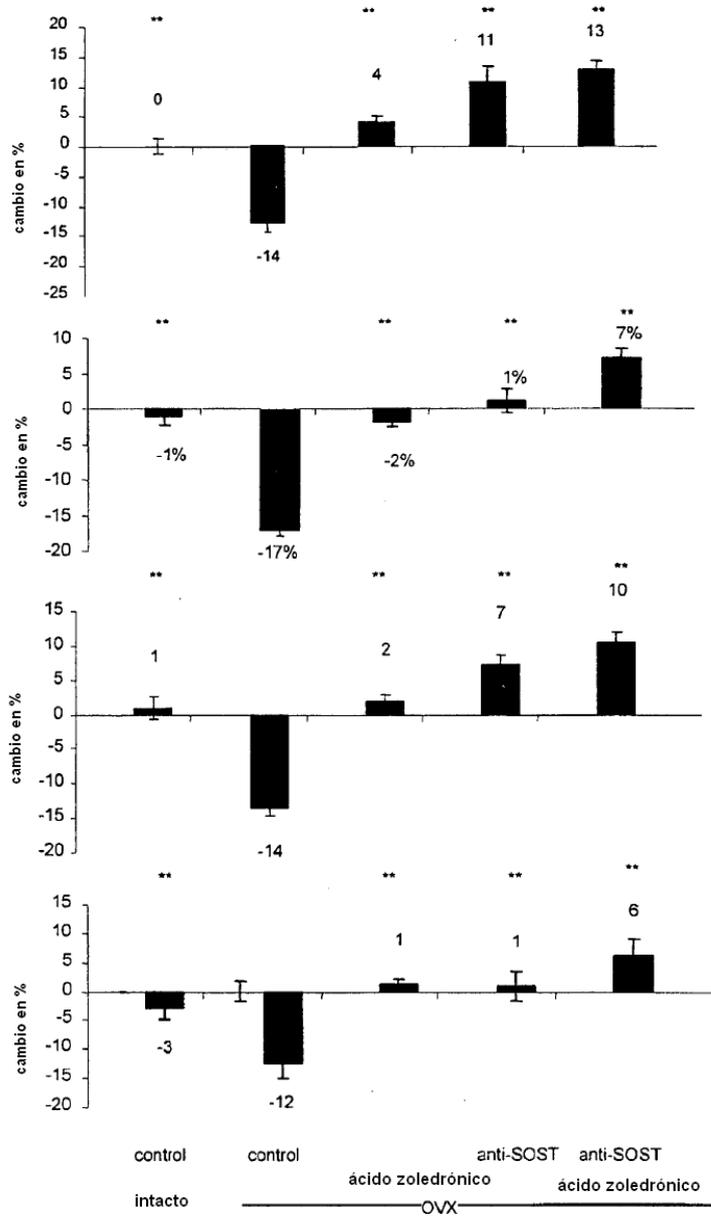


Fig. 22

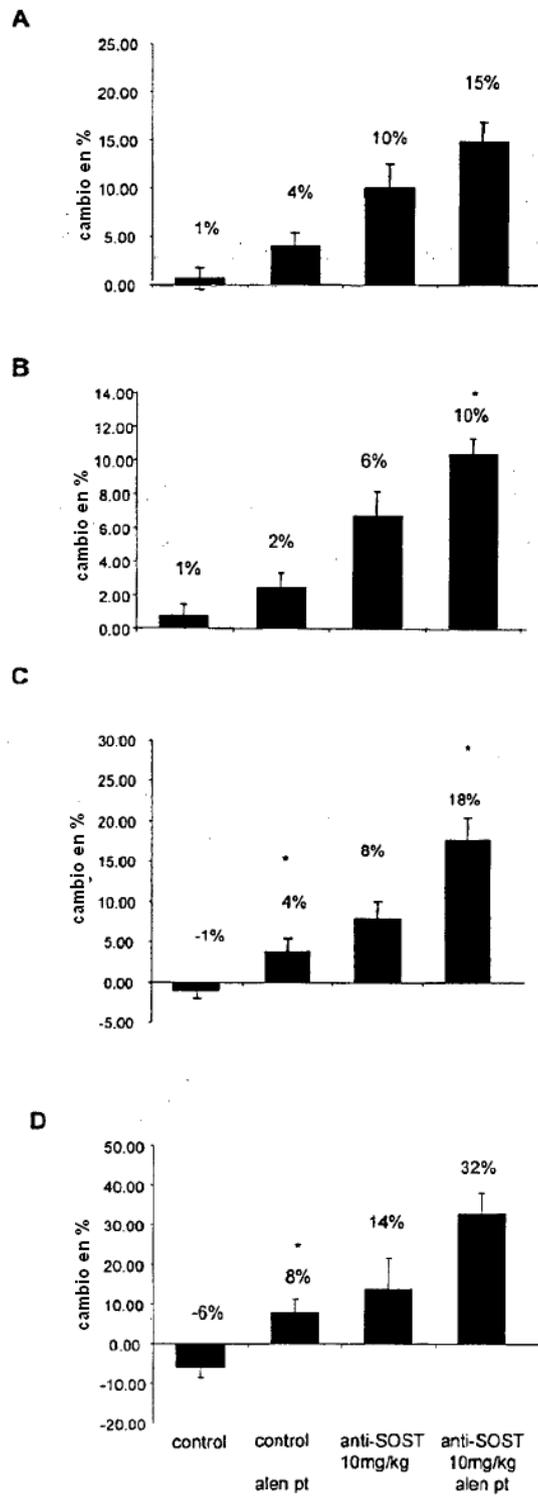


Fig. 23

