

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 124**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2001 E 10013041 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2305715**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal para la proteína de union a osteoprotegerina**

30 Prioridad:

23.02.2000 US 511139

22.02.2001 US 791153

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

12.05.2017

73 Titular/es:

AMGEN, INC (100.0%)

One Amgen Center Drive

Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es:

DESHPANDE, RAJENDRA V.;

HITZ, ANNA;

BOYLE, WILLIAM J. y

SULLIVAN, JOHN K.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 612 124 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal para la proteína de unión a osteoprotegerina.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos monoclonales y a dominios de unión a antígeno que se unen selectivamente a OPGbp y que se pueden utilizar para prevenir o tratar estados patológicos relacionados con la pérdida de masa ósea.

10

Antecedentes de la invención

El tejido óseo vivo presenta un equilibrio dinámico entre el depósito y la resorción del hueso. Dichos procesos están mediados principalmente por dos tipos de células: osteoblastos, que secretan moléculas que comprenden la matriz orgánica del hueso; y osteoclastos que promueven la disolución de la matriz ósea y la solubilización de las sales del hueso. En los individuos jóvenes con los huesos en crecimiento, la velocidad de depósito óseo excede a la velocidad de resorción ósea, en cambio, en los individuos maduros la velocidad de resorción puede exceder a la de depósito. En ésta última situación, la mayor descomposición del hueso lleva a una reducción de la masa y de la resistencia del hueso, a un mayor riesgo de fracturas y a una recuperación lenta o incompleta de las fracturas óseas.

15

20

Los osteoclastos son unas células multinucleadas fagocíticas grandes que se forman a partir de células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea. Si bien el crecimiento y la formación de osteoclastos funcionales maduros no se comprende completamente, se cree que los osteoclastos maduran junto con el linaje celular monocito/macrófago como respuesta a la exposición a varios factores que favorecen el crecimiento. Se cree que el primer desarrollo de células precursoras de médula ósea en preosteoclastos está mediado por factores solubles como factor- α de necrosis de tumor (TNF- α), factor- β de necrosis de tumor (TNF- β), interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6) y factor inhibidor de leucemia (LIF). En cultivo, los preosteoclastos se forman en presencia de factor de estimulación de colonia de macrófagos añadido (M-CSF). Estos factores actúan principalmente en las primeras etapas del desarrollo del osteoclasto.

25

30

Se ha descrito un factor de polipéptido, proteína de unión a osteoprotegerina (OPGbp), que estimula la formación de osteoclasto y la resorción ósea que, según parece, actúa en un último estadio del desarrollo. Véase el documento PCT WO 98/46751. OPGbp estimula la formación de osteoclastos desde las células precursoras de la médula ósea sin que sea necesario un co-cultivo en presencia de una línea celular estromal. La estimulación de la resorción ósea a través de OPGbp requiere de la interacción con su receptor afín, el receptor de diferenciación y activación de osteoprotegerina (ODAR), y la inhibición de la interacción ODAR/OPGbp a través de osteoprotegerina (OPG) también inhibe la resorción ósea. En consecuencia, la regulación de la unión de OPGbp a ODAR afecta a la formación de osteoclasto y la pérdida de hueso.

35

40

Uno de los objetos de la presente invención consiste en identificar agentes de unión selectivos que regulan la interacción de OPGbp y ODAR, especialmente los agentes que bloquean la interacción de OPGbp y ODAR y/o inhiben al menos una actividad de OPGbp, como la resorción ósea. Otro objeto más de la presente invención consiste en la identificación de agentes de unión selectivos que pueden utilizarse para prevenir y tratar la pérdida de masa ósea. Otro objeto más de la presente invención consiste en la identificación de un anticuerpo, o un dominio de unión a antígeno, o un fragmento o variante del mismo, que regula la interacción de OPGbp y ODAR y neutraliza al menos una actividad de OPGbp. Los anticuerpos pueden utilizarse para prevenir y tratar la pérdida de masa ósea.

45

K. Tsukii et al.: Biochemical And Biophysical Research Communications, 2646, 1998, 337-341 divulgan anticuerpos policlonales de conejo anti-ODF y las actividades de los mismos.

50

Sumario de la invención

La invención proporciona

55

1. Un anticuerpo monoclonal o un dominio de unión a antígeno del mismo que se une a una porción de la secuencia de aminoácidos:

GGFYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIP (SEQ ID NO: 76) desde el resto de aminoácido 212 hasta el resto de aminoácido 25' de OPGbp (proteína de unión a osteoprotegerina) humana, en donde el anticuerpo po el dominio de unión a antígeno del mismo inhibe la formación o activación de osteoclastos mediada por OPGbp humana.

60

2. Un anticuerpo monoclonal o un dominio de unión a antígeno del mismo de la realización 1, que se une a la secuencia de aminoácidos DLATE en la SEQ ID NO: 76.

65

3. El anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2, que es un anticuepro o un dominio de unión a antígeno recombinante.

4. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno quimérico.
5. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno humanizado.
- 5 6. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno completamente humano.
7. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno monocatenario.
8. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno biespecífico.
- 10 9. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2, que es un fragmento del mismo.
10. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de la realización 9, en donde el fragmento se selecciona entre Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv.
- 15 11. Un método para producir el anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de la realización 1 o 2 que comprende cultivar una célula hospedadora que expresa el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno y recuperar el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno a partir del medio de cultivo o a partir de la célula hospedadora.
12. El método de la realización 11, en donde la célula hospedadora es una célula eucariota.
- 20 13. El método de la realización 11, en donde la célula hospedadora es una célula procariota.
14. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Uso de un anticuerpo monoclonal o un dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la formación o activación de osteoclastos.
- 25 16. Uso de un anticuerpomonoclonal o un dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la resorción ósea.
17. Uso de un anticuerpo monoclonal o un dominio de unión a antígeno del mismo de las realizaciones 1 o 2 para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar la pérdida de masa ósea.
- 30 18. El uso de la realización 17, en donde la pérdida de masa ósea es el resultado de la osteoporosis, la metástasis del cáncer al hueso; artritis reumatoide, hipercalcemia por neoplasia y osteoporosis inducida por esteroides.
19. El uso de la cualquiera de las realizaciones 15 a 18, en donde se administra además una composición que comprende al menos un agente contra la resorción ósea.
- 35 20. El uso de la realización 19, en donde el agente contra la resorció es estrógeno, un bisfosfonato, o un modulador selectivo de los receptores de estrógenos.
21. El uso de cualquiera de las realizaciones 15 a 18, en donde se administra además una composición que comprende un agente anabólico para el hueso.
22. El uso de la realización 21, en donde el agente anabólico es la hormona paratiroidea o un complejo de factor de crecimiento insulínico y proteína de unión al factor de crecimiento insulínico.
- 40 23. El uso de cualquiera de las realizaciones 15 a 18, en donde se administran además un inhibidor de interleucina 1 o un inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa.

Puede prepararse un anticuerpo inmunizando a un animal con OPGbp, tal como OPGbp murina o humana, preferentemente OPGbp humana, o con un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo. Además, puede inmunizarse a un animal con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica OPGbp, de tal forma que la OPGbp se expresa y se asocia con la superficie de las células transfectadas. Como alternativa, pueden obtenerse agentes de unión selectivos que son anticuerpos mediante exploración de una biblioteca que comprende secuencias de anticuerpo o de dominio de unión a antígeno respecto de la unión a OPGbp. Dicha biblioteca se prepara de manera conveniente en bacteriófagos en forma de proteínas o fusiones peptídicas a una proteína de la envuelta de bacteriófagos que se expresan en la superficie de partículas de fago ensambladas y las secuencias de ADN codificantes contenidas dentro de las partículas de fago (denominadas "bibliotecas de presentación en fagos"). En un ejemplo, una biblioteca presentada en fagos contiene secuencias de ADN que codifican anticuerpos humanos, tales como cadenas variables ligeras y pesadas.

Los agentes de unión selectivos que son anticuerpos o dominios de unión a antígeno pueden ser glucoproteínas tetraméricas similares a los anticuerpos nativos o pueden ser anticuerpos monocatenarios; fragmentos Fv, Fab, Fab' o F(ab)', anticuerpos biespecíficos, heteroanticuerpos, u otros fragmentos, variantes o derivados de los mismos, que son capaces de unirse a OPGbp y neutralizar completa o parcialmente la actividad de OPGbp. Los anticuerpos o los dominios de unión a antígeno pueden producirse en líneas celulares de hibridoma (células productoras de anticuerpos, tales como células del bazo fusionadas a células de mieloma de ratón, por ejemplo) o pueden producirse en líneas celulares heterólogas transfectadas con moléculas de ácido nucleico que codifican dicho anticuerpo o dominio de unión a antígeno.

Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la invención puede comprender:

65

- (a) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada Fab tal como se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 51) o figura 10 (SEQ ID NO: 53);
 (b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácidos conservativas de la secuencia del punto (a);
 5 (c) una secuencia de aminoácido de cadena pesada que es idéntica en al menos aproximadamente un 80% a la secuencia del punto (a); o
 (d) un fragmento o derivado de (a), (b) o (c);

en donde el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno se une de manera selectiva a OPGbp.

10 En otra realización, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno, tal como se define en la reivindicación 1, puede reconocer un epítipo en OPGbp humana reconocido por un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de Fab tal como se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 51) o la figura 10 (SEQ ID NO: 53) y una secuencia de aminoácidos ligera de Fab, tal como se muestra en la figura 5
 15 (SEQ ID NO: 43) o la figura 6 (SEQ ID NO: 45). También se proporciona un anticuerpo anti-OPGbp o un dominio de unión a antígeno que reconoce a un epítipo DE en OPGbp.

En otra realización, un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1 comprende una cadena V_l y V_h :

20 en donde cada cadena V_l comprende secuencias de aminoácidos de CDR denominadas CDR1(V_l), CDR2(V_l) y CDR3 (V_l), separadas por secuencias de aminoácido estructurales, seleccionándose la CDR1(V_l) del grupo que consiste en:

25 RASQSSISRYLN (SEQ ID NO: 01);
 RASQSVGSYLA (SEQ ID NO: 02);
 RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO: 03); y
 SGDALPKQY (SEQ ID NO: 04)

30 seleccionándose la CDR2(V_l) del grupo que consiste en:

GASSLQS (SEQ ID NO: 05);
 DATNRAT (SEQ ID NO: 06);
 35 GASSRAT (SEQ ID NO: 07); y
 EDSERPS (SEQ ID NO: 08);

y seleccionándose la CDR3(V_l) del grupo que consiste en:

40 QHTRA (SEQ ID NO: 09);
 QHRRT (SEQ ID NO: 10);
 QQYGA (SEQ ID NO: 11); y
 QSTDSSGTYVV (SEQ ID NO: 12);

seleccionándose las CDR1(V_l), CDR2(V_l) y CDR3(V_l) independientemente entre sí; y

45 en donde cada cadena V_h comprende secuencias de aminoácido CDR denominadas CDR1(V_h), CDR2(V_h) y CDR3(V_h), separadas por secuencias de aminoácido estructurales, en donde la CDR1(V_h) del grupo que consiste en:

50 NYAIH (SEQ ID NO: 13);
 NYPMH (SEQ ID NO: 14); y
 DYAMH (SEQ ID NO: 15);

seleccionándose la CDR2 (V_h) del grupo que consiste en:

55 WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16);
 VISYDGNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 17); y
 GISWNSGRIGYADSVKG (SEQ ID NO: 18);

seleccionándose la CDR3 (V_h) del grupo que consiste en:

60 DSSNMVIRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);
 GGGGFDY (SEQ ID NO: 20); y
 GGSTSARYSSGWYY (SEQ ID NO: 21);

65 seleccionándose las CDR1(V_h), CDR2(V_h) y CDR3(V_h) independientemente entre sí.

En otra realización, un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno según la reivindicación 1 comprende una cadena V_l y V_h , en donde:

5 la cadena V_l comprende la CDR1 que tiene la secuencia RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01), la CDR2 que tiene la secuencia GASSLQS (SEQ ID NO: 5) y la CDR3 que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09); y la cadena V_h comprende la CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), la CDR2 que tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y la CDR3 que tiene la secuencia DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);
 10 en donde las CDR1, CDR2 y CDR3 en cada cadena V_l y V_h están separadas por secuencias de aminoácidos estructurales.

Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno de la invención se derivan de secuencias de ácido nucleico de línea germinal presentes en ADN genómico que codifican secuencias de aminoácido de cadena pesada y ligera. Los anticuerpos están codificados por secuencias de ácido nucleico que son los productos del reordenamiento de la secuencia de línea germinal y de la mutación somática.

En una realización, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la invención comprende una cadena V_l y V_h en donde la cadena V_l comprende una variante reordenada o somática de los genes de línea germinal V_{h1} , tal como se representa en la figura 19 (SEQ ID NO: 66); y la cadena V_h comprende una variante reordenada o somática de genes de línea germinal V_{h1} , tal como se representa en la figura 16 (SEQ ID NO: 59); y el anticuerpo se une selectivamente a un polipéptido OPGbp.

En otra realización, la cadena V_l comprende una variante reordenada o somática de un gen de línea germinal V_{k3} tal como se representa en la figura 20 (SEQ ID NO: 68) y la cadena V_h comprende una variante reordenada o somática de genes de línea germinal V_{h1} tal como se representa en la figura 16 (SEQ ID NO: 59).

En otra realización, la cadena V_l comprende una variante reordenada o somática de un gen de línea germinal V_{k3} tal como se representa en la figura 21 (SEQ ID NO: 70) y la cadena V_h comprende una variante reordenada o somática de genes de línea germinal V_{h3} tal como se representa en la figura 17 (SEQ ID NO: 62).

En otra realización, la cadena V_l comprende una variante reordenada o somática de un gen de línea germinal V_{13} tal como se representa en la figura 22 (SEQ ID NO: 72) y la cadena V_h comprende una variante reordenada o somática de genes de línea germinal V_{h3} tal como se representa en la figura 18 (SEQ ID NO: 64).

35 Los agentes de unión selectivos de la invención (anticuerpo o dominio de unión a antígeno) inhiben parcial o completamente al menos una actividad de OPGbp, tal como la unión de OPGbp a ODAR, la formación o activación de osteoclastos o la resorción ósea mediada por OPGbp, y se utilizan para prevenir y/o tratar enfermedades óseas. En una realización, se administra un antagonista de OPGbp, tal como un anticuerpo o dominios de unión a antígeno, a un animal que ha padecido pérdida de masa ósea o se encuentra en riesgo de perder masa ósea para prevenir y/o
 40 tratar la pérdida de masa ósea. Puede usarse un antagonista de OPGbp para prevenir y/o tratar la osteoporosis, la pérdida de masa ósea debida a metástasis del cáncer al hueso; la pérdida de masa ósea debida a la artritis reumatoide, hipercalcemia por neoplasia y osteoporosis inducida por esteroides.

Asimismo, se proporcionan composiciones que comprenden los anticuerpos o dominios de unión a antígeno de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las figuras

50 La figura 1 presenta un ensayo ELISA de patrones Fab predominantes para reactividad con OPGbp [143-317] humana. Se llevaron a cabo valoraciones utilizando un máximo de 50 μ l de solución de fago por pocillo para dar un intervalo típico de 10^9 - 10^{11} fagos/pocillo en el ensayo ELISA. Se prepararon reservas de fagos para ELISA tal como se describe en el ejemplo 1. Los valores fueron de determinaciones en un solo punto. Los patrones "AB" y "X" fueron superpuestos en la misma línea.

55 En la figura 2 se muestra la inhibición de la unión de OPGbp a ODAR mediante Fabs "AT" y "Y". Se purificaron Fabs tal como se ha descrito en el ejemplo 4 y se añadieron a concentraciones de pocillo finales, que se muestran en la figura. Los detalles del ensayo de unión OPGbp/ODAR se exponen en el ejemplo 1. Los valores fueron las medias de determinaciones por duplicado.

60 La figura 3 muestra los ensayos de la médula ósea de Fabs "AT" "Y" y "P". Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada Fabs "AT", "Y" y "P". Se purificaron las Fabs tal como se describe en el ejemplo 4 y se añadieron a las diluciones de pocillo finales que se indican en la figura (las soluciones de reserva de Fab fueron de 750 μ g/ml a 1 mg/ml). El formato de ensayo incluye una incubación previa de 1 hora del Fab anti-hu-OPGbp con 10 ng/ml de concentración final de células por pocillo de OPGbp
 65 [143-317] humana. Los valores fueron las medias de determinaciones por triplicado.

La figura 4 muestra los ensayos de célula RAW de Fabs "AT", "Y" y "P". Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada Fabs "AT", "Y" y "P". Se purificaron los Fabs tal como se describe en el ejemplo 4. Se incubaron previamente las Fabs con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de una dilución 1/20 hasta la concentración final de células por pocillo que se muestra en el gráfico. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml. La concentración de células fue 1×10^5 /ml. Los valores fueron de determinaciones por triplicado con barras de error que designan 2 desviaciones típicas (2 STD).

La figura 5 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido de Fab "AT" de cadena ligera.

La figura 6 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "Y" de cadena ligera.

La figura 7 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "P" de cadena ligera.

La figura 8 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "S" de cadena ligera.

La figura 9 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "AT" de cadena pesada.

La figura 10 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "Y" de cadena pesada.

La figura 11 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "P" de cadena pesada.

La figura 12 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "S" de cadena pesada.

La figura 13 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido Fab que se presentan en las figuras 5-12. Se compararon las secuencias de aminoácido previstas de Fabs de cadena ligera y pesada "AT", "Y", "P" y "S" en cuanto a la identidad y la similitud. Las cadenas pesadas "AT" y "Y" difieren solamente en una posición de aminoácido. Como biblioteca designada, las cuatro Fabs tienen regiones CH1 de cadena pesada idénticas que comprendían la mitad carboxi de la cadena pesada que se incluyen en los cálculos de identidad y similitud. Las cadenas ligeras "AT", "Y" y "P" comparten las mismas familias V kappa, o similares, y por lo tanto difieren solamente en 1 a 2 aminoácidos en la mitad carboxilo de la cadena, que se incluye en los cálculos.

La figura 14 muestra una comparación de las regiones que determinan complementariedad (CDRs) de cadena pesada y ligera previstas de Fabs "AT", "Y", "P" y "S". Para las comparaciones de cadena pesada, CDR1 incluye restos de aminoácidos 32-36 inclusive para todas las Fabs; CDR2 incluye restos de aminoácidos 51-67 inclusive para todas las Fabs; y CDR3 incluye restos de aminoácidos 100-116 inclusive para todas las Fabs "AT" y "Y", 100-106 inclusive para Fab "P" y 100-113 inclusive para Fab "S". Para las comparaciones de cadena ligera, CDR1 incluye restos de aminoácidos 29-39 inclusive para Fabs "AT" y "Y", 28-39 inclusive para Fab "P" y 27-35 inclusive para Fab "S"; CDR2 incluye restos de aminoácidos 55-61 inclusive para Fabs "AT", "Y" y "P" y 53-59 inclusive para Fab "S"; y CDR3 incluye restos de aminoácidos 94-98 inclusive para Fabs "AT", "Y" y "P" y 92-102 inclusive para Fab "S".

La figura 15 muestra una comparación de las clases de Fab. La comparación de clases de Fab se obtuvo a partir de un análisis PLOT ADN Base-V. El símbolo (*) indica que la región (D) de diversidad de emparejamiento más cercana, aunque relacionada con las secuencias de líneas germinales conocida no pudo determinarse. El símbolo (**) indica que la secuencia de la región (V) variable de línea germinal de la pareja más próxima ha sido identificada pero no denominada formalmente hasta la fecha, siendo de la familia lambda más rara.

La figura 16 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada Fab "AT" y "Y" previstas (Restos 2-127 inclusive en las figuras 9 y 10, respectivamente) con una secuencia de la línea germinal de la familia VH1. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 1-03, la secuencia de la región D 3-10 y la secuencia de la región J JH4 (SEQ ID NO: 44). FR1, FR2 y FR3 designan las tres regiones marco conservadas, CDR1, CDR2, y CDR3 designan las tras regiones determinantes de la complementariedad, y H1, H2 y H3 designan las secuencias de unión correspondientes entre las regiones marco conservadas y CDRs. Las diferencias entre "AT", "Y" y las secuencias de línea germinal V, D o J están en negrita. El número de restos de aminoácidos de línea germinal en las figuras 16-22 es como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. U.S. Department of Health and Human Services, 4ª ed. (1991).

La figura 17 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada "P" previstas (Restos 2-117) inclusive en la figura 11) con una secuencia de línea germinal de la familia VH3. La secuencia comprende la secuencia de la región V 3-30 y La secuencia JH4 de la región J. La secuencia de la región D es desconocida.

En la figura 18 se muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada Fab "S" previstas (Restos 2-124 inclusive en la figura 12) con una secuencia de la línea germinal de la familia VH3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 3-09, la secuencia de la región D 6-19 y la secuencia de las regiones J JH4.

La figura 19 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab "AT" prevista (Restos 6-108 inclusive en la figura 5) con una secuencia de línea germinal de la familia $\text{V}\kappa\text{1}$. La secuencia de línea germinal comprende la secuencia de la región V 012 y la secuencia de la región J JK1.

5 La figura 20 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab "Y" prevista (Restos 6-108 inclusive en la figura 6) con una secuencia de la línea germinal de la familia $\text{V}\kappa\text{3}$. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V L6 y la secuencia de la región J JK2.

10 La figura 21 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab "P" prevista (Restos 5-108 inclusive en la figura 7) con una secuencia de línea germinal de la familia $\text{V}\kappa\text{3}$. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V A27 y la secuencia de la región J JK4.

15 La figura 22 muestra una comparación de una secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab "S" prevista (Restos 5-112 inclusive en la figura 8) con una secuencia de línea germinal de la familia VL3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 3m y la secuencia de la región J JL2.

20 La figura 23 muestra ensayos de células RAW de aislados "AT" 405, "AT" 406 y "AT" 407. Se fusionó ADNc que codificaba Fab "AT" con ADNc que codificaba las regiones CH1, CH2 y CH3 de IgG1 humano, tal como se describe en el ejemplo 7. Se utilizaron diferentes secuencias líder para producir los aislados resultantes designados "AT" 405, "AT" 406 y "AT" 407. Se incubaron previamente "AT" 405-407 con OPGbp durante 1 hora, a temperatura ambiente antes de la dilución hasta la concentración final de péculas por pocillo que se muestra en el gráfico. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 40 ng/ml. Los valores fueron de determinaciones por triplicado con barras de error que designaban desviaciones típicas 2 (2 STD).

25 La figura 24 muestra los ensayos de la médula ósea de "AT" 405 y "AT" 407. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU /ml o menos) de "AT" 405 y "AT" 407. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp humana [143-317] durante 1 hora a la temperatura ambiente antes de la adición a las células. La dilución de células final por pocillo para "AT" 405 y "AT" 407 desde la reserva de muestra se indica en el eje de las X. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml.

30 La figura 25 muestra un ensayo de médula ósea de "AT" 406. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de "AT" 406. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración final de células por pocillo de la muestra se indica en el eje de las x. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml.

35 La figura 26 muestra un ensayo de médula ósea de "S" 435 y "Y" 429. La construcción de "S" 435 e "Y" 429 se describen en el ejemplo 7. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU /ml o menos) de cada "S" 435 y "Y" 429. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición de las células. La concentración por pocillo de las células final de la muestra se indica en el eje de las x. La concentración de células por pocillo final de OPGbp fue 20 ng/ml.

40 La figura 27 presenta un ensayo de médula ósea de "Y" 442 y "P" 444. La construcción y expresión de "Y" 442 y "P" 444 se describe en el ejemplo 7. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada "Y" 442 y "P" 444. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración final de células por pocillo se muestra en el eje de las x. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml.

45 La figura 28 presenta el ácido nucleico y la secuencia de aminoácido de OPGbp/DE [153-136] FLAG-murino.

50 La figura 29 es un alineamiento de secuencias de aminoácido OPGbp [143-317] humana, OPGbp murino [158-316] y OPGbp FLAG-murino [158-316]/DE en la región del bucle DE. Se subrayan los restos de aminoácidos de OPGbp humana introducidos en OPGbp de ratón para genera la molécula OPGbp/DE FLAG-ratón.

55 La figura 30 es un inmunoensayo de enzima en el que se examina la unión y reactividad del anticuerpo AT a placas recubiertas con OPGbp [143-317] humana, OPGbp [158-316] murina o OPGbp [158-316]/DE FLAG-murina.

60 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a OPGbp, de tal forma que bloquea parcial o completamente la unión de OPGbp a su receptor afín e inhibe parcial o completamente la formación de osteoclastos y/o la resorción ósea.

65 El término "agente de unión selectivo" se refiere a una molécula que se une preferentemente a OPGbp. Un agente de unión selectivo puede incluir una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido o un compuesto de

bajo peso molecular. En una realización preferida, un agente de unión selectivo es un anticuerpo, tal como anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos CDR-injertados, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) para anticuerpos que se pueden etiquetar en forma soluble o ligada, así como fragmentos, regiones o derivados de los mismos, obtenidos mediante técnicas conocidas, entre las que se incluyen, sin limitarse sólo a ellas, escisión enzimática, síntesis peptídica o técnicas recombinantes. Los agentes de unión selectivos anti-OPGbp de la presente invención pueden unirse a porciones de OPGbp que inhiben la unión de OPGbp a receptores ODAR.

Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno de la invención se unen selectivamente a OPGbp, es decir, se unen preferentemente a OPGbp con una mayor afinidad de unión que a otros antígenos. Los anticuerpos se pueden unir selectivamente a OPGbp humana, pero también se unen de forma detectable a OPGbp no humana. Como alternativa, los anticuerpos se pueden unir exclusivamente a OPGbp humana, sin unión detectable a OPGbp no humana.

El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido desde una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, en donde el anticuerpo monoclonal reconoce típicamente un solo epítipo en el antígeno. El término “monoclonal” no está limitado a un método en particular para la obtención de un anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden obtener según el método de hibridoma descrito en Kohler et al., Nature 256, 495 (1975) o se pueden aislar a partir bibliotecas de fagos empleando las técnicas que se describen en el presente documento, por ejemplo.

El término “dominio de unión a antígeno” o “región de unión a antígeno” se refiere a la porción de una molécula de anticuerpo que contiene los restos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad por el antígeno. Preferentemente, la región de unión a antígeno será de origen humano. En otras realizaciones, la región de unión a antígeno puede derivarse de otras especies animales, en particular roedores, tales como conejos, ratas o hámster.

El término “epítipo” se refiere a la porción de cualquier molécula que puede ser reconocida y unirse al agente de unión selectivo (tal como un anticuerpo) en una o más de las regiones de unión a antígeno del agente de unión. Los epítipos consisten normalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se entiende por epítipo de “inhibición y/o neutralización” un epítipo que cuando se une mediante un agente de unión selectivo, da como resultado la pérdida de actividad biológica de la molécula o el organismo que contiene el epítipo, *in vivo*, *in vitro*, o *in situ*, más preferiblemente *in vivo*, incluyendo la unión de OPGbp a su receptor.

El término “cadena ligera”, cuando se utiliza haciendo referencia a un anticuerpo, se refiere a dos tipos diferentes, denominados kappa (κ) o lambda (λ) en función de la secuencia de aminoácido de los dominios constantes.

El término “cadena pesada” cuando se utiliza haciendo referencia a un anticuerpo se refiere a cinco tipos distintos, denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, en función de la secuencia de aminoácido del dominio constante de cadena pesada. Estos tipos diferentes de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases diferentes de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases de IgG, en concreto IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere a una porción de las cadenas ligera y pesada, típicamente, de aproximadamente 120 a 130 aminoácidos amino-terminales en la cadena pesada y de aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, que difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en las regiones denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), mientras que las regiones más altamente conservadas en el dominio variable reciben el nombre de regiones marco conservadas (FR). Las CDR de las cadenas ligeras y pesadas son las responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno.

El término “región constante” o “dominio constante” se refiere a una porción carboxi terminal de la cadena ligera o pesada que no participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero que presenta varias funciones efectoras, tales como interacción con el receptor Fc.

El término “OPGbp” o “polipéptido de OPGbp” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido tal como se representa en la figura 4 de la publicación PCT WO /46757, y polipéptidos relacionados. Entre los polipéptidos relacionados se incluyen variantes alélicas; variantes de corte y empalme; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, supresión e inserción; polipéptidos de fusión y homólogos de interespecie. Asimismo, entran dentro de la definición formas solubles de OPGbp, tal como los Restos 69-317 inclusive de OPGbp humana (tal como se enumera en el documento WO 98/46757), o un subgrupo de los mismos que es suficiente para generar una respuesta inmunológica. En una realización, la OPGbp humana soluble incluye los restos 140-317 inclusive, 143-317 inclusive, o los fragmentos inmunogénicos de los mismos. OPGbp puede ser un polipéptido maduro, tal como se define en el presente documento, y puede tener o no un resto metionina amino terminal,

dependiendo del método mediante el que se prepara.

El término “fragmento”, cuando se utiliza en relación con OPGbp o un agente de unión selectivo proteínico de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Dicho fragmento puede producirse, por ejemplo, por truncado en el extremo amino, un truncado en el extremo carboxi, y/o una supresión interna de un resto(es) desde la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos pueden ser el resultado de corte y empalme de ARN alternativo y de la actividad *in vivo* de proteasa.

El término “variante” cuando se utiliza en relación con OPGbp o en relación con un agente de unión selectivo proteínico de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de secuencia de aminoácido en comparación con la secuencia nativa o sin modificar. Por ejemplo, una variante de OPGbp puede ser el resultado de uno o más cambios en la secuencia de aminoácido de la OPGbp nativa. También a modo de ejemplo, una variante de un agente de unión selectivo de OPGbp puede ser el resultado de uno o más cambios en la secuencia de aminoácido de un agente de unión selectivo nativo o sin modificar previamente. Las variantes pueden ser naturales, tales como, por ejemplo, variantes alélicas o variantes de corte y empalme, o pueden construirse de forma artificial. Las variantes de polipéptido pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican dichas variantes.

El término “derivado” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteínico de OPGbp se refiere a un polipéptido o péptido, o a una variante, fragmento o derivado del mismo, que ha sido modificado químicamente. Entre los ejemplos se incluyen la unión covalente de uno o más polímeros, tales como, por ejemplo, polímeros hidrosolubles, unidos a N, o carbohidratos unidos a O, azúcares, fosfatos, y/u otras moléculas similares. Los derivados se modifican de manera diferente a la del péptido o polipéptido natural o de partida, o bien en el tipo o bien en la localización de las moléculas unidas. Los derivados incluyen además la supresión de uno o más grupos químicos que están presentes de manera natural en el péptido o polipéptido.

El término “fusión” cuando se utiliza en relación con OPGbp o un agente de unión selectivo proteínico de OPGbp se refiere a la unión de un péptido o polipéptido, o fragmento, variante y/o derivado del mismo, con un péptido o polipéptido heterólogo.

El término “biológicamente activo” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteínico se refiere a un péptido o a un polipéptido que tiene al menos una actividad característica de OPGbp o un agente de unión selectivo. El agente de unión selectivo de OPGbp puede tener una actividad antagonista, o neutralizante o de bloqueo en relación con al menos una actividad biológica de OPGbp.

El término “de origen natural” cuando se utiliza en relación con materiales biológicos, como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras y similares, se refiere a los que se encuentran en la naturaleza y no han sido manipulados por un ser humano.

El término “aislado” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteínico de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que está libre de al menos un polipéptido contaminante que se encuentra en su entorno natural, y preferiblemente sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido de mamífero contaminante que pueda interferir con su uso terapéutico o diagnóstico.

El término “maduro” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteínico de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que carece de una secuencia líder. El término puede incluir también otras modificaciones de un péptido o polipéptido como tratamiento proteolítico del extremo amino (con o sin una secuencia líder) y/o el extremo carboxi, escisión de un polipéptido más pequeño a partir de un precursor mayor, glucosilación ligada a N y/o ligada a O, y similares.

Los términos “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” cuando se utilizan en relación con un agente de unión selectivo de OPGbp se refiere a una cantidad de un agente de unión selectivo que es útil o necesaria para producir un cambio observable en el nivel de una o más de las actividades biológicas de OPGbp. Dicho cambio puede consistir o bien en un aumento o bien en una disminución del nivel de actividad de OPGbp.

El término “sustitución de aminoácidos conservativa” se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido nativo con un resto no nativo de manera que se produce un efecto pequeño o no se produce ningún efecto en la polaridad o la carga del resto de aminoácido en esa posición. Por ejemplo, tiene lugar una sustitución conservativa a partir del reemplazo de un resto no polar en un polipéptido con cualquier otro resto no polar. Por otra parte, puede estar sustituido cualquier otro resto nativo en un polipéptido con una alanina, tal como se ha descrito anteriormente para mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham et al., Science 244, 1081-1085 (1989)). En la tabla I se exponen reglas ilustrativas de sustituciones de aminoácidos conservativas.

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos conservativas		
Restos originales	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferibles
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Las sustituciones de aminoácidos conservativas también abarcan restos de aminoácidos naturales que se incorporan típicamente a través de síntesis química de péptidos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen péptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de restos de aminoácido.

Las modificaciones conservativas de la secuencia de aminoácido (y las modificaciones correspondientes para los nucleótidos codificantes) pueden producir polipéptidos OPGbp (y agentes de unión selectivos proteínicos de los mismos) que tienen características funcionales y químicas similares a las de las OPGbp o los agentes de unión selectivos naturales. En contraste, se pueden conseguir sustanciales modificaciones en las características funcionales y/o químicas de OPGbp (y agentes de unión selectivos proteínicos de las mismas) seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal molecular en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los Restos naturales pueden dividirse en grupos dependiendo de las propiedades de la cadena lateral común:

- 1) Hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;
- 3) Ácidos: Asp, Glu;
- 4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) Restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro, y
- 6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

La "identidad o similitud" de dos o más moléculas y/o polipéptidos de ácido nucleico proporciona una medición del parentesco de dos o más secuencias diferentes. El término "identidad" se refiere a aminoácidos que son idénticos en las posiciones correspondientes en dos secuencias de aminoácido diferentes. El término "similitud" se refiere a aminoácidos que o bien son idénticos o bien son sustituciones conservativas, tal como se han definido anteriormente, en las posiciones correspondientes en dos secuencias de aminoácido diferentes.

El grado de identidad o similitud puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, entre los que se incluyen, pero sin limitación, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G. eds. Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48, 1073 (1988).

Los métodos preferidos para determinar la identidad y/o similitud están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados

en programas informáticos disponibles públicamente. Entre los ejemplos de métodos de programación informáticos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias se incluyen, sin limitarse sólo a ellos, el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). El programa BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al., NCB NLM Bethesda, MD). Se puede utilizar también el conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

Polipéptidos de OPGbp

Los polipéptidos OPGbp, y los fragmentos, variantes y derivados de los mismos, se utilizan como moléculas diana para la exploración y la identificación de los agentes de unión selectivos. Cuando se desea preparar anticuerpos como agentes de unión selectivos, los polipéptidos de OPGbp son preferentemente inmunogénicos, es decir, provocan una respuesta inmune cuando se administran a un animal. Como alternativa, cuando se preparan anticuerpos mediante técnicas *in vitro*, los polipéptidos OPGbp utilizados como moléculas diana son capaces unirse detectablemente a un anticuerpo o dominio de unión a antígeno.

Los polipéptidos OPG se preparan mediante métodos químicos o biológicos. Los métodos biológicos, tales como la expresión de secuencias de ADN que codifican OPGbp recombinante son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente citado). Los métodos de síntesis química, como los que se exponen en Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 (1963), Houghten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82:5132 (1985), y Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) pueden utilizarse también para preparar los polipéptidos de OPGbp. Dichos polipéptidos pueden sintetizarse con o sin metionina en el extremo amino. Los polipéptidos OPGbp sintetizados químicamente, o los fragmentos o variantes de los mismos, pueden oxidarse aplicando los métodos expuestos en los documentos de referencia para formar puentes de disulfuro. Los polipéptidos OPGbp de la invención preparados mediante síntesis química tendrán al menos una actividad biológica comparable con los polipéptidos OPGbp correspondientes producidos mediante métodos recombinantes o purificados a partir de fuentes naturales.

Los polipéptidos de OPGbp pueden obtenerse por aislamiento a partir de muestras biológicas tal como tejidos y/o fluidos de origen en los que se encuentran los polipéptidos de OPGbp de forma natural. Las fuentes para los polipéptidos de OPGbp pueden ser de origen humano o no humano. El aislamiento de los polipéptidos de OPGbp naturales puede llevarse a cabo aplicando los métodos conocidos en la técnica, tales como separación por electroforesis seguida de electroelución, diversos tipos de cromatografía (afinidad, inmuoafinidad, tamices moleculares y/o intercambio iónico) y/o cromatografía de líquidos a alta presión. La presencia del polipéptido de OPGbp durante la purificación puede controlarse utilizando, por ejemplo, un anticuerpo preparado contra el polipéptido de OPGbp producido de manera recombinante, o fragmentos de péptido del mismo.

Los polipéptidos incluyen polipéptidos de OPGbp aislados y polipéptidos relacionados con los mismos, incluyendo fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión y derivados, tal como se han definido anteriormente en el presente documento. Los fragmentos de OPGbp de la invención pueden ser el resultado de truncamientos en el extremo amino (con o sin una secuencia líder), truncamientos en el extremo carboxi y/o supresiones internas en el polipéptido. Dichos fragmentos de polipéptido de OPGbp pueden comprender opcionalmente un resto metionina en el terminal amino. Los polipéptidos de la invención serán inmunogénicos en el sentido de que serán capaces de provocar una respuesta de anticuerpo.

Las variantes de polipéptido de OPGbp de la invención pueden incluir una o más sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácidos, en comparación con la secuencia de aminoácido OPGbp nativa. Las sustituciones de aminoácido pueden ser conservativas, tal como se han definido antes, o no conservativas o cualquier combinación de las mismas. Las variantes pueden tener adiciones de restos de aminoácidos en el extremo carboxi o en el extremo amino (pudiendo comprender o no el extremo amino una secuencia líder). Entre las variantes de glucosilación de OPGbp se incluyen variantes en las que el número y/o el tipo de sitios de glucosilación ha sido alterado en comparación con un polipéptido de OPGbp nativa. Las variantes de glucosilación OPGbp pueden comprender un número mayor o menor de sitios de glucosilación unidos en N en comparación con OPGbp nativa. Se proporcionan también variantes de glucosilación de OPGbp que comprenden un reordenamiento de cadenas de carbohidrato unidas en N en las que se eliminan uno o más sitios de glucosilación ligados en N (típicamente los que se dan de forma natural) y se crean uno o más nuevos sitios ligados en N. Las variantes de cisteína de OPGbp comprenden un mayor número o, como alternativa un menor número de restos de cisteína en comparación con OPGbp nativa. En una realización, se suprimen o se sustituyen con otro aminoácido uno o más restos de cisteína (por ejemplo, serina). Las variantes de cisteína de OPGbp pueden mejorar la recuperación de la OPGbp biológicamente activa favoreciendo replegamiento de OPGbp en una conformación biológicamente activa tras el aislamiento a partir de un estado desnaturalizado.

La preparación de variantes de polipéptido de OPGbp se encuentra dentro del nivel de especialización en este campo. En una estrategia, se pueden introducir una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácidos en OPGbp nativa, reteniendo la variante OPGbp la estructura nativa de OPGbp y/o al menos una de las actividades

biológicas. Una estrategia consiste en comparar secuencias de polipéptidos de OPG a partir de una variedad de diferentes especies con el fin de identificar regiones con una identidad y/o similitud relativamente alta y baja. Puede apreciarse que las regiones de un polipéptido OPGbp que tienen una identidad y/o similitud relativamente baja tienen menor probabilidad de ser esenciales para la estructura y actividad y por tanto pueden ser más tolerantes a las alteraciones de aminoácidos, especialmente, las que no son conservativas. Debe apreciarse asimismo que incluso en regiones relativamente conservadas, se pueden introducir sustituciones de aminoácidos conservativas al mismo tiempo que se retiene la actividad.

En otra estrategia, se pueden utilizar las relaciones estructura-función para identificar restos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. Por ejemplo, se pueden comparar los restos de aminoácidos conservados entre OPGbp y otros miembros de la familia de factor de necrosis tumoral para los cuales están disponibles análisis de estructura-función y, en función de dicha comparación, predecir qué restos de aminoácidos en OPGbp son importantes para la actividad o la estructura. Los expertos en la materia podrán elegir sustituciones de aminoácidos similares químicamente para dichos restos de aminoácidos importantes de OPGbp previstos.

En otra estrategia más, se puede llevar a cabo un análisis de una estructura secundaria o terciaria de OPGbp (ya sea determinada por difracción de rayos x de cristales de OPGbp o por métodos de predicción de estructura) para determinar la localización de restos de aminoácidos específicos en relación con estructuras reales o predichas dentro de un polipéptido OPGbp. Empleando esta información, se pueden introducir cambios de aminoácido de un modo que busque retener lo más posible la estructura secundaria y/o terciaria de un polipéptido de OPGbp.

En otra estrategia más, se pueden analizar los efectos de la alteración de aminoácidos en posiciones específicas de forma experimental introduciendo sustituciones de aminoácidos y analizando los polipéptidos de OPGbp alterados para determinar la actividad biológica utilizando los ensayos descritos en el presente documento. Las técnicas como la mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham et al., anteriormente citado) son particularmente adecuadas para este método. Se pueden analizar convenientemente muchas secuencias alteradas introduciendo muchas sustituciones en diversas posiciones de aminoácidos en la OPGbp y realizando la exploración de la población de polipéptidos alterados como parte de la biblioteca de presentación en fagos. Utilizando esta estrategia, se pueden determinar fácilmente las regiones de un polipéptido de OPGbp que son esenciales para la actividad.

Los métodos anteriores son útiles para generar variantes de OPGbp que retienen la estructura nativa. Por consiguiente, los anticuerpos producidos contra estas variantes tienen probabilidades de reconocer un determinante estructural nativo, o epítipo, de OPGbp y también tienen probabilidades de unirse a OPGbp nativa. No obstante, en algunos casos, puede ser deseable producir variantes de OPGbp que no retienen la estructura de OPGbp nativa o que quedan sin rellenar parcial o completamente. Los anticuerpos producidos contra dichas proteínas reconocerán epítopos enterrados en OPGbp.

La invención ilustra también polipéptidos de fusión de OPGbp que comprenden polipéptidos de OPGbp, y fragmentos, variantes y derivados de los mismos, fusionados con una proteína o péptido heterólogo. Las proteínas y péptidos heterólogos incluyen, sin limitarse sólo a ellos, un epítipo que permite la detección y/o aislamiento de un polipéptido de fusión de OPGbp; una proteína de receptor de transmembrana o una porción del mismo, tal como un dominio extracelular, o un dominio transmembrana y uno intracelular; un ligando o una porción del mismo que se une a una proteína de receptor transmembrana; una enzima o una porción de la misma que es catalíticamente activa; un proteína o péptido que promueve la oligomerización, como un dominio de cremallera de leucina; y una proteína o péptido que aumenta la estabilidad, tal como una región constante de inmunoglobulina. Se puede fusionar un polipéptido de OPGbp consigo mismo o con un fragmento, variante o derivado del mismo. Las fusiones pueden realizarse o bien en el extremo amino o bien en el extremo carboxi de un polipéptido de OPGbp, y pueden ser directas sin molécula ligadora o adaptadora o pueden ser a través de una molécula ligadora o adaptadora. Puede designarse una molécula ligadora o adaptadora también con un sitio de escisión para una endonucleasa de restricción de ADN o para una proteasa para permitir la separación de los restos fusionados.

Se puede fusionar un polipéptido, fragmento, variante y/o derivado de OPGbp con una región Fc de IgG humana. En un ejemplo, se puede fusionar una región bisagra, CH2 y CH3 de IgG humana tanto en el extremo N como en el extremo C de los polipéptidos de OPGbp aplicando los métodos conocidos por los expertos en la materia. En otro ejemplo, se pueden fusionar una porción de una región bisagra y las regiones CH2 y CH3. El polipéptido de fusión Fc OPGbp producido de este modo puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A. Por otra parte, se ha observado que los péptidos y proteínas fusionadas con una región Fc presentan una semivida sustancialmente mayor *in vivo* en relación con su contrapartida sin fusionar. Asimismo, una fusión con la región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc natural, o puede alterarse para mejorar determinadas calidades, tal como calidades terapéuticas, tiempo de circulación, reducir la agregación, etc.

Los derivados de polipéptido de OPGbp son composiciones de polipéptido de OPGbp en las que el polipéptido de OPGbp está unido a un polímero. El polímero seleccionado es típicamente hidrosoluble, de tal forma que la proteína a la que está unido no se precipita en un ambiente acuoso. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y

puede ser ramificado o sin ramificar. Se incluye dentro del alcance de los polímeros de polipéptido de OPGbp una mezcla de polímeros. Para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

5 El polímero hidrosoluble o la mezcla de los mismos puede consistir por ejemplo en polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietoxilenglicol, dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular, por ejemplo, de aproximadamente 6 kD), celulosa y otros polímeros a base de carbohidratos, poli(N-vinilpirrolidona), polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un co-polímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polialcoholes etilados (por ejemplo, glicerol) y un alcohol polivinílico.

10 Un polímero hidrosoluble es polietilenglicol. Tal como se utiliza en el presente documento, se pretende que polietilenglicol abarque cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para formar derivados de otras proteínas, tal como mono-alcoxi(C₁-C₁₀)-, o ariloxi-polietilenglicol. La presente invención abarca asimismo moléculas de reticulación de PEG bifuncionales que se pueden utilizar para preparar multímeros de OPGbp unidos covalentemente.

15 Los métodos para preparar polipéptidos de OPGbp formados por derivación química son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, la formación de derivados de polipéptidos de OPGbp con PEG puede llevarse a cabo utilizando los procedimientos descritos en Francis et al., Focus on Growth Factors, 3, 4-10 (1992); el documento EP 0 154 316; 20 el documento EP 0 401 384; y la Patente de los Estados Unidos n.º 4.179.337. En una realización preferida, un derivado de polipéptido de OPGbp tendrá una sola fracción de PEG en el extremo amino. Véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.234.784.

25 Los derivados de polipéptido de OPGbp descritos en el presente documento pueden presentar una potenciación o reducción de al menos una actividad biológica de OPGbp en comparación con un polipéptido sin modificar, o pueden presentar una mayor o menor semivida o estabilidad.

Agentes de unión selectivos de OPGbp

30 Los polipéptidos de OPGbp, y los fragmentos, variantes y derivados de los mismos, se pueden utilizar para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp. Tal como se ha definido antes, un agente de unión selectivo de OPGbp abarca agentes de unión tanto proteináceos como no-proteináceos, y en una realización preferida de la invención, el agente de unión selectivo es proteináceo. El agente de unión selectivo puede ser un anticuerpo o 35 fragmento del mismo que se une a OPGbp, preferiblemente OPGbp humana. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos antagonistas, que potencian el nivel de al menos una actividad biológica de OPGbp; o anticuerpos antagonistas, que reducen el nivel de al menos una actividad biológica de OPGbp. Los anticuerpos antagonistas de OPGbp también pueden citarse como anticuerpos inhibidores o neutralizantes de OPGbp.

40 Tal como se describe en los ejemplos más adelante, se han identificado anticuerpos y dominios de unión a antígeno de OPGbp que inhiben al menos una actividad de OPGbp. Las realizaciones de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia Fab de cadena pesada, tal como se muestra en cualquiera de las figuras 9, 10, 11 o 12 y que comprenden además una secuencia de cadena ligera kappa o lambda. Las secuencias Fab de cadena ligera pueden ser tal como se representa en las figuras 5, 6, 7, u 8. Por ejemplo, el anticuerpo "AT" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 5 y 9, respectivamente; el anticuerpo "Y" tiene secuencias de cadena ligera 45 y pesada en las figuras 6 y 10, respectivamente; el anticuerpo "S" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 7 y 11, respectivamente; y el anticuerpo "P" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 8 y 12, respectivamente. Los anticuerpos de la invención comprenden además una región Fc humana a partir de un cualquier isotipo, ya sea IgG, IgM, IgA, IgE o IgD. Preferentemente, la región Fc es de IgG humano, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

50 La invención proporciona asimismo anticuerpos y dominios de unión a antígeno, tal como se define en la reivindicación 1, que comprenden fragmentos, variantes, o derivados de la secuencia Fab aquí descrita. Los fragmentos incluyen dominios variables de secuencias Fab de cadena tanto ligera como pesada que se unen típicamente con dominios constantes ligeros y pesados. Las variantes incluyen anticuerpos que comprenden 55 secuencias Fab de cadena ligera que son idénticas o similares en al menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, a las secuencias Fab o los dominios variables correspondientes, en cualquiera de las figuras 5-8, o anticuerpos que comprenden secuencias Fab de cadena pesada, o los dominios variables correspondientes que son idénticos o similares en al menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a las secuencias Fab en cualquiera de las figuras 9 a 12. Los anticuerpos pueden asociarse típicamente con regiones constantes de las cadenas pesada y ligera para formar anticuerpos de longitud completa.

60 Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno, y los fragmentos, variantes y derivados de los mismos, según la invención, tal como se definen en la reivindicación 1, retendrán la capacidad para unirse selectivamente a un polipéptido de OPGbp, preferiblemente a un polipéptido de OPGbp humana. En una realización, un anticuerpo se unirá a un polipéptido de OPGbp con una constante de disociación (KD) de aproximadamente 1 nM o menos, o 65 alternativamente 0,1 nM o menos, o alternativamente 10 pM o menos o alternativamente menos de 10 pM. En el

ejemplo 8, se observó que el anticuerpo "AT" se une a OPGbp con un KD de aproximadamente 0,33 a 0,43 nM.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, recombinantes, quiméricos, humanizados, completamente humanos, monocatenarios y/o biespecíficos. Los fragmentos de anticuerpo incluyen aquellas porciones de un anticuerpo anti-OPGbp que se unen a un epítipo en un polipéptido de OPGbp. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab, F(ab'), F(ab)2, Fv y sFv. Los anticuerpos pueden generarse mediante escisión enzimática de anticuerpos de longitud completa o mediante técnicas de ADN recombinante, tales como expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de anticuerpo.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados con un antígeno. Un antígeno es una molécula o una porción de una molécula que es capaz de unirse mediante un anticuerpo que es capaz adicionalmente de inducir a un animal a producir anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos. Se pretende que la reacción específica antes referida indique que el antígeno reacciona, de una manera altamente selectiva, con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos.

Los anticuerpos policlonales dirigidos hacia un polipéptido de OPGbp son producidos generalmente en animales (por ejemplo, conejos o ratones) a través de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de OPGbp y un adyuvante. De acuerdo con la invención, puede ser útil conjugar un polipéptido de OPGbp, o una variante, fragmento de derivado del mismo con una proteína vehículo que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, tal como hemocianina de lapa californiana, suero, albúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja. Asimismo, se utilizan agentes de agregación como alum para mejorar la respuesta inmune. Tras la inmunización, se sangra a los animales y se realiza el ensayo del suero para determinar la valoración de anticuerpo anti-OPGbp.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) contienen una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, conteniendo dicha población sitios de unión a epítipo sustancialmente similares. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. Se puede cultivar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*. La producción de títulos más elevados *in vivo* o *in situ* es un método de producción preferido.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia OPGbp se producen aplicando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas de células continuas en cultivo. Entre los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales se incluyen los métodos de hibridoma de Kohler et al., *Nature*, 256, 495-497 (1975), y el método de hibridoma de células B humanas, Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Entre los agentes de unión selectivos anti-OPGbp preferidos se incluyen anticuerpos monoclonales que inhiben parcial o completamente la unión de OPGbp humana a su receptor afín, ODAR, o un anticuerpo que tiene sustancialmente las mismas características de unión específicas, así como fragmentos y regiones de los mismos. Los métodos preferibles para determinar especificidad y afinidad del anticuerpo monoclonal mediante inhibición competitiva pueden encontrarse en Harlow et al., *Antibodies; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.*, 92: 589-601 (1983).

También se proporcionan líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con polipéptidos de OPGbp.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas en las que varias porciones diferentes proceden de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable procedente de anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos se utilizan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos de producción, por ejemplo, cuando los anticuerpos monoclonales murinos tienen unos rendimientos más altos a partir de hibridomas pero una mayor inmunogenicidad en seres humanos, tal como humana/murina, se utilizan anticuerpos monoclonales quiméricos.

Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica. Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature*, 312: 643-646 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 314: 268-270 (1985); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 3439-3443 (1987); y Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Por ejemplo, se pueden utilizar los anticuerpos monoclonales quiméricos de la invención como agentes terapéuticos. En dicho anticuerpo quimérico, una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a la secuencia correspondiente en anticuerpos procedentes de una especie concreta o que pertenece a una clase o subclase de

anticuerpos concreta, al mismo tiempo que el resto de la cadena es idéntico u homólogo a la secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (véase la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855 (1985).

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada a través de puentes disulfuro con una cadena L quimérica. El anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H₂L₂) formado por dos dímeros HL asociados a través de al menos un puente disulfuro.
10 Puede producirse también un anticuerpo quimérico polivalente, por ejemplo, empleando una región C_H que se agrega (por ejemplo, procedente de una cadena H o una cadena μ de IgM).

Los anticuerpos, fragmentos y regiones murinos y quiméricos de la presente invención pueden comprender cadenas de inmunoglobulina Ligeras (L) y/o pesadas (H) individuales. Una cadena H quimérica comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena H de un anticuerpo no humano específico para OPGbp, que está unida a al menos una porción de una región C de cadena H humana (C_H), tal como CH₁ o CH₂.

Una cadena L quimérica según la presente invención comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico para OPGbp, unido a al menos una porción de una región C de cadena L humana (C_L).

Los agentes de unión selectivos, tal como anticuerpos, fragmentos, o derivados, que tienen cadenas H y cadenas L quiméricas de la misma o diferentes especificidad de unión a región variable, pueden prepararse también a través de la asociación apropiada de cadenas de polipéptido individuales, con arreglo a etapas de método conocidas, por ejemplo, con arreglo a Ausubel, et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, N.Y. (1993), y Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Con esta estrategia, se cultivan por separado hospedadores que expresan cadenas H quiméricas (o sus derivados) de hospedadores que expresan cadenas L quiméricas (o sus derivados), y se recuperan por separado las cadenas de inmunoglobulina y después se asocian. Como alternativa, se pueden co-cultivar los hospedadores y dejar asociar las cadenas espontáneamente en el medio de cultivo, seguido de la recuperación de la inmunoglobulina ensamblada, fragmento o derivado.

A modo de ejemplo, es preferible que la región de unión a antígeno del agente de unión selectivo (por ejemplo, un anticuerpo quimérico) de la presente invención proceda de un anticuerpo no humano específico para OPGbp humana. Las fuentes preferibles para ADN que codifica dicho anticuerpo no humano incluyen líneas celulares que producen anticuerpos, tal como líneas celulares de híbrido conocidas comúnmente como hibridomas.

La invención proporciona también fragmentos, variantes y derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp, habiéndose definido en el presente documento los términos "fragmentos", "variantes", "derivados" y fusiones". La invención abarca fragmentos, variantes, derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp que son funcionalmente similares a los anticuerpos anti-OPGbp sin modificar, es decir, que retienen al menos una de las actividades del anticuerpo sin modificar. Además de las modificaciones que se han indicado, también se incluye la adición de secuencias genéticas que codifican proteínas citotóxicas, como toxinas vegetales y bacterianas. Los fragmentos, variantes, derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp pueden producirse a través de cualquiera de los hospedadores de la presente invención.

Los fragmentos adecuados incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, desaparecen más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión de tejido no específico que un anticuerpo intacto. Véase Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983). Estos fragmentos se producen a partir de anticuerpos intactos empleando métodos conocidos en la técnica, tal como escisión proteolítica con enzimas como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). La identificación de estas regiones y/o epítomos de unión a antígeno reconocidas por anticuerpos monoclonales de la presente invención proporciona la información necesaria para generar anticuerpos monoclonales adicionales con características de unión similares y utilidad de diagnóstico y terapéutica que tienen parangón con los modos de realización de esta solicitud.

La invención proporciona anticuerpos o dominios de unión a antígeno anti-OPGbp, que reconocen y se unen para inhibir y/o neutralizar epítomos en OPGbp. Como resultado de esta unión, un anticuerpo anti-OPGbp puede inhibir parcial o completamente la unión de OPGbp a su receptor o pueden inhibir parcial o completamente la formación de osteoclastos, la resorción ósea y/o la pérdida de hueso. Más en particular, la invención proporciona anticuerpos anti-OPGbp que reconocen y se unen a un epítomo que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos de la región DE de OPGbp (un "epítomo DE"). Una región DE de OPGbp se extiende aproximadamente por las regiones de lámina D y E beta y la secuencia bucle intermedia (un "bucle DE"). La región DE en OPGbp humana comprende desde aproximadamente el resto de aminoácido 212 hasta aproximadamente el resto de aminoácido 250 inclusive (véase la figura 29).

Aunque se contempla que un anticuerpo anti-OPGbp, o un dominio de unión a antígeno, pueda unirse en cualquier localización dentro de una región DE, una realización preferida es un anticuerpo anti-OPGbp que se une a al menos parte de un bucle DE. El bucle DE en OPGbp humana abarca aproximadamente cinco aminoácidos y está ubicado aproximadamente en los restos 230-234 inclusive. El bucle DE en OPGbp humana tiene la secuencia DLATE. Sin embargo, la secuencia de aminoácido y los extremos del bucle DE de OPGbp humana son únicamente ilustrativos y se entiende que los bucles DE podrían tener secuencias y extremos que varíen respecto de aquellos en OPGbp humana. La invención abarca anticuerpos que se unen a dichos bucles DE variables.

Tal como se muestra en el ejemplo 10, la introducción de la secuencia DLATE en el bucle DE correspondiente de OPGbp murina tuvo como resultado la unión de anticuerpo "AT", mientras que el anticuerpo no tuvo afinidad detectable para OPGbp murina con la secuencia de bucle DE nativa hasta una concentración de anticuerpo de aproximadamente 2 µg/ml. En otra realización, el anticuerpo anti-OPGbp se une a la secuencia de aminoácidos DLATE en OPGbp humana, o a una porción de dicha secuencia. En otra realización, un anticuerpo anti-OPGbp, o dominio de unión a antígeno, se une a OPGbp murino que comprende las sustituciones de aminoácido S229D, V230L, P231A y D233E, pero no se une a OPGbp murina que carece de dichas sustituciones en condiciones similares.

Si bien los anticuerpos de la invención se caracterizan en parte por las secuencias de aminoácido en OPGbp a las que se unen, los expertos en la materia entenderán y apreciarán que un epítipo DE en OPGbp reconocido por un anticuerpo comprende típicamente una estructura tridimensional que puede implicar aminoácidos fuera de la región DE. En una representación lineal de una secuencia OPGbp, los aminoácidos que comprenden el epítipo DE pueden estar distantes de la región DE; pero en una estructura tridimensional de OPGbp, los aminoácidos del epítipo DE estarán probablemente en proximidad con la región DE. Por lo tanto, debe entenderse que la unión de un anticuerpo anti-OPGbp con un epítipo DE puede implicar aminoácidos distintos a los de la región DE. No obstante, se ha demostrado que los restos de aminoácidos en el bucle DE, especialmente algunos o todos los restos de la secuencia DLATE, participan en la unión de anticuerpos a OPGbp y la inhibición de la actividad de OPGbp.

Se proporcionan también las variantes de agentes de unión selectivos. En una realización, las variantes de anticuerpos y dominios de unión a antígeno comprenden cambios en las secuencias de aminoácido de cadena ligera y/o pesada que son naturales o que se introducen por ingeniería *in vitro* de secuencias nativas utilizando técnicas de ADN recombinante. Las variantes naturales incluyen variantes "somáticas" que se generan *in vivo* en las secuencias de nucleótido de línea germinal correspondiente durante la generación de una respuesta de anticuerpo a un antígeno extraño. Las variantes codificadas por mutaciones somáticas en secuencias de cadena ligera y pesada variables de línea germinal que generan los ejemplos de Fab de la presente invención en las secuencias se muestran en las figuras 16 y 19 para Fab "AT", las figuras 16 y 20 para Fab "Y", las figuras 17 y 21 para Fab "P" y las figuras 18 y 22 para Fab "S".

Las variantes para anticuerpos y dominios de unión a antígeno anti-OPGbp también se preparan por técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. En un ejemplo, se puede introducir cambios de aminoácido aleatoriamente en toda la región de codificación de anticuerpo y se puede realizar la exploración de las variantes resultantes para determinar la actividad deseada, tal como afinidad de unión para OPGbp. Como alternativa, se pueden introducir cambios de aminoácidos en regiones seleccionadas de un anticuerpo para OPGbp, tal como CDR de cadena ligera y/o pesada, y regiones marco conservadas, y se puede realizar la exploración de los anticuerpos resultantes para determinar la unión a OPGbp o alguna otra actividad. Los cambios de aminoácido abarcan una o más sustituciones de aminoácido en una CDR, que abarcan desde una sola diferencia de aminoácido y la introducción de todas las permutaciones posibles de aminoácidos dentro de una CDR dada, como CDR3. En otro método, la contribución de cada uno de los restos dentro de una CDR a la unión de OPGbp puede valorarse sustituyendo al menos un resto dentro de la CDR con alanina (Lewis et al., Mol. Immunol. 32, 1065-1072 (1995)). Los Restos que no son óptimos para la unión con OPGbp pueden cambiarse después con el fin de determinar la secuencia más óptima. También quedan abarcadas las variantes generadas por inserción de aminoácidos para aumentar el tamaño de una CDR, tal como CDR3. Por ejemplo, la mayoría de las secuencias CDR3 de cadena ligera son de 9 aminoácidos de longitud. Las secuencias CDR3 de cadena ligera en un anticuerpo que tienen una longitud inferior a nueve Restos pueden optimizarse para la unión con OPGbp a través de la inserción de aminoácidos apropiados para aumentar la longitud de la CDR.

En una realización, las variantes de anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprenden uno o más cambios de aminoácido en una o más de las CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada o ligera y, opcionalmente, una o más de las regiones marco conservadas FR1, FR2 o FR3 de cadena pesada o ligera. Los cambios de aminoácidos comprenden sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de restos de aminoácidos. Entre los ejemplos de variantes se incluye una variante de la región variable de cadena pesada de "AT" con uno o más cambios de aminoácido en la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13); WINAGNGNTIKFSQKFQF (SEQ ID NO: 16); o DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19), o una variante de la región variable de cadena ligera de "AT" con uno o más cambios de aminoácido en las secuencias RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01); GASSLQS (SEQ ID NO: 05); o QHTRA (SEQ ID NO: 09). Las variantes de la región variable de cadena pesada y ligera de "AT" que se han mencionado anteriormente comprenden además uno o más cambios de aminoácido en las regiones marco conservadas. En un ejemplo, se pueden introducir uno o más cambios de aminoácido para sustituir un resto estructural mutado somáticamente con el

resto de línea germinal en esa posición. Cuando los cambios de aminoácido mencionados son sustituciones, los cambios pueden consistir en sustituciones conservativas o no conservativas.

5 Los ejemplos 11 y 12 proporcionan variantes de la región CDR3 de cadena ligera y pesada del anticuerpo AT. En una realización, la invención proporciona variantes tanto en la SEQ ID NO: 19 (CDR3 de cadena pesada) como en la SEQ ID NO: 9 (CDR3 de cadena ligera), de manera que los anticuerpos o los dominios de unión a antígeno resultantes se unen selectivamente a una proteína de unión a OPG. En una realización, la OPGbp es OPGbp humana.

10 La invención proporciona anticuerpos anti-OPGbp, que comprenden cadenas variables pesadas y variables ligeras y que pueden comprender además una región CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

15 XSSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 80);
 DXSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 81);
 DSXNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 82);
 DSSXMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 83);
 DSSNXVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 84);
 20 DSSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 85);
 DSSNMVXGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 86);
 DSSNMVRXIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 87);
 DSSNMVRGBXIIAYYFDY (SEQ ID NO: 88);
 DSSNMVRGBIXIAYYFDY (SEQ ID NO: 89);
 DSSNMVRGBIIXAYYFDY (SEQ ID NO: 90);
 25 DSSNMVRGBIIIYXYFDY (SEQ ID NO: 91);
 DSSNMVRGBIIIAXYFDY (SEQ ID NO: 92);
 DSSNMVRGBIIIAYXFDY (SEQ ID NO: 93);
 DSSNMVRGBIIIAYYXDY (SEQ ID NO: 94);
 DSSNXVRGBIIIAYYFXDY (SEQ ID NO: 95); y
 30 DSSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 96);

en donde X puede ser un resto de aminoácido que es diferente del resto de aminoácido que normalmente se encuentra en esa posición, y en donde el anticuerpo resultante se une de manera selectiva a una OPGbp.

35 La invención proporciona también anticuerpos anti-OPGbp, que pueden comprender cadenas variables pesadas y variables ligeras y que pueden comprender además una secuencia CDR3 de cadena ligera que ha sido aumentada desde cinco aminoácidos hasta nueve aminoácidos. Más en particular, la secuencia CDR3 de cadena ligera puede seleccionarse del grupo que consiste en:

40 QHTXXXXRA (SEQ ID NO: 97)

en donde la primera aparición de X desde la izquierda indica cualquier resto de aminoácido distinto de arginina, las apariciones segunda, tercera y cuarta de X indican cualquier resto de aminoácido, pero preferentemente alanina y en donde el anticuerpo resultante se une de manera selectiva a una OPGbp. En otra realización de la invención, se selecciona una secuencia CDR3 de cadena ligera entre el grupo que consiste en:

QHTXAAARA (SEQ ID NO: 98)

50 en donde X es cualquier resto de aminoácido distinto de arginina.

En otra realización, las variantes de anticuerpo de la invención pueden comprender cadenas V_L que tienen una secuencia CDR1 como en SEQ ID NO: 1 y una secuencia CDR2 como en SEQ ID NO: 5, y pueden comprender cadenas V_H que tienen cadenas V_H que tienen una secuencia CDR1 como en SEQ ID NO: 13 y una secuencia CDR2 como en SEQ ID NO: 16. En otra realización, las variantes de anticuerpo pueden comprender una cadena V_L desde el anticuerpo "AT" con las variantes CDR3 de cadena ligera antes mencionadas y una cadena V_H desde el anticuerpo "AT" con las variantes CDR3 de cadena pesada antes mencionadas. Pueden prepararse variantes también "revolviendo la cadena" tanto de cadenas ligeras como pesadas (Marks et al., *Biotechnology* 10, 779-783 (1992)). Típicamente, se combina una sola cadena ligera (o pesada) con una biblioteca que tiene un repertorio de cadenas pesadas (o ligeras) y se realiza la exploración de la población resultante para una actividad deseada, tal como la unión a OPGbp. Esta técnica permite la exploración de una muestra más grande de diferentes cadenas pesadas (o ligeras) en combinación con una sola cadena ligera (o pesada) con respecto a lo que es posible con bibliotecas que comprenden repertorios tanto de cadenas pesadas como ligeras. Los agentes de unión selectivos de la invención pueden ser biespecíficos. Los agentes de unión selectivos biespecíficos de la presente invención pueden tener varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se parecen a anticuerpos simples (o fragmentos de anticuerpo) pero tienen dos sitios de unión de antígeno diferentes (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante técnicas químicas (véase, por ejemplo, Kranz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 78:5807 (1981), mediante técnicas de "polidoma" (ver Patente de los Estados Unidos n.º 4.474.893 para Reading) o mediante técnicas de ADN recombinante.

Los agentes de unión selectivos de la invención también pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos consisten en dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión a anticuerpo (Fab) unidos en combinación, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

La invención se refiere también a anticuerpos "humanizados". Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado lleva uno o más restos de aminoácidos introducidos en un anticuerpo humano desde una fuente que es no humana. En general, los Restos no humanos estarán presentes en CDRs. La humanización puede llevarse a cabo siguiendo métodos conocidos en la técnica (Jones et al., Nature, 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332, 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239, 1534-1536 (1988)), por sustitución de regiones determinantes de complementariedad de roedores (CDR) por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

Los agentes de unión selectivos de la invención, incluyendo anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados, se pueden producir mediante métodos recombinantes conocidos en la técnica. Se introducen los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos en células hospedadoras y se expresan utilizando los materiales y procedimientos descritos en el presente documento y que se conocen en la técnica. En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células hospedadoras de mamífero, tal como células CHO. Los anticuerpos totalmente humanos se pueden producir a través de la expresión de ADN recombinante transfectado en células hospedadoras o a través de la expresión en células de hibridoma tal como se ha descrito anteriormente.

Las técnicas para crear versiones de ADN recombinante de las regiones de unión a antígeno de las moléculas de anticuerpo que bordean la generación de anticuerpos monoclonales entran dentro del alcance de la práctica de la presente invención. Para hacerlo así, se extraen las moléculas de ARN mensajeras específicas de anticuerpo desde células del sistema inmune tomadas de un animal inmunizado, y se transcriben en ADN complementario (ADNc). El ADNc se clona a continuación en un sistema de expresión bacteriana. Un ejemplo de esta técnica, adecuada para la práctica de la presente invención utiliza un sistema de vector lambda de bacteriofago que tiene una secuencia líder que hace que la proteína Fab expresada se desplace al espacio periplásmico (entre la membrana de célula bacteriana y la pared celular) o que sea secretada. Se puede generar rápidamente y detectar selectivamente un gran número de fragmentos Fab funcionales para los que se une el antígeno. Dichos agentes de unión selectivos de OPGbp (fragmentos Fab que se unen específicamente para un polipéptido OPGbp) entran específicamente dentro del alcance del término "anticuerpo" tal como se ha definido, explicado y reivindicado en el presente documento.

Entran también dentro del alcance de la invención las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos por corte y empalme de genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad para antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada, tal como la capacidad de activar complemento humano y mediar ADCC. (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851 (1984); Neuberger et al., Nature, 312: 604 (1984)). Un ejemplo es el reemplazo de una región Fc con la de un isotipo diferente. Los agentes de unión selectivos, como son los anticuerpos producidos a través de esta técnica, entran dentro del marco de la presente invención.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos anti-OPGbp son anticuerpos completamente humanos. Por consiguiente, entra dentro del alcance de la invención anticuerpos que se unen a polipéptidos de OPGbp y que están codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas naturales de la secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana, y fragmentos, variantes de síntesis, derivados y fusiones de los mismos. Dichos anticuerpos pueden producirse a través de cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Entre los ejemplos de métodos se incluyen inmunización con un antígeno de OPGbp (cualquier polipéptido de OPGbp capaz de provocar una respuesta inmune y, opcionalmente, conjugado con un vehículo) de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7, 33 (1993).

Como alternativa, pueden generarse anticuerpos humanos a través de la exploración *in vitro* de bibliotecas de anticuerpo de despliegue en fago. Véase Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222, 581 (1991), incorporados al presente documento por referencia. Se han descrito diversas bibliotecas de presentación en fagos que contienen anticuerpos, pudiéndolas preparar fácilmente el experto en la materia. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpos humanos, tal como fragmentos Fab, Fv y scFv humanos, cuya exploración puede realizarse contra una diana apropiada. El ejemplo 1 describe la exploración de una biblioteca en fago Fab contra OPGbp para identificar las moléculas que se unen selectivamente a OPGbp. Se podrá apreciar que las bibliotecas de presentación en fagos pueden comprender péptidos o proteínas distintas a anticuerpos que se pueden detectar selectivamente para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp.

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo Id inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético, (por ejemplo, cepa de ratón), como fuente de anticuerpo monoclonal con el anticuerpo monoclonal con el que se está preparando anti-Id. El animal inmunizado reconoce y responde a determinantes idiotípicos del anticuerpo de inmunización produciendo un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.699.880 que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. El anticuerpo anti-Id puede utilizarse también como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo lo que se denomina un anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al anticuerpo monoclonal original que indujo el anti-Id. Por lo tanto, al utilizar anticuerpos para los determinantes idiotípicos de mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

Producción de agentes de unión selectivos de OPGbp

15 Cuando el agente de unión selectivo de OPGbp que se va a preparar es un agente de unión selectivo proteínico, tal como un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno, se dispone de varios métodos biológicos o químicos para producir dicho agente.

20 Son preferibles los métodos biológicos para producir cantidades suficientes de un agente de unión selectivo para uso terapéutico. Las técnicas de ADN recombinante normales son particularmente útiles para la producción de anticuerpos y dominios de unión a antígeno según la invención. A continuación, se describen ejemplos de vectores de expresión, células hospedadoras y métodos para la recuperación del producto expresado.

25 Se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de OPGbp en un vector de expresión apropiado aplicando técnicas de ligación normales. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula hospedadora empleada en particular (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de célula hospedadora, de manera que puede producirse la amplificación del gen y/o expresión del gen). Se puede amplificar / expresarse una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-OPGbp en células hospedadoras procariotas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La selección de la célula hospedadora dependerá en parte de si el anticuerpo anti-OPGbp se ha de modificar post-transicionalmente (por ejemplo, glucosilar y/o fosforilar). Si es así, son preferibles células hospedadoras de levadura, insecto o mamífero. Para una revisión de los vectores de expresión, ver Meth. Enz. v. 185, D.V. Goeddel, ed. Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

35 Típicamente, los vectores de expresión utilizados en las células hospedadoras contendrán uno o más de los siguientes componentes: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia líder para la secreción, un sitio de unión de ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador de selección. A continuación, se explica en detalle cada una de estas secuencias.

45 Los componentes de vector pueden ser homólogos (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogos (es decir, de especies distintas a la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridos (es decir, una combinación de diferentes secuencias de más de una fuente), sintéticos, o secuencias nativas que funcionan normalmente para regular la expresión de inmunoglobulina. Como tales, una fuente de los componentes de vector puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre y cuando los componentes sean funcionales en la maquinaria de la célula hospedadora y puedan ser activados por ella.

50 Se selecciona un origen de replicación en función del tipo de célula hospedadora que se esté utilizando para la expresión. Por ejemplo, el origen de la replicación desde el plasmidio pBR322 (Producto n.º 303-3s, New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, mientras que diversos orígenes desde SV40, polioma, adenovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus (como HPV o BPV) son útiles para la clonación de vectores en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen SV40 se utiliza frecuentemente solamente porque contiene el primer promotor).

60 Típicamente existe una secuencia de terminación de transcripción localizada en 3' del extremo de un polipéptido que codifica regiones y sirve para terminar la transcripción. Normalmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico G-C seguido de una secuencia poli T. Si bien la secuencia se clona fácilmente desde una biblioteca, o incluso se puede adquirir en el comercio como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente empleando métodos para la síntesis de ácido nucleico como los que se han descrito anteriormente.

65 Un elemento de gen marcador de selección codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula hospedadora cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos

codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o canamicina para células hospedadoras procariotas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles desde medios complejos. Los marcadores seleccionables preferibles son el gen de resistencia a canamicina, el gen de resistencia a ampicilina, y el gen de resistencia a tetraciclina. Se puede usar también un gen de resistencia a neomicina para la selección en células hospedadoras procariotas y eucariotas.

Se pueden utilizar otros genes de selección para amplificar el gen que se exprese. La amplificación es el proceso en el que los genes que tienen una mayor demanda de producción de una proteína crítica para crecimiento se reiteran en tandem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Entre los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero se incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Los transformantes de célula de mamífero se sitúan bajo la presión de selección, a la que solamente los transformantes se adaptan de forma única para sobrevivir en virtud del marcador presente en el vector. Se impone la presión de selección cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, conduciendo así a la amplificación del gen de selección y el ADN que codifica un anticuerpo anti-OPGbp. Como resultado, se sintetizan mayores cantidades de un anticuerpo a partir del ADN amplificado.

Normalmente, es necesario un sitio de unión a ribosoma para la iniciación de la traducción de ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento está típicamente localizado en 3' para el promotor y en 5' para la secuencia de codificación del polipéptido que se va a expresar. La secuencia Shine-Dalgarno puede variar, aunque típicamente es una polipurina (es decir, tiene un alto contenido A-G). Se han identificado muchas secuencias Shine-Dalgarno, pudiéndose sintetizar fácilmente cada una de ellas aplicando los métodos que se han indicado anteriormente y utilizarse en un vector procariota.

Se utiliza una secuencia, o señal, líder para dirigir la secreción de un polipéptido. Se puede colocar una secuencia de señal dentro del extremo 5' de una región de codificación de polipéptido o directamente en el él. Se han identificado muchas secuencias de señal y se pueden seleccionar en función de la célula hospedadora utilizada para la expresión. En la presente invención, una secuencia de señal puede ser homóloga (natural) o heteróloga para una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp. Una secuencia de señal heteróloga seleccionada deberá ser aquella que es reconocida y procesada, es decir, segmentada, por una peptidasa de señal, a través de la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa, la secuencia de señal es sustituida por una secuencia de señal procariota seleccionada, tal como, del grupo de los líderes fosfatasa alcalina, penicilanaso o enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura, se puede sustituir una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa por un líder de levadura invertasa, factor alfa o fosfatasa ácida. En la expresión de célula de mamífero, la secuencia de señal nativa es satisfactoria, si bien pueden ser adecuadas otras secuencias de señal de mamífero.

En la mayoría de los casos, la secreción de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp a partir de una célula hospedadora tendrá como resultado la eliminación del péptido de señal del anticuerpo. Por consiguiente, el anticuerpo maduro carecerá de secuencias de señal o líder.

En algunos casos, tal como cuando se desea la glucosilación en un sistema de expresión de célula hospedadora eucariota, se pueden manipular las diversas pre-secuencias para mejorar la glucosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de peptidasa de un péptido de señal en particular o añadir presecuencias, que también pueden afectar a la glucosilación. El producto de proteína final puede tener en la posición -1 (en relación con el primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes para la expresión, que pueden no haber sido eliminados totalmente. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos aminoácidos que se encuentran en el sitio de escisión de peptidasa, unidos en el extremo N. Como alternativa, el uso de algunos sitios de escisión de enzima puede tener como resultado una forma ligeramente trunca del polipéptido OPGbp deseado, si la enzima corta en esa área dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión de la presente invención contendrán típicamente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y que está unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp. Se puede utilizar tanto un promotor nativo como heterólogo dependiendo de la célula hospedadora utilizada para la expresión y el rendimiento de la proteína deseado.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas de promotor de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptofano (trp); y promotores híbridos como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Se han publicado sus secuencias, permitiendo así que los expertos en la materia puedan ligarlos a la(s) secuencia(s) de ADN deseada(s), utilizando ligadores o adaptadores según sea necesario para proporcionar los sitios de restricción necesarios.

Los promotores adecuados para su uso con los hospedadores de levadura también son conocidos en la técnica. Ventajosamente, se utilizan potenciadores de levadura con promotores de levadura. Los promotores adecuados

para su uso con células hospedadoras de mamífero son muy conocidos y entre ellos se incluyen los que se obtienen de genomas de virus como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y de manera más preferible virus 40 de simio (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque de calor y promotor de actina.

Otros promotores que se pueden utilizar para expresar los agentes de unión selectivos de la invención incluyen, sin limitarse sólo a ellos: la región promotora temprana SV40 (Bernoist and Chambon, *Nature*, 290: 304-301, 1981); el promotor CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' de virus de sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., *Cell*, 22: 787-797, 1980); el promotor de timidina cinasa de herpes (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 144-1445, 1981); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster et al., *Nature*, 296: 39-42, 1982); los vectores de expresión procariotas como el promotor beta-lactamasa (Villa-Kamaroff, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 3727-3731, 1978); o el promotor tac (DeBoer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 21-25, 1983). También son de interés las siguientes regiones de control transcripcional de animal, que presentan especificidad de tejido y que se han utilizado en animales transgénicos; la región de control de gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., *Cell*, 38, 639-646, 1984; Ornitz et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50: 399-409, 1986; MacDonald, *Hepatology*, 7, 425-515, 1987); la región de control de gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, *Nature*, 315, 115-122; 1985); la región de control de gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., *Cell*, 38, 647-658, 1984; Adames et al., *Nature*, 318: 533-538, 1985; Alexander et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1436-1444, 1987); la región de control de virus de tumor de mama de ratón que es activo en células de testículo, de pecho, linfoides y mastocitos (Leder et al., *Cell*, 45, 485-495, 1986), región de control de gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., *Genes and Devel.*, 1, 268-276, 1987); la región de control de gen de alfafetoproteína que es activa en el hígado (Kurmlauf et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1639-1648, 1985; Hammer et al., *Science*, 235: 53-58; 1987); la región de control de gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., *Genes and Devel.*, 1, 161-171, 1987); la región de control de gen beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram et al., *Nature*, 315: 338-340, 1985; Kollias et al., *Cell*, 46: 89-94, 1986); la región de control de gen de proteína básica de mielina que es activa en células de oligodendrocito en el cerebro (Readhead et al., *Cell*, 48, 703-712; 1987); la región de control de gen de cadena-2 ligera de miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, *Nature*, 314, 283-286, 1985); y la región de control de gen de hormona de liberación glonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason et al., *Science*, 234: 1372-1378, 1986).

Se puede insertar una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción en células hospedadoras eucariotas. Se conocen varias secuencias potenciadoras asequibles desde mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, típicamente, se utilizará un potenciador desde un virus. El potenciador SV40, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, y los potenciadores de adenovirus son ejemplos de elementos de potenciación para la activación de promotores eucariotas. Si bien se puede cortar y empalmar un potenciador en el vector en la posición 5' y 3' de la región de codificación de polipéptido, típicamente queda localizado en el sitio 5' desde el promotor.

Los vectores para la puesta en práctica de la presente invención son los que son compatibles con células hospedadoras de bacterias, de insectos y de mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3, y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, CA), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alfa (publicación PCT n.º WP90(14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY).

Los vectores posibles adicionales incluyen, sin limitarse sólo a ellos, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedadora seleccionada. Entre dichos vectores se incluyen, sin limitarse sólo a ellos plásmidos como derivados de plasmidio Bluescript® (un fagémido a base de ColE1 de alto número de copias, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), plásmidos de clonación PCR designados para la clonación de productos PCR Taq-amplificados (por ejemplo, TOPO™ TA Cloning® Kit, PCR2.1® plasmid derivatives, Invitrogen, Carlsbad, CA), y vectores de mamífero, levadura o virus como un sistema de expresión de baculovirus (derivados de plasmidio pBacPAK, Clontech, Palo Alto, CA). Se pueden introducir las moléculas recombinantes en células hospedadoras mediante técnicas de transformación, transfección, infección, electroporación y otras técnicas conocidas.

Las células hospedadoras de la invención pueden ser células hospedadoras procariotas (por ejemplo *E. coli*) o células hospedadoras eucariotas (tal como células de levadura, células de insecto o células de vertebrado). La célula hospedadora, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, expresa un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno de la invención que puede recogerse después desde el medio de cultivo (si la célula hospedadora la secreta en el medio) o directamente desde la célula hospedadora que la produce (si no la secreta). La selección de la célula hospedadora apropiada dependerá de varios factores como los niveles de expresión deseados, las modificaciones de polipéptido que son deseables o necesarios para la actividad, como glucosilación o fosforilación, y la facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa.

Se conoce una serie de células hospedadoras adecuadas en la técnica y muchas de ellas están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA. Entre los ejemplos se incluyen células de mamífero,

como células de ovario de hámster chino (CHO) (ATCC n.º CCL61) células CHO DHFR (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 4216-4220 (1980), células de riñón embrionario humano (HEK) 293 o 293T (ATCC n.º CRL1573) o células 3T3 (ATCC n.º CCL92). La selección de células hospedadoras de mamífero adecuadas y los métodos para la transformación, cultivo, amplificación, exploración y producción y purificación de producto son conocidas en la técnica. Otras células de mamífero adecuadas, son líneas celulares COS-1 (ATCC n.º, CRL1650) y COS-7 (ATCC n.º CCL651) de mono, y la línea celular CV-1 (ATCC n.º CCL70). Otros ejemplos de células hospedadoras de mamífero incluyen líneas de células de primate y líneas de células de roedores, incluyendo líneas de células transformadas. También son adecuadas las células diploides normales, cepas de células derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, así como explantes primarios. Las células candidato pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección o pueden contener un gen de selección que actúe predominantemente. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, sin limitarse sólo a ellas, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratón Swiss, BALB-c o NIH, líneas de células de hámster BHK o HaK, que están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA). Cada una de estas líneas celulares se conoce y está disponible para los expertos en la técnica de la expresión de proteínas.

De manera similar, entre las células hospedadoras útiles adecuadas para la presente invención se encuentran las células bacterianas. Por ejemplo, se conocen las diversas cepas de *E. coli* (v.g. HB101, (ATCC n.º 33694) DH5 α , DH10 y MC1061 (ATCC n.º 53338)) como células hospedadoras en el campo de la biotecnología. Se pueden emplear también en este método varias cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., otras *Bacillus* spp. *Streptomyces* spp. y similares.

También se dispone de muchas cepas de células de levadura conocidas entre los expertos en la materia como células hospedadoras para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Entre las células de levadura preferibles se incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

Adicionalmente, cuando se desee, se pueden utilizar sistemas de células de insecto en los métodos de la presente invención. Dichos sistemas se describen por ejemplo en Kitts et al., (Biotechniques, 14, 810-817 (1993)), Lucklow (Curr. Opin. Biotechnol., 4, 564-572 (1993)), Lucklow et al., (J. Virol, 67, 4566-4579 (1993)). Las células de insecto preferibles son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La transformación o transfección de una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp en una célula hospedadora seleccionada puede llevarse a cabo mediante métodos muy conocidos, incluyendo métodos como el método de cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o el método DEAE-dextrano. El método seleccionado se determinará en parte en función del tipo de células hospedadoras utilizada. Estos métodos y otros métodos adecuados son muy conocidos entre los expertos en la materia y se exponen por ejemplo en Sambrook et al., anteriormente citado.

Se pueden utilizar también animales transgénicos para expresar agentes de unión selectivos glucosilados, tal como anticuerpos y dominio de unión de antígeno. Por ejemplo, se puede utilizar un animal de producción de leche transgénico (una vaca o una cabra, por ejemplo) y obtener agentes de unión glucosilados en la leche animal. Como alternativa, se pueden utilizar plantas para producir agentes de unión selectivos glucosilados.

Pueden cultivarse células hospedadoras que comprenden (es decir, transformadas o transfectadas con) un vector de expresión que codifica un agente de unión selectivo de OPGbp utilizando medios convencionales muy conocidos entre los expertos en la materia. Los medios contendrán normalmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Entre los medios adecuados para el cultivo de células *E. coli* se incluyen por ejemplo caldo de cultivo de Luria (LB) y/o caldo de cultivo Terrific (TB). Entre los medios adecuados para el cultivo de células eucariotas se incluyen RPMI 1640, MEM, DMEM, que pueden suplementarse todos ellos con suero y/o factores de crecimiento, según se requiera para la línea de células en particular que se cultive. Un medio adecuado para cultivos de insecto es medio de Grace suplementado con hidrolizado de levadura, hidrolizado de lactalbúmina y/o suero de becerro fetal, según sea necesario.

Típicamente, se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de células transformadas o transfectadas como suplemento al medio. El compuesto que se utilice vendrá dictado por el elemento marcador de selección presente en el plasmidio con el que se transformó la célula hospedadora. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionado es resistencia a canamicina, el compuesto que se añade al medio de cultivo será canamicina. Otros compuestos para crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina. La cantidad de anticuerpo o dominio de unión de antígeno anti-OPGbp producida por una célula hospedadora puede evaluarse utilizando métodos normales conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitarse sólo a ellos, análisis de mancha de Western, electroforesis de gel SDS-poliacrilamida, electroforesis de gel no desnaturizante, separación por HPLC, inmunoprecipitación, y/o ensayos de actividad.

La purificación de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPG que ha sido secretado hacia un medio de células puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas, entre las que se incluyen afinidad, inmunofinidad o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de tamiz molecular, electroforesis de gel preparativa o enfoque isoeléctrico, cromatofoco y cromatografía de líquidos a alta presión. Por ejemplo, se pueden purificar

convenientemente los anticuerpos que comprenden una región Fc por cromatografía de afinidad con una proteína A, que se une selectivamente a la región Fc. Las formas modificadas de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno pueden prepararse con etiquetas de afinidad, como hexahistidina u otros péptidos pequeños como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o myc (Invitrogen) en su extremo carboxilo o su extremo amino y purificarse por columna de afinidad en una etapa. Por ejemplo, polihistidina se une con mayor afinidad y especificidad a níquel, de manera que se puede utilizar una cadena de afinidad de níquel (como columnas de níquel Qiagen®) para la purificación de agentes de unión selectivos etiquetados con polihistidina. (Véase, por ejemplo, Ausubel, et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)). En algunos casos, pueden ser necesarias más de una etapa de purificación.

Los agentes de unión selectivos de la invención que se expresan en células hospedadoras procariotas pueden estar presentes en forma soluble, ya sea en el espacio periplásmico o en el citoplasma, o en una forma soluble como parte de los cuerpos de inclusión intracelulares. Los agentes de unión selectivos pueden extraerse de la célula hospedadora utilizando cualquier técnica normal conocida entre los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden lisar células hospedadoras para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante prensa francesa, homogenización, y/o sonicación seguido de centrifugado.

Las formas solubles de anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp presentes tanto en el espacio de citoplasma como liberadas desde el espacio periplásmico pueden purificarse después aplicando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, se liberan fragmentos Fab desde el espacio periplásmico bacteriano mediante técnicas de choque osmótico.

Si un anticuerpo o dominio de unión a antígeno ha formado cuerpos de inclusión, se pueden unir frecuentemente a las membranas celulares interiores y/o exteriores y, por tanto, se encontrarán principalmente en el material aglomerado tras el centrifugado. El material aglomerado se tratará después a extremos de pH, o con un agente caotrópico como, por ejemplo, un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea, o derivados de urea, en presencia de un agente de reducción como ditiotreitil a un pH alcalino o tris carboxietil fosfina a un pH ácido para liberar, descomponer y solubilizar los cuerpos de inclusión. El agente de unión selectivo soluble puede analizarse después utilizando electroforesis de gel, inmunoprecipitado o similares. Cuando es deseable aislar un anticuerpo o dominio de unión a antígeno solubilizado, se puede llevar a cabo el aislamiento utilizando métodos normales, como los que se exponen más adelante y en Marston et al., (Meth Enz., 182: 264-275 (1990)).

En algunos casos, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno puede no estar biológicamente activo tras el aislamiento. Se pueden utilizar varios métodos para el "replegamiento" o conversión del polipéptido en su estructura terciaria y la generación de uniones disulfuro, para restaurar la actividad biológica. Dichos métodos incluyen la exposición del polipéptido solubilizado a un pH normalmente por encima de 7 y en presencia de una concentración concreta de un caotropo. La selección del caotropo es muy similar a las opciones utilizadas para la inclusión de solubilización de anticuerpo, pero normalmente el caotropo se utiliza a una concentración inferior y no coincide necesariamente con los mismos caotropos que los utilizados para la solubilización. En la mayoría de los casos la solución de replegamiento / oxidación contendrá también un agente de reducción o el agente de reducción más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox concreto que permita que se produzca el desordenamiento de disulfuro en la formación del puente(s) de cisteína de proteína. Algunas de las parejas redox comúnmente utilizadas incluyen cisteína/cistamina, glutatona (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditiotreitil (DTT)/ditiato DTT, y 2-mercaptoetanol (bME)/ditiob (ME). En muchos casos, se puede utilizar o puede ser necesario un co-disolvente para aumentar la eficacia del replegamiento, incluyéndose entre los reactivos comunes utilizados para este propósito glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, arginina y similares.

Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno de la invención se pueden preparar mediante métodos de síntesis química (tal como síntesis de péptido en fase sólida) utilizando técnicas conocidas en la técnica como las que se exponen en Merrified et al., (J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963)) Houghten et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 5132 [1985]), y Stewart y Young (Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL [1984]). Dichos polipéptidos se pueden sintetizar con o sin metionina en el extremo amino. Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno químicamente sintetizados pueden oxidarse aplicando los métodos que se exponen en estos documentos de referencia para formar puentes de disulfuro. Los anticuerpos así preparados retendrán al menos una actividad biológica asociada con un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp producido por recombinación o nativo.

Ensayos para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp

La invención proporciona métodos de exploración para identificar agentes de unión selectivos que inhiben parcial o completamente al menos una actividad biológica de OPGbp. La inhibición de la actividad biológica de OPGbp incluye, sin limitarse sólo a ellas, la inhibición de la unión de OPGbp a su receptor afín, ODAR, la inhibición de la estimulación de la formación de osteoclasto *in vitro* o *in vivo* mediante OPGbp, y/o la inhibición de recambio óseo o resorción ósea mediada por OPGbp. Los agentes de unión selectivos de la invención incluyen anticuerpos anti-OPGbp, y fragmentos, variantes, derivados y fusiones de los mismos, péptidos, compuestos peptidomiméticos o compuestos organomiméticos.

Los métodos de exploración para la identificación de agentes de unión que pueden inhibir parcial o completamente una actividad biológica de OPGbp pueden incluir ensayos *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos *in vitro* incluyen aquellos que detectan la unión de OPGbp a ODAR y se pueden utilizar para la exploración de agentes de unión de OPGbp en cuanto a su capacidad para aumentar o disminuir la velocidad o grado de unión de OPGbp a ODAR. En un tipo de ensayo, se inmoviliza un polipéptido OPGbp, preferiblemente una forma soluble de OPGbp, tal como un dominio extracelular, en un soporte sólido (por ejemplo, agarosa o perlas acrílicas) y se añade el polipéptido ODAR, ya sea en presencia o en ausencia de un agente de unión selectivo de OPGbp. Se mide el grado de unión de OPGbp y ODAR con presencia o sin ella de agente de unión selectivo. Se puede detectar la unión por ejemplo por etiquetado radioactivo, etiquetado fluorescente o reacción enzimática. Como alternativa, la reacción de unión puede llevarse a cabo utilizando un sistema detector de resonancia de plasmon superficial, tal como el sistema de ensayo BIAcore (Pharmacia, Piscataway, NJ). Las reacciones de unión pueden llevarse a cabo con arreglo al protocolo del fabricante.

Los ensayos *in vitro*, como los que se han descrito, pueden utilizarse ventajosamente para detectar selectivamente rápidamente un gran número de agentes de unión selectivos en cuanto a los efectos de unión de OPGbp con ODAR. Los ensayos pueden ser automáticos para detectar selectivamente compuestos generados en despliegue en fago, péptido sintético y bibliotecas de síntesis química.

Se pueden detectar selectivamente también el aumento o disminución de agentes de unión selectivos que se unen a OPGbp con ODAR en cultivos celulares utilizando células y líneas celulares que expresan cada polipéptido. Las células y líneas celulares pueden obtenerse de cualquier mamífero, si bien es preferible su obtención de seres humanos u otros primates, perros o roedores. A modo de ejemplo, la unión de OPGbp a células que expresan ODAR en la superficie se evalúa en presencia o ausencia de agentes de unión selectivos y el grado de unión puede determinarse por ejemplo por citometría de flujo utilizando un anticuerpo biotinilado para OPGbp.

Los ensayos de actividad *in vitro* pueden utilizarse también para identificar agentes de unión selectivos que inhiben la actividad de OPGbp. Entre los ejemplos de ensayos se incluyen la estimulación del crecimiento y proliferación de células que dependen de OPGbp y la formación de osteoclasto mediada por OPGbp desde células de médula ósea, describiéndose ésta última en el ejemplo 1 de la presente invención.

Los ensayos *in vivo* también están disponibles para determinar si un agente de unión selectivo es capaz o no de disminuir o inhibir el recambio óseo y/o resorción ósea. Se puede aumentar la resorción ósea en animales a través de diversos métodos, entre los que se incluyen ovariectomía y administración de agentes pro-resortivos como OPGbp o IL-1. Véanse los documentos WO 97/23614 y WO 98/46751. Los efectos de los inhibidores de OPG en la resorción ósea en pacientes humanos se puede medir a través de diversos métodos conocidos como absorptiometría de fotón único (SPA), absorptiometría de fotón dual (DPA), absorptiometría por rayos X de energía dual (DEXA), tomografía computada cuantitativa (QCT) y ultrasonografía (ver Johnston et al., en Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism, 2ª ed. M.J. Favus, ed. Raven Press págs. 137-146). El recambio y resorción ósea pueden determinarse también midiendo los cambios en determinados marcadores bioquímicos, como osteocalcina de suero, fosfatasa alcalina de suero, péptidos de extensión de procolágeno I de suero, telopéptido de colágeno N-terminal o C-terminal de suero o urinario, calcio urinario, hidroxiprolina y piridinolina urinaria y desoxipiridinolina. Generalmente se reconoce que una disminución de los niveles de los marcadores bioquímicos mencionados indica que ha disminuido la resorción ósea y se está reduciendo la pérdida de masa ósea. Como alternativa, se pueden determinar los efectos de la resorción ósea midiendo un cambio en la resistencia mecánica del hueso, en particular un aumento en la resistencia de torsión del hueso (retorcimiento).

Para aplicaciones de diagnóstico, en determinados modos de realización, los agentes de unión selectivos de OPGbp, tal como anticuerpos y dominios de unión a antígeno de los mimos, se etiquetarán típicamente con una fracción detectable. La fracción detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, una fracción detectable puede ser un radioisótopo, como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵P, ³⁵S o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o una enzima como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Bayer et al., Meth Enz. 184: 138-163 (1990).

Los agentes de unión selectivos de la invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, como radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, ensayos sandwich directos e indirectos (ELISA), y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 147-158 (CRC Press, 1987)) para detección y cuantificación de polipéptidos de OPGbp. Los anticuerpos se unirán a polipéptidos de OPGbp con una afinidad que es apropiada para el método de ensayo que se emplee.

Los agentes de unión selectivos de la invención también son útiles para la obtención de imágenes *in vivo*, administrándose por ejemplo un agente de unión selectivo etiquetado con una fracción detectable a un animal, preferiblemente en la corriente sanguínea, y ensayándose la presencia y localización del anticuerpo etiquetado en el hospedador. El agente puede etiquetarse con cualquier fracción que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología, u otros medios de detección conocidos en la técnica.

La invención se refiere también a un equipo que comprende un agente de unión selectiva de OPGbp, como un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno, y otros reactivos útiles para detectar los niveles de OPGbp en muestras biológicas. Dichos reactivos pueden incluir una actividad secundaria, una etiqueta detectable, suero de bloqueo, muestras de control positivo y negativo y reactivos de detección.

5 Usos terapéuticos de agentes de unión selectivos de OPGbp. Los agentes de unión selectivos de la invención, tal como se definen en la reivindicación 1, pueden utilizarse como agentes terapéuticos. Los agentes de unión selectivos terapéuticos pueden ser antagonistas de OPGbp y, en una realización, son anticuerpos antagonistas anti-OPGbp que inhiben al menos una de las actividades biológicas de un polipéptido OPGbp *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, un antagonista de OPGbp inhibirá la unión de OPGbp con ODAR al menos aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces, más de aproximadamente 1000 veces. Como alternativa, un antagonista de OPGbp inhibirá la formación de osteoclasto *in vitro* tal como lo indica una CI_{50} mensurable (una concentración que da un 50% de inhibición) en un ensayo de médula ósea, como se describe en el ejemplo 1. Como alternativa, un antagonista de OPGbp disminuirá los marcadores de recambio óseo en al menos un 20%, o al menos un 50% en comparación con los niveles de la línea de referencia. Los agentes de unión selectivos de OPGbp antagonistas (tal como anticuerpos) se identifican a través de los ensayos de exploración que se han descrito aquí.

Los antagonistas de OPGbp, tal como anticuerpos y dominios de unión a antígeno antagonistas anti-OPGbp, pueden utilizarse para prevenir o tratar enfermedades óseas caracterizadas por una pérdida de la masa ósea o por reemplazo del hueso estructuralmente normal con un hueso estructuralmente anormal. Los antagonistas de OPGbp pueden administrarse a un animal que padece pérdida de masa ósea o que es susceptible de padecer pérdida de masa ósea a causa de uno de los siguientes trastornos: osteoporosis, tal como osteoporosis primaria, osteoporosis endocrina (hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing y acromegalia, formas hereditarias y congénitas de osteoporosis (osteogenesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Menkes y síndrome de Riley-Day) y osteoporosis como consecuencia de la inmovilización de las extremidades; osteomielitis, o una lesión infecciosa del hueso, que lleva a la pérdida de la masa ósea; hipercalcemia como resultado de tumores sólidos (pecho, pulmón y riñón) y malignidades hematológicas (mieloma múltiple, linfoma y leucemia), hipercalcemia idiopática e hipercalcemia asociada con hipertiroidismo y trastornos de la función renal; osteopenia después de cirugía, inducida por administración de esteroides y asociada con trastornos del intestino delgado y grueso y con enfermedades hepáticas y renales crónicas; osteonecrosis, o muerte celular ósea, asociada con lesión traumática o necrosis no traumática asociada con enfermedad de Gaucher, anemia de células falciformes, lupus eritematoso sistémico y otros estados patológicos; pérdida de la masa ósea debido a artritis reumatoide; pérdida periodontal de la masa ósea; osteoartritis; pérdida prostética; y metástasis osteolítica. Los antagonistas de OPGbp pueden utilizarse también para prevenir o tratar determinados trastornos óseos que se caracterizan por un reemplazo del hueso estructuralmente sólido con hueso incompetente estructuralmente desorganizado, como enfermedad de hueso de Paget (osteitis deformante) en adultos y edad juvenil; hiperparatiroidismo, en trastornos óseos congénitos, como displasia fibrosa y en metástasis ósea osteosclerótica.

Los antagonistas de OPGbp se utilizan ventajosamente para tratar la pérdida de masa ósea como resultado de la destrucción osteolítica de hueso causada por tumores malignos o metastáticos. Los polipéptidos de OPG de la invención se pueden utilizar para tratar la pérdida de masa ósea asociada con cánceres de pecho, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esófago, rectal, de vejiga, de útero, de ovario y de hígado, así como cáncer del tracto gastrointestinal. También se incluye la pérdida de masa ósea asociadas con determinadas malignidades hematológicas como mieloma múltiple y linfomas como enfermedad de Hodgkin.

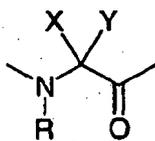
Los antagonistas de OPGbp de la invención, incluyendo los anticuerpos y dominios de unión a antígeno antagonistas, se administran en solitario o en combinación con otros agentes terapéuticos, en particular, en combinación con otros agentes de terapia contra el cáncer. Dichos agentes incluyen por lo general, terapia de radiación y quimioterapia. La quimioterapia puede implicar el tratamiento con uno o más de los siguientes: antraciclina, taxol, tamoxifeno, doxorubicina, 5-fluorouracilo, y otros fármacos conocidos entre los expertos en la materia. En una realización, el agente de terapia contra el cáncer es un antagonista de hormona de liberación de hormona luteinizante (LHRH), preferiblemente un antagonista de péptido. Más preferiblemente, un antagonista de LHRH es un decapeptido que comprende la siguiente estructura:

55 A-B-C-D-E-F-G-H-I-J

en donde:

60 A es piro-glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar, o Ac-D-Pal;
 B es His o 4-Cl-D-Phe;
 C es Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal-D-Pal(N-O) o D-Trp;
 D es Ser;
 E es N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys(iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg o Ile;
 F es

65



en donde R y X son independientemente H y alquilo;
e Y comprende una entidad polar pequeña.

- 5 G es Leu o Trp;
H es Lys (iPr), Gln, Met, o Arg;
I es Pro; y
J es Gly-NH₂ o D-Ala-NH₂;

- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, un antagonista de LHRH comprende el péptido:

N-Ac-D-Nal-4-Cl-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys (iPr)-Pro-D-Ala-NH₂.

- 15 Se utilizan en el presente documento las abreviaturas y las convenciones estándar, abreviándose los Restos y fracciones no estándar del siguiente modo:

Nal	3-(2-naftil)alaninilo
4-Cl-Phe	(4'-clorofenil)alaninilo
Pal	3-(3'-piridil)alaninilo
Pal(N-O)	3-(3'-piridin-N-óxido)alaninilo
iPr-Lys	N-épsilon-2-propil-lisinilo
Qal	3-(2'-quinolinil)alaninilo

- 20 Entran dentro del alcance de la presente invención las formas alternativas de los decapeptidos antagonistas de LHRH. Dichos decapeptidos se describen en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.843.901.

- Se incluyen asimismo combinaciones de antagonistas de OPGbp con anticuerpos que se unen a células de tumor e inducen un efecto citotóxico y/o citostático en el crecimiento de tumor. Entre los ejemplos de dichos anticuerpos se incluyen los que se unen a proteínas de superficie de célula Her2, CDC20, CDC33, glucoproteína de tipo mucina y receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR) presente en células de tumor y que induce un efecto citostático y/o citotóxico en las células de tumor que despliegan estas proteínas. Entre los ejemplos de dichos anticuerpos se incluyen HERCEPTINA para el tratamiento de cáncer de pecho y RITUXAN para el tratamiento de linfoma no Hodgkin. Se incluyen también como agentes para terapia contra el cáncer polipéptidos que inducen selectivamente apoptosis en células de tumor como TRAIL de polipéptido relacionado con TNF. Los antagonistas de OPGbp se pueden administrar antes, de forma concurrente o posteriormente al tratamiento con un agente de terapia contra el cáncer. Los antagonistas de OPGbp pueden administrarse profilácticamente para prevenir o mitigar el inicio de la pérdida de la masa ósea por cáncer metastático o pueden administrarse para el tratamiento de un estado patológico existente de pérdida de masa ósea como consecuencia de metástasis.

- 35 Los antagonistas de OPGbp de la invención pueden utilizarse para prevenir y/o tratar el crecimiento de células de tumor en el hueso. El cáncer que tiene metástasis en el hueso puede extenderse rápidamente como células de tumor que estimulan a los osteoclastos para reabsorber la matriz del hueso interna. El tratamiento con un antagonista de OPGbp mantendrá la densidad ósea inhibiendo la resorción y disminuirá la probabilidad de que se extiendan las células de tumor por todo el esqueleto. Se puede prevenir y/o tratarse cualquier cáncer tenga metástasis al hueso con un antagonista de OPGbp.

- En una realización, se previene y/o se trata mieloma múltiple con un antagonista de OPGbp, tal como un anticuerpo. El mieloma múltiple está localizado en el hueso y los pacientes afectados presentan típicamente una pérdida de la masa ósea como consecuencia de una mayor activación de osteoclasto en regiones localizadas. Las células de mieloma producen directa o indirectamente OPGbp, que a su vez activa los osteoclastos con el resultado a lisis del hueso local que rodea a las células de mieloma embebidas en los espacios de la médula ósea. Los osteoclastos normales adyacentes a la célula de mieloma, a su vez, producen IL-6, que lleva a un crecimiento y proliferación de células de mieloma. Las células de mieloma se expanden en un modo clonal y ocupan espacios que están siendo creados por una resorción ósea inapropiada. El tratamiento de un animal con un antagonista de OPGbp bloquea la activación de osteoclastos, lo que a su vez lleva a una disminución de la producción de IL-6 por los osteoclastos, y a una supresión del crecimiento y/o proliferación de mieloma.

- 55 Los antagonistas de OPGbp pueden utilizarse en solitario para el tratamiento de los estados patológicos que se han mencionado que tienen como resultado una pérdida de la masa ósea o en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente (anabólico) promotor del crecimiento óseo o un agente anti-resortivo del hueso

entre los que se incluyen factores morfogénicos óseos designados BMP-1 a BMP-12, factor- β de crecimiento de transformación y miembros de la familia TGF- β , factores de crecimiento de fibroblasto FGF-1 a FGF-10, inhibidores de interleucina-1, inhibidores de THF- α , hormona paratiroides, prostaglandinas serie E, bisfosfonatos y minerales potenciadores del hueso, como flúor y calcio. Los agentes antabólicos incluyen hormona paratiroides y factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), formando preferiblemente este último agente complejo con una proteína de unión IGF. Los modos de realización preferidas incluyen también la combinación de un antagonista OPGbp con un antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1) o un antagonista de OPGbp con un receptor TNF soluble, tal como receptor-1 de TNF soluble o receptor-2 de TNF soluble. Un ejemplo de antagonista de receptor de IL-1 es el que se describe en el documento WO 89/11540 y un ejemplo receptor-1 de TNF soluble es el que se describe en el documento WO 98/01555.

Una disminución en la velocidad de resorción ósea puede llevar a osteopetrosis, un estado patológico marcado por una densidad ósea excesiva. Los agonistas de OPGbp pueden aumentar la formación de osteoclasto y la resorción ósea y se administran a un animal que padece o es susceptible de una disminución en la resorción ósea y un aumento anormal de la masa ósea.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de agentes de unión selectivos de OPGbp entran dentro del marco de la presente invención. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un agente de unión selectivo de OPGbp, tal como un anticuerpo, o un fragmento, variante, derivado o fusión del mismo, mezclado con un agente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos antagonistas anti-OPGbp que inhiben parcial o completamente al menos una actividad biológica de OPGbp mezclados con un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los anticuerpos estarán suficientemente purificados para su administración a un animal.

Los agentes farmacéuticamente aceptables para su uso en las composiciones de la invención incluyen vehículos, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, aromatizantes y agentes de dilución, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de volumen, tampones, vehículos de suministro, agentes de tonicidad, co-disolventes, agentes de humectación, agentes de formación de complejo, agentes de tamponado, antimicrobianos y agentes tensioactivos, tal como se conoce en la técnica.

Una solución salina tamponada neutra o salina mezclada con albúmina de suero son ejemplos de vehículos apropiados. Asimismo se incluyen en las composiciones antioxidantes como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinil pirrolidona; amino ácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes, como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones de formación de sal como sodio; y/o agentes tensioactivos no iónicos como Tween, pluronics o polietilenglicol. Asimismo, a modo de ejemplo, entre los agentes de potenciación de la tonicidad adecuados se incluyen haluros de metal alcalino (preferiblemente cloruro de potasio o sodio), manitol, sorbitol y similares. Entre los conservantes adecuados se incluyen, sin limitarse sólo a ellos cloruro de benzalconio, trimerosal, alcohol fenético, metil parabeno, propil parabeno, clorohexidina, ácido sórbico y similares. También se pueden utilizar peróxido de hidrógeno como conservante. Entre los ejemplos de co-disolventes adecuados se incluyen glicerina, propilenglicol, y polietilenglicol. Entre los agentes de formación de complejo adecuados se incluyen por ejemplo cafeína, polivinil pirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Entre los agentes tensioactivos o agentes de humectación adecuados se incluyen ésteres de sorbitano, polisorbato como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonatos, o Tris-HCl. Tampón acetato que puede tener un pH en torno a 4,0-5,5 y tampón Tris que puede tener un pH en torno a 7,0-8,5. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R. Gennaro, ed. Mack Publishing Company, 1990 se exponen otros agentes farmacéuticos adicionales.

Las composiciones pueden presentarse en forma líquida o en una forma liofilizada o criodesecada. Las formas liofilizadas pueden incluir excipientes como sacarosa.

Las composiciones de la invención son adecuadas para administración parenteral. En los modos de realización preferidas, las composiciones son adecuadas para inyección o infusión en un animal a través de una ruta asequible para las personas que trabajan en este campo, como las rutas subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, o intralesionales. Una formulación parenteral será típicamente una solución acuosa isotónica sin pirógenos, esterilizada, opcionalmente con contenido en conservantes farmacéuticamente aceptables.

La formulación farmacéutica óptima puede ser determinada por los expertos en la materia dependiendo de la ruta de administración pretendida, el formato de suministro y la dosis deseada.

La invención contempla también otras formulaciones. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también preparaciones en partículas de compuestos poliméricos como poliácido áctico, poliácido glicólico, etc. o la

introducción de un agente de unión selectivo de OPGbp (tal como un anticuerpo) en liposomas. Se puede utilizar también un ácido hialurónico, que puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Las composiciones farmacéuticas incluyen también la formulación de agentes de unión selectivos de OPGbp (tal como anticuerpos) con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas o perlas bio-erosionables, o liposomas, que proporcionan una liberación sostenida o controlada del agente de unión selectivo que se puede suministrar después como una inyección depot. Otros medios adecuados para el suministro incluyen dispositivos de suministro implantables.

Se puede formular una composición farmacéutica que comprende un agente de unión selectivo OPGbp (tal como un anticuerpo) como un polvo deshidratado para inhalación. Dichas soluciones para inhalación pueden formularse también en un propelente licuado para suministro por aerosol. En otra formulación más, se pueden nebulizar soluciones.

Asimismo, se contempla, la posibilidad de administrar determinadas formulaciones que contienen agentes de unión selectivos de OPGbp por vía oral. Las formulaciones que se administran de este modo pueden formularse con o sin los vehículos que se utilizan habitualmente en la formación de compuestos de formas de dosis sólidas, tal como tabletas y cápsulas. Por ejemplo, se pueden diseñar cápsulas para liberar la porción activa de la formulación en un punto del tracto gastrointestinal en el que se aumenta al máximo la biodisponibilidad y se reduce al mínimo la degradación pre-sistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión selectivo. Asimismo, se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de tabletas y aglutinantes.

Otras preparaciones pueden incluir una cantidad eficaz de un agente de unión selectivo de OPGbp en una mezcla de excipientes no tóxicos como los que son adecuados para la fabricación de tabletas. Al disolver las tabletas en agua esterilizada, u otro vehículo apropiado, se pueden preparar soluciones en formas de dosis unitarias. Entre los excipientes adecuados se incluyen, sin limitarse sólo a ellos, diluyentes inertes, como carbonato cálcico, carbonato o bicarbonato sódico, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes de unión, como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Otras formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia, incluyendo formulaciones que implican agentes de unión selectivos de OPGbp en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Las técnicas para la formulación de distintos medios de suministro controlado o sostenido, como vehículos de liposoma, micropartículas bio-erosionables, o perlas porosas e inyecciones depot, también son conocidas entre los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, la descripción de Supersaxo et al., acerca de micropartículas poliméricas porosas de liberación controlada para el suministro de composiciones farmacéuticas (Véase el documento WO 93/15722 (PCT/US93/00829)).

Independientemente de la manera de administración, la dosis específica puede calcularse con arreglo al peso corporal, el área superficial del cuerpo o el tamaño del órgano. Asimismo, el refinamiento de los cálculos necesarios para determinar la dosis apropiada para el tratamiento en relación con las formulaciones antes mencionadas es el realizado de forma rutinaria por los expertos en la materia y entra dentro del ámbito de las tareas que llevan a cabo rutinariamente. Las dosis apropiadas pueden determinarse a través del uso de los datos de respuesta a dosis apropiados.

Asimismo, se pueden administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención a través de la administración pulmonar, por ejemplo, véase el documento PCT WO 94/200069, en donde se describe el suministro pulmonar de proteínas químicamente modificadas. Para el suministro pulmonar el tamaño de partícula deberá ser el adecuado para el suministro en el pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula deberá estar comprendido entre 1 μm y 5 μm , si bien se pueden utilizar partículas más grandes, tal como, cuando la partícula es bastante porosa.

Como alternativa o adicionalmente, las composiciones se pueden administrar localmente por implante en el área afectada de una membrana, de una esponja u otro material apropiado en el que se ha absorbido o en el que está encapsulado el agente de unión selectivo de OPGbp. Cuando se utiliza un dispositivo de implante, dicho dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro del agente de unión selectivo de OPGbp puede ser directo a través del dispositivo a través de un bolo, o a través de administración continua, o a través de un catéter utilizando infusión continua.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar también en una formulación o preparación de liberación sostenida. Entre los ejemplos de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices de polímero semi-permeables en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, poliactidas (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos n.º 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 [1983]), poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 [1981] y Langer Chem. Techn.; 12: 98-105 [1982]), acetato de etilen vinilo, o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir también liposomas, y se pueden preparar a través de

cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3688-3692 (1985); y los documentos EP 36.676; EP 88.046 y EP 143.949.

5 Los agentes de unión selectivos de OPGbp, es decir, anticuerpos y fragmentos, variantes, derivados y fusiones de los mismos, pueden emplearse en solitario o combinados con otras composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, se pueden utilizar composiciones farmacéuticas que comprenden por separado o en combinación un antagonista de OPGbp y un antagonista de receptor de interleucina-1, un antagonista de OPGbp y un receptor-1 de TNF soluble, o un antagonista de OPGbp y un receptor-2 TNF soluble para el tratamiento de artritis reumatoide. Por otra parte, se pueden utilizar composiciones que comprenden por separado o en combinación un antagonista de OPGbp y un agente de terapia contra el cáncer para el tratamiento de cáncer y pérdida de masa ósea asociada. Son posibles otras combinaciones con un antagonista de OPGbp dependiendo del estado patológico que se esté tratando.

15 Puede ser deseable en algunos casos utilizar una composición farmacéutica que comprenda las composiciones de agente de unión selectivo de OPGbp de una manera ex vivo. En este caso, se exponen las células, tejidos u órganos que han sido extirpados del paciente a composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de unión selectivos de OPGbp, tras lo cual se vuelven a implantar en el paciente las células, tejidos y/o órganos posteriormente.

20 En otros casos, se puede suministrar una composición que comprende un agente de unión selectivo de OPGbp a través del implante en ciertas células del paciente que han sido obtenidas por ingeniería genética, utilizando métodos como los que se describen aquí, para expresar y secretar los polipéptidos, agentes de unión selectivos, fragmentos, variantes o derivados. Dichas células pueden ser células animales o humanas, y pueden suministrarse desde el propio tejido del paciente o desde otra fuente, ya sea humana o no humana. Opcionalmente, se pueden inmortalizar las células. No obstante, para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, es preferible que las células estén encapsuladas para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulado consisten típicamente en cubiertas o membranas poliméricas semi-permeables biocompatibles que permiten la liberación del producto(s) de proteína para prevenir la destrucción de las células a través del sistema inmune del paciente o a través de otros factores negativos de los tejidos de alrededor.

30 Los métodos utilizados para el encapsulado de membrana de las células son conocidas para los expertos en la materia y la preparación de las células encapsuladas y su implantación en pacientes pueden realizarse sin una experimentación indebida. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.892.538; 5.011.472; y 5.106.627. En el documento PCT WO 91/10425 (Aebischer et al.) se describe un sistema de encapsulado de células vivas. Las técnicas para formular otros medios de suministro sostenido o controlado diversos, como vehículos de liposoma, partículas o perlas bio-erosionables, también son conocidas entre los expertos en la materia, y están descritas. Las células, con o sin encapsulado, pueden implantarse en tejidos u órganos del cuerpo del paciente adecuados.

40 Una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un agente de unión selectivo de OPGbp (tal como un anticuerpo anti-OPGbp, o fragmento, variante, derivado o fusión del mismo), dependerá por ejemplo de los objetivos terapéuticos, como la indicación para la que se está utilizando la composición, la ruta de administración y el estado del sujeto. Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno antagonistas de OPGbp de la invención se administran en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva para prevenir y/o tratar pérdida de hueso asociada a enfermedad ósea metastásica. Una "cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva" de un anticuerpo antagonista de OPGbp es la cantidad que reduce la velocidad y/o extensión de la pérdida de masa ósea o que previene la pérdida de la masa ósea en un sujeto que tiene una masa ósea normal. Los cambios en la masa ósea se detectan a través de una serie de métodos conocidos como absorptiometría de fotón único (SPA), absorptiometría de fotón dual (DPA), absorptiometría de rayos X de energía dual (DEXA), tomografía computada cuantitativa (QCT) y ultrasonografía (ver Johnston et al., en Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorder of Mineral Metabolism, 2ª ed. M. J. Favus, ed. Raven Press págs. 137-146).

50 Las personas especializadas en este campo pueden aplicar estos métodos para determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de fusión de OPG. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede determinarse midiendo los cambios en los marcadores bioquímicos para el recambio óseo, tal como osteocalcina de suero, fosfatasa alcalina de suero, péptidos de extensión de procolágeno I de suero, telopéptido de colágeno C-terminal o N-terminal de suero o urinario, calcio urinario, hidroxiprolina, piridinolina urinaria y desoxipiridinolina.

55 Generalmente, se reconoce que una disminución de los niveles de los marcadores bioquímicos que se han mencionado indica que se está reduciendo la resorción ósea y que se está disminuyendo la pérdida de masa ósea. Como alternativa, se puede determinar también una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de fusión de OPG midiendo un cambio en la resistencia mecánica del hueso, en particular un aumento de la resistencia de torsión (retorcimiento) del hueso.

60 Por consiguiente, puede ser necesario que la persona encargada valore la dosis y modifique la ruta de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores que se han mencionado antes. En otras realizaciones, la dosis puede oscilar entre 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 1 µg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg. Típicamente, el especialista clínico administrará la composición hasta alcanzar la

dosis con la que se consiga el efecto deseado. La composición puede administrarse por lo tanto como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de agente de unión selectivo de OPGbp) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o un catéter.

5 Ejemplo 1

Reactivos y ensayos

La diana de exploración utilizada en estos estudios fue preparada a partir de la expresión de ADNc que codifica OPGbp humana de 140 a 317 aminoácidos inclusive, tal como se muestra en la figura 4 del documento PCT WO 98/46751 en una célula hospedadora CHO y se purificó del siguiente modo. Se equilibró una columna de Sefarosa Q (Pharmacia) con Tris 20 mM, pH 8,5. Se aplicó medio acondicionado que había sido valorado también a un pH 8,5, se lavó la columna con tampón Tris y se eluyeron las proteínas con un gradiente NaCl 100-600 mM sobre 20 volúmenes de columna. Se identificaron fracciones que contenían OPLG a través de SDS-PAGE y análisis de mancha de Western. A continuación, se valoraron fracciones que contenían OPGbp a un pH 4,8 y se aplicaron a una columna Sp (Pharmacia) que había sido equilibrada con acetato sódico 20 mM, pH 4,8. Después del lavado, se eluyeron las proteínas con gradiente de NaCl 0-0,3 M, seguido de etapas de NaCl 0,5 M y 1M. Se eluyó OPGbp con todos los tampones, aunque solamente se encontraron activas las fracciones de gradiente de NaCl 0-0,3 M en los bioensayos de estimulación de osteoclasto *in vitro*. El rendimiento fue 40 mg/l. El secuenciado amino-terminal reveló que aproximadamente un 80% de la proteína purificada empezaba con el aminoácido 143 de OPGbp humana, mientras que el 20% restante comenzaba con el aminoácido 147. El producto final utilizado para la exploración de bibliotecas de fagos recibe el nombre de OPGbp[143-317], la forma purificada predominante.

Se prepararon anticuerpos policlonales anti-OPGbp del siguiente modo. Se inyectaron inicialmente en tres conejos New Zealand blancos (Western Oregon Rabbit co., Philomath, OR) cantidades iguales de Hunter Titer Max (CytRx Corp., Atlanta, GA) y OPGbp[143-317]. Se inyectaron 0,2 mg por conejo. Se repitió la misma operación cuatro y seis semanas después. Se realizó extracción de 50 ml de sangre a las siete semanas y una vez a la semana después con un total de seis sangrados. Se purificaron por afinidad los anticuerpos desde el suero de conejos inmunizados en una resina de OpGbp del siguiente modo. Se añadieron 3 ml de resina Actigel Ald (Sterogene) a una columna de 10 ml (Kontes Fex Colum) y se lavaron con 50 ml de PBS. Se añadieron 3 mg de OPGbp[143-317] diluidos en 3 ml de PBS a la columna de Actigel y se agitó suavemente para su mezclado. Se añadieron 0,6 ml de cianoborohidruro de Na 1 M y después se agitó la mezcla durante toda la noche a 4°C. Se lavó la columna con 50 ml de tampón de elución Pierce Gentle (Pierce) seguido de 150 ml de PBS. Se filtraron para esterilización 50 ml de sueros de conejos inmunizados a través de un filtro de 0,45 µm, se añadieron a la columna y se agitó la mezcla durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se dejó en reposo el contenido de la columna y se drenó la fase líquida. A continuación, se lavó la columna con 150 ml de PBS hasta un DO₂₈₀ de 0,002. A continuación, se añadió tampón de elución Pierce Gentle con 1% de ácido acético glacial al 1% a la columna y se recogieron fracciones de 1 ml a intervalos de 10 minutos y se analizaron según DO₂₈₀. Se distribuyeron las fracciones que contenían la cantidad más alta de material de absorción DO₂₈₀ y se dializaron contra dos litros de PBS durante 48 horas. Se produjo un cambio de tampón durante este tiempo.

Se llevaron a cabo los ensayos ELISA en distribuciones de fago eluidos coloando en placa OPGbp[143-317] a 1,5 µg/ml en PBS, pH 8,0 durante 1 hora a temperatura ambiente, en inmunoplasmas Nunc Maxisopr en una batidora. Se añadió una solución de enjuagado de MPBS 2% (Tampón de bloqueo) a las inmunoplasmas, se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente y se descartaron. Se llevó a cabo el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con MPBS al 2%. Se realizaron lavados 5 x utilizando TBS-Tween-20 (0,1%) (TBS; Solución salina tamponada Tris; Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM). Se añadió una valoración de fago utilizando un mínimo de 10¹⁰ fagos/pocillo en tampón de dilución conjugado (0,4% leche deshidratada sin grasa en TBS o 0,4% M-TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados utilizando TBS-Tween-20 (0,1%). Se utilizó conjugado de anticuerpo monoclonal peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-M13 (Pharmacia Piscataway, NJ) en una dilución 1/2000 en MTBS al 0,4% durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo los lavados 5 veces con TBS-Tween-20 (0,1%). Se añadió ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-sulfónico) (ABTS) (Pierce, Rockford, IL) un sustrato colorimétrico para detección a DO₄₀₅. Se llevaron a cabo los controles positivos para la detección de huOPG bp [143-317] en placa por adición de OPG[22-194]-Fc, seguido de fosfatasa anti-Fc-alcalina y sustrato para-nitrofenilfenol (pNPP) para la detección.

Condiciones PCR y cultivo 2xTY-AG

Se llevó a cabo una reacción en cadena de polimerasa típica (PCR) en una placa Thermowell de 96 pocillos. Cada pocillo contenía 20 µl de una mezcla de reacción PCR (2 µl 10 x tampón PCR (Gibco BRL Products, Grand Island, NY), 17,3 µl de agua, 0,2 µl dNTPs (25 mM), 0,2 µl Primer 870-02, 0,2 µl cebador 2182-83 (reservas de cebador 10 pmoles/µl para amplificación por inserto), 0,1 µl de polimerasa Taq]. Se recogieron colonias individuales y se resuspendieron en un pocillo y se superpusieron 20 µl de aceite mineral, se sellaron y después se colocaron en una máquina PCR.

870-02 5'-CCG ACT TTG CAC CTA GTT (SEQ ID NO: 22) 2182-83 5'-TTT GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT (SEQ ID NO: 23)

Se generó una placa por duplicado para preparar cultivos transfiriendo la misma colonia recogida a la posición de pocillo correspondiente en un segundo bloque de 96 pocillos profundos. Se dejaron crecer los cultivos en 0,3 a 1,0 ml 2 x TY-AG (caldo de cultivo 2x TY (16 g bacto-triptona/litro de agua, 10 g extracto de levadura /litro de agua, 5 g NaCl /litro de agua), con un contenido de 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa). Se selló el bloque con una cinta adhesiva permeable al aire, se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos para que bajara el líquido, y se incubó a 37°C a 300 a 350 rpm durante toda la noche para el cultivo. Los cultivos de toda la noche recibieron 150 µl/pocillo de 50% glicerol, se mezclaron y se congelaron a -80°C.

Las condiciones de reacción PCR fueron 40 ciclos de 45 segundos, a 90°C, 45 segundos a 55°C, 1,5 minutos a 72°C, seguido de 72°C de extensión durante 10 minutos. Una vez completada la reacción PCR, se hicieron correr 2,5 a 4,0 µl sobre geles de agarosa al 1% de 25-pocillos con 0,5 µl/ml de bromuro de etidio, utilizando patrones de peso molecular de ADN (Gibco BRL Products, Grand Island, NY, o Stratagene, La Jolla, CA) durante 90 minutos a 90 voltios. Se consideraron solamente insertos de longitud total de más de 1,6 kb.

Se digirieron con BstNI alícuotas 16 µl de reacciones PCR durante 3 horas a 60°C con una mezcla de digestión total de 30 µl que contenía 10 µl de agua, 3 µl de 10X tampón 2 React (GIBCO BRL products), 0,3 µl BSA (10 mg/ml), 0,7 µl BstNI (GIBCO: 10.000 unidades/ml). Se hicieron correr las muestras digeridas en geles de agarosa al 3% de 25-pocillos durante 3,5 horas a 80 voltios.

20 Ensayo de células RAW

Se mezclaron varias concentraciones de muestras de ensayo Fab con una cantidad constante de OPGBp [143-317] humana y se incubaron durante al menos una hora a temperatura ambiente en DMEM, suero bovino fetal al 10% y 1 x mezcla de glutamina-penicilina-estreptomicina. Se indican las concentraciones de muestras Fab y OPGBp para cada experimento. Tras la incubación, se añadió la mezcla a 2 x 10⁴ células RAW 246,7 /pocillo (American Type Culture Collection, Manassas, VA, Accession n.º TIB-71) en una placa de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos. Se cultivaron las células RAW en DMEM con suero bovino fetal al 10% y 1 x glutamina-penicilina-estreptomicina. Al cabo de tres días a 37°C y CO₂ al 5%, se aspiró el medio desde los pocillos y se mancharon las células para determinar la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), un marcador de diferenciación de osteoclasto, por adición de 100 µl por pocillo de tampón citrato 0,1 M con Tritón X-100 al 0,1%, incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, adición de sustrato de paranitrofenilfosfato (pNPP) y tartrato en tampón citrato que contenía Triton X-100 (la concentración de sustrato fue 20 mM pNPP y 335 mM tartrato) e incubación durante 5 minutos más a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción por adición de NaOH hasta una concentración de 0,05 M. La fosfatasa ácida convierte el sustrato pNPP en para-nitrofenol que se detecta por absorbancia a 405 nm. Se trazó el gráfico del cambio de absorbancia a 405 nm en función del log de dosis para los controles y las muestras de ensayo. Se calculó un análisis de varianza (ANOVA) y potencia relativa con un límite de confianza del 95%. Los controles positivos incluyeron diferentes concentraciones de proteína de fusión OPG [22-194]-Fc o una preparación de anticuerpo policlonal anti-OPGBp preincubada con OPGBp [143-317] e incubada con células RAW 264,7 tal como se ha descrito antes.

40 Ensayo de médula ósea

Se llevó a cabo un ensayo de la médula ósea murina para la determinar la formación de osteoclasto, esencialmente, tal como describe Lacey et al., (Cell 93, 165-176 (1988)) y Kong et al., (Nature, 397, 315-323 (1999)). Brevemente, el ensayo es una modificación del ensayo de co-cultivo de médula ósea murina descrito en PCT WO 97/23614 en el que se cultivaron células de médula ósea murinas no-adherentes en medio durante siete días en presencia de OPGBp humana (143-317), pero sin adición de la línea celular de estroma ST2, 1,25 (OH)₂ vitamina D3 y dexametasona. Se detectaron las células que tenían un fenotipo de osteoclasto según la presencia de células TRAP-positivas. Se midió la actividad TRAP en solución y por tinción histoquímica.

Para la detección de la actividad TRAP en solución, se lisaron las células de la médula ósea adultas en tampón citrato 100 mM (Sigma, n.º de cat. 91-5) + 0,1% Triton X-100, pH 5,0, 3-5 minutos. Se añadieron pNPP 20 mM, tartrato 80 mM y citrato 100 mM + Tritón 0,1% X-100, pH 5,0 y se incubaron a temperatura ambiente durante 3-5 minutos y se midieron a 405 nm después de detener la reacción con 50 µl de 500 mM NaOH/pocillo. Una respuesta positiva fue una disminución de la absorbancia dependiente de la concentración a 450 nm desde ~2,0 DO a ~0,6 DO.

Para la tinción histoquímica, se fijaron las células en una solución fijadora a base de formaldehído, después se mancharon con Fast Garnet GBC (solución 2-metil-4-[(2-metilfenil)-azo]bencenodiazonio) + solución fosfato Naftol AS-BI (C₁₈H₂₅BrNO₆P) + solución acetato + solución tartrato), se incubó durante 1 hora a 37°C, después se enjuagó, se secó y se evaluó con el microscopio. Se consideró que una célula que era TRAP positiva y contenía tres o más núcleos (MNC TRAP-positiva) era una célula osteoclastica.

Ejemplo 2

Exploración de biblioteca Fab humana

5 Se obtuvo una biblioteca de aproximadamente 4×10^{10} fragmentos Fab humanos únicos en bacteriofago M13 de Target Quest, NV (Amsterdam, Países Bajos). Los procedimientos generales para la construcción y exploración de bibliotecas Fab humanas se describe en Haard et al., (Advanced Drug Delivery Reviews 31, 5-31 (1998); J. Biol. Chem. 274, 18218-18230 (1999). Se realizó la exploración de la biblioteca para los fragmentos Fab que se unen a OPGbp [143-317] siguiendo los procedimientos que se indican a continuación.

10

Depósito en placa directo en fase sólida

15 Se inmovilizó OPGbp [143-317] tal como se ha descrito anteriormente en una fase sólida utilizando tubos de inmunoensayo Nunc Maxisorb (12 x 75 mm, capacidad 5 ml) por depósito directo en la fase sólida a una concentración de proteína de 1,5 µg/ml en TBS, pH 8,0 (TBS es solución salina tamponada con Tris: Tris 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM) a temperatura ambiente durante 2 horas. Estas condiciones permitieron un 80% de depósito máximo de la fase sólida en 2 horas (máximo en 2 horas seguía no saturado) al mismo tiempo que se retenían las capacidades de unión a OPG [22-194]-Fc. Al cabo de 2 horas de incubación, se lavó el tubo tres veces con PBS. Se bloqueó la diana depositada rellenando el tubo de inmunoensayo con leche deshidratada no grasa al 2% (Marvel o Carnation) en PBS (MPBS) durante 1 a 4 horas a temperatura ambiente, se lavó dos veces, cada una de ellas en PBS-Tween 20 (0,1%) y PBS. Se pre-bloquearon los fagos concentrados con PEG (aproximadamente 10^{13}) en MPBS al 2% para absorber el fago de unión a leche antes de la exposición del fago a la diana en fase sólida. Se incubaron los fagos pre-bloqueados en 4 ml con la diana depositada a temperatura ambiente durante 2 horas (30 minutos de rotación transversal ("end-over-end") y 90 minutos de reposo). Se lavó el contenido unido al tubo 20 veces con PBS-Tween 20 (0,1%) y 20 veces con PBS para eliminar el fago sin unir y reducir la unión no específica. Se eluyeron los fagos desde la fase sólida con elución de fagos total de diez minutos con 1 ml de trietilamina 100 mM (TEA) pH 12, rotación del tubo longitudinal (end-to-end), seguido de neutralización con 0,5 ml de 1 M Tris-HCl pH 7,4. Como alternativa, se recuperaron ligadores de fago específicos por elución con 1 ml de 1 µM OPGbp[143-317] o 1 µM OPG[22-194]-Fc en 0,4% MPBS, pH 8,0 o pH 7,4, respectivamente.

30

35 Se valoraron los fagos eluidos (ligadores) sobre cepa TG1 de *E. coli* (Pharmacia, Piscataway, NJ.). Se llevó a cabo la valoración por duplicado según una modificación del método "Dilución continua" (Huycke et al., BioTechniques 23, 648-650 (1997)) con 10 µl de dilución de fago en caldo de cultivo 2x TY en 90 µl de células TG1 en fase log (A_{600} , 0,2 a 1,0 ODs, se mezclaron y se incubaron 20-30 minutos a temperatura ambiente. Se vetearon horizontalmente 10 µl en una línea, 6 líneas por cada placa petri cuadrada 2xTY-AG (caldo de cultivo 2xTY, que contenía 2% de glucosa, 100 µg/ml ampicilina y 15 g /litro agar), y se incubó durante toda la noche a 37°C.

35

40 Se amplificaron los fagos eluidos (aglutinantes) a través de la infección bacteriana en células TG1. Se inocularon en 25 ml de caldo de cultivo 2 x TY células TG1 de *E. coli* y se cultivaron a 30°C durante más de 12 horas, 270 rpm. Se inoculó el cultivo durante toda la noche 1:100 con 50 ml de caldo de cultivo 2x TY caldo de cultivo, y se desarrolló ~1,5 horas, 270 rpm hasta un DO_{600} de 0,5. Para la amplificación de fago seleccionado, se añadieron 5 volúmenes de células TG1 de *E. coli* exponenciales, 4 volúmenes de caldo 2xTY y 1 volumen de fago eluido (neutralizado) en combinación y se incubó en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Para reducir el volumen para el depósito, se centrifugaron las células a 4.000 rpm y se resuspendió el aglomerado en caldo de cultivo 2 x TY-AG (100 µg/ml ampicilina, 2% glucosa). En la primera vuelta de selección, se depositó la muestra en dos a cuatro placas 16 cm² 2 x TT-G (caldo de cultivo 2 x TY que contenía 2% de glucosa, 100 µg/ml de ampicilina y 15 g de agar) para mantener la diversidad. Para las últimas vueltas de selección, fue suficiente una placa. Se incubaron las placas durante toda la noche a 30°C. Después de un crecimiento durante toda la noche, se añadieron 5 ml de 2xTG-AG a cada placa grande, y se rasparon las bacterias para soltarlas con un dispersador esterilizado. Una vez completada la resuspensión y la concentración por centrifugado a 4.000 rpm, 10 minutos, se transfirió una muestra concentrada a un criotubo Nunc. Se añadió glicerol esterilizado a una concentración final de 15% y se almacenó inmediatamente a -70°C.

50

55 Se resuspendieron las células amplificadas en caldo de cultivo 2 x TY-AG hasta ~0,1 DO y se desarrolló durante 1,5 -2,5 horas a 37°C, 270 rpm, a un DO_{600} de 0,5 y se transfirió (5 ml) a un tubo Falcon de 50 ml que contenía una cantidad apropiada de fago ayudador M13K07 (Gibco BRL Products, Grand Island, NY) con una relación de 20 a 1 de fago a bacteria. Se incubó la mezcla de fagos y bacterias a 37°C durante 30 minutos sin agitación seguido de centrifugado durante 15 minutos, 3.700 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el aglomerado de bacterias en 25 ml de 2xTY-AK (100 µg/ml ampicilina, 25 µl/ml canamicina) y se transfirió a un matraz de 250 ml para incubación durante toda la noche a 30°C con agitación a 270 rpm. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo en un tubo Falcon de 50 ml durante 20 minutos a 3.700 rpm para aglomerar las bacterias. Se añadió al sobrenadante 1/5 del volumen de una solución de polietilenglicol (PEG) (20% PEG 8000, 2,5 M NaCl) y se mantuvo sobre hielo durante al menos 1 hora. Se aglomeraron los fagos durante 20 minutos, 3.700 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el aglomerado en ~1,0 ml de PBS esterilizado y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se microcentrifugó la muestra 2 minutos, ~ 14.000 rpm para eliminar el resto de las bacterias y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se repitió el precipitado de PEG. Se utilizaron los fagos precipitados con PEG

65

concentrados en los ensayos de selección o exploración. El rendimiento normal fue aproximadamente $1-5 \times 10^{13}$ fago desde un cultivo de 25 ml. Para un almacenamiento más prolongado, se añadió glicerol al fago (15% de concentración final) y se almacenaron los fagos a -70°C .

- 5 En este procedimiento se describe una ronda de exploración que comprende las etapas de unión, elución y amplificación. Típicamente, se llevaron a cabo de tres a cinco rondas de exploración con el fin de obtener una distribución de fagos eluidos que se unen a OPGbp [143-317] en un ensayo ELISA a un nivel al menos cuatro veces mayor con respecto al fondo. Una vez completada la exploración, se depositaron en placa los fagos eluidos finales para colonias individuales y se analizó el ADN insertado por PCR de colonia y digestión con BstNI tal como se describe a continuación.

10

Fase en solución

- 15 Se bloquearon previamente los fagos durante 60 minutos en un rotador a temperatura ambiente en MPBS al 2%. Se añadió bucle b-b' de OPGbp biotinilado (500 nM) directamente a la mezcla de fagos equilibrada y se incubó durante 30 minutos a 1 hora en un rotador (transversal) a temperatura ambiente. El péptido de bucle tenía la secuencia [biotina][LC]-TDIPSGSHKVSLSWYHDRG] (SEQ ID NO: 24) en donde se utilizó LC (cadena lineal, es decir $(\text{CH}_2)_5\text{-NH}_2$) para unir la secuencia de bucle b-b' OPGbp con biotina. Se utilizaron perlas Dynabead revestidas con estreptavidina (100 μl por selección en tubos Eppendorf de 1,5 ml) para la captura en fase solución de complejos
- 20 antígeno biotinilado-fago (3 x para selección de antígeno negativo, y 1X para selección de antígeno diana). Se pre-equilibraron las perlas recubiertas con estreptavidina arrastrándolas hacia un lado del tubo utilizando un imán Dynal, se separó el tampón y se resuspendieron las perlas en 1 ml de MPBs al 2%. El equilibrio a temperatura ambiente fue 1 a 2 horas en un rotador transversal.

- 25 Se realizaron tres selecciones negativas en las rondas 2 y 3. Para la selección negativa, se añadieron fagos prebloqueados a un tubo de perlas Dynabeads revestidas con estreptavidina pre-equilibradas en MPBS al 2% y se incubaron durante 30 minutos en un rotador transversal a temperatura ambiente (se repitió dos veces). Se arrastraron las perlas a un lado y se transfirieron los fagos sin unir a un tubo Eppendorf nuevo para su utilización para la selección de antígeno. Se añadió péptido de bucle b-b' huOPGbp biotinilado (500 nM) directamente a la mezcla de fagos equilibrada y se incubó durante 30 minutos a 1 hora en un rotador transversal a temperatura ambiente. Se arrastraron perlas equilibradas a un lado del tubo, se separó el tampón y se resuspendió con la mezcla de péptido biotinilado-fago seguido de incubación durante 15 minutos en un rotador transversal a temperatura ambiente. Se colocaron los tubos en una rejilla magnética durante 1 minuto, se aspiraron y se lavaron las perlas 6x con 1 ml de 2% MPBS-Tween-20 (0,1%), 6 x de 1 ml de PBS-Tween-20 (0,1%) y 2 x con 1 ml de PBS. Se eluyeron los fagos con 1 ml de TEA 100 mM, pH 12 durante 5-10 minutos en un rotador a temperatura ambiente, seguido de neutralización con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7,4.

35

Ejemplo 3

- 40 Identificación de clones Fab que se unen OPGbp

Se infectaron células TG1 de *E. coli* con la distribución de fagos de una ronda de respuesta a ELISA y se recogieron colonias individuales para el análisis PCR. Típicamente, se recogieron de una a cuatro placas de las 96 colonias para cada selección. Se amplificaron los ADNc de Fab por PCR con un grupo específico de cebadores y se analizaron en un gel de agarosa para determinar la longitud del inserto Fab. El inserto Fab tiene una longitud de > 1,6 Kb de longitud completa. Se digirieron también ADNc con la enzima de restricción BstNI y se analizó el patrón de banda por electroforesis en geles de agarosa. Los clones que presentaron insertos de longitud completa PCR de tamaño idéntico y patrones de banda BstNI idénticos en dos o más aislados fueron candidatos para otros análisis. Utilizando los criterios mencionados, se identificaron los siguientes Fabs.

50

Se identificó el patrón "P" de Fab tras la exploración en fase solución utilizando tres rondas de elución con trietilamina, pH 12, seguido de la exploración en fase sólida, tal como se ha descrito antes utilizando una ronda de elución con 1 μM OPGbp [143-317].

- 55 Se identificó el patrón "S" de Fab por exploración en fase solución utilizando tres rondas de elución con trietilamina, pH 12, seguido de exploración en fase sólida tal como se ha descrito antes utilizando dos rondas de elución con 1 μM de OPG[22-194]-Fc.

- 60 Se identificó el patrón "AT" de Fab por exploración en fase sólida tal como se ha descrito antes utilizando cuatro rondas de elución con 1 μM OPG[22-194]-Fc.

Se identificó el patrón "Y" de Fab por exploración en fase sólida tal como se ha descrito utilizando tres rondas de elución con OPGbp[143-317].

- 65 Se prepararon los fagos para colonias individuales que presentaban los patrones AT, Y, P y S de Fab a través del siguiente procedimiento. Se realizaron las preparaciones de plasmidio y se transformaron en células TG1. Los

análisis de PCR confirmaron la transformación de un inserto de longitud completa. Se desarrollaron las células tanto en un bloque de pocillo profundo (0,5 ml de volumen) como en un cultivo de 10 ml. Se rescataron los fagos por infección en una relación 20:1 de fago ayudador M13K07 /células, se hicieron precipitar en PEG 1 vez (como en el protocolo de depósito en placa directo en fase sólida) y se resuspendieron en ~ 200 ul desde un bloque de pocillo profundo de tamaño de pocillo de 2 ml o ~500 ul desde el cultivo de 10 ml en PBS.

Las valoraciones de fago fueron en el intervalo de 10^{11} - 10^{14} fago/ml en el ELISA. Se realizaron las valoraciones en función del volumen utilizando un máximo de adiciones de 50 μ l/pocillo dando un intervalo típico de 10^9 - 10^{11} fago pocillo en un ensayo ELISA. Se llevó a cabo el ensayo ELISA de fago tal como se ha descrito antes. En el ensayo ELISA se utiliza conjugado anti-M13-HRP para la detección de fago unido con ABTs, un sustrato colorimétrico a 405 nm. Un conjugado anti-M13 HRP fue específico para la proteína VIII de recubrimiento principal en el fago. Los valores fueron de determinaciones en un solo punto.

En la figura 1 se muestran los resultados de un ELISA de un clon representativo para cada uno de los patrones principales "AT", "Y", "P" y "S". Los cuatro clones Fab mostraron una reactividad significativa con OPGbp [143-317]. Se secuenciaron todos los miembros de clon de los patrones "AT" y "Y" (27 miembros de 672 clones y 9 miembros de 96 clones, respectivamente) y se encontraron idénticos dentro de sus patrones. Por lo tanto, los miembros del patrón serán representativos de todo el patrón para los patrones "AT" e "Y".

Los patrones "Q" (3 miembros de 96 clones), "X" (3 miembros de 96 clones) y "AB" (2 miembros de 96 clones) también fueron ELISA positivos para OPGbp[143-317] en placa según lo determinó un clon representativo (figura 1). Dado que las señales ELISA fueron considerablemente más bajas que los patrones "AT", "Y", "P" y "S" y estaban representados solamente por dos o tres miembros en los 96 clones, se asumió que tenían Kds en el intervalo μ M y no se siguieron analizando. El patrón "X" fue solamente ELISA positivo cuando la concentración de Tween-20 en los lavados se redujo de 0,1% a 0,01%.

Ejemplo 4

Purificación de Fabs solubles

Se infectaron fagos que contenían Fabs "AT", "Y", "P" y "S" en HB2151 de *E. coli* (Pharmacia, Piscataway, NJ) y se indujo la expresión de fragmentos Fab por adición de IPTG a 1 mM generalmente durante al menos 5 horas, a excepción de que para el patrón Y se redujeron los niveles de IPTG a 0,25 mM. Tras la inducción, se recogieron las células (750 ml) por centrifugado y se liberaron los Fabs desde el espacio periplásmico por choque osmótico.

Se resuspendió el aglomerado total en 8 ml de TES enfriado con hielo (Tris 0,2 M, EDTA 0,5, sacarosa al 17,1%, pH 8,0), se transfirió a un tubo de 50 ml y se incubó durante 5 a 10 minutos en hielo con agitación suave ocasionalmente. Al mismo tiempo, se lavaron tubos vacíos con 8,8 ml TES/H₂O (1:3) para recuperar el resto del aglomerado de células y se añadió a las otras células y se incubó durante otros 20 minutos sobre hielo. Se centrifugaron las células a 14.000 rpm durante 3 minutos y se transfirió el sobrenadante desde el aglomerado de células ligeramente enlodado a otro tubo de 50 ml. Se volvió a centrifugar el sobrenadante a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar la contaminación de células residuales. El sobrenadante recibió el nombre de fracción periplásmica liberada por TES. Se resuspendió el aglomerado bacteriano en 10 ml de TES más MgSO₄ 15 mM, se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó dos veces como en el caso anterior. El sobrenadante recibió el nombre de fracción periplásmica liberada con Mg. Se añadió albúmina de suero bovino (BSA; tipo RIA, Sigma) como vehículo y estabilizante a cada fracción periplásmica hasta una concentración final de 1 mg/ml y se dializó durante toda la noche a 4°C en 2 L con 1 intercambio de tampón de columna Talon (Tris-HCl 20 mM/NaCl 0,1 M, pH 8,5) más inhibidores de proteasa a las concentraciones finales, Pefabloc 0,05 mg/ml, leupeptina 50 nM, aprotinina 0,06 μ g/ml y pepstatina A 0,9 μ g/ml.

Se sometieron los extractos periplásmicos que contenían Fab (liberados con TES y Mg) por separado a la unión por método discontinuo 1 hora agitando a 4°C con 0,8 ml a 1,5 ml (1/20 del volumen de extracto) de resina Talon pre-equilibrada (Clontech), a continuación, lavado por método discontinuo en al menos 2 x volúmenes de 20 columnas de tampón de columna. Se cargó la columna con resina Talon, se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de columna y 2 volúmenes de columna de tampón columna más 50 mM de imidazol para liberar las proteínas unidas no específicamente. Se eluyeron los Fabs purificados con 2 a 3 volúmenes de columna de 200 mM de imidazol, 4% de glicerol. A continuación, se concentraron /intercambiaron los extractos purificados con un Centricon 10 (Amicon, Inc. Beverly, MA) en PBS, pH 7,4 hasta una concentración final de 0,5 a 5 mg/ml. Se determinó la pureza de Fab "AT" soluble en un gel Bis Tris NuPAGE Novex (San Diego, CA) al 10% con tampón de deslizamiento NuPAGE MOPS SDS (no reductor) y tampón de muestra 4x LDS (pH 8,45). Se calentaron muestras Fab purificadas que contenían el tampón de muestra LDS a 70°C durante 10 minutos y se cargaron con 40 ul / línea. Se corrió el gel a 200 voltios, 20 minutos, después se redujo a 50 voltios, ~ 1,5 horas, se manchó con Novex Colloidal Coomassie Blue Stain ~14 h, y se destiñó. Se determinó Fab "AT" soluble para que tuviera más de 98% de pureza.

Ejemplo 5

Actividad de Fabs anti-OPGbp purificadas

- 5 Se analizó la actividad de Fabs "AT" y "Y" solubles purificadas con los siguientes ensayos.

Ensayo de inhibición de la interacción OPGbp/ODAR

10 Se midió la interacción de OPGbp humana [143-317] y su receptor ODAR en un ensayo de transferencia de energía por fluorescencia (FRET). Se añadió una hora de pre-incubación con OPGbp para una mayor sensibilidad. Se construyó un dominio extracelular soluble de ODAR humano como polipéptido de fusión con una etiqueta FLAG amino terminal y una región Fc humana carboxi terminal. La región Fc es reconocida por y se une a alofocianina Fc específica anti-humana de cabra policlonal (APC) que es detectada por absorbancia a 665 nm. Se etiquetó OPGbp [143-317] con Eu2+ que fue detectado por absorbancia a 620 nm. La unión de OPGbp con ODAR en este ensayo
15 impulsa una transferencia de energía fluorescente y es muy sensible para curvas de competencia. Una disminución en la relación de absorbancia A665/A620 indica la inhibición de la unión de OPGbp a ODAR.

Se observó una inhibición dependiente de concentración de la unión OPGbp-Eu con sODAR-Fc para preparaciones por duplicado de Fabs solubles "AT" y "Y". Fab "AT" soluble (preparación A) inhibió la unión de OPGbp con la fusión ODAR-Fc soluble con una Cl_{50} de 550 nM. Fab "Y" soluble la inhibió con una Cl_{50} de 6 μ M. El clon de Fab "AT" 1B5 fue del patrón de 27 miembros predominante desde siete placas de 96 pocillos (todas con la misma secuencia de aminoácido) obtenidas por elución desde la diana OPGbp utilizando una solución de 1 μ M OPG[22-194]-Fc durante 90 minutos. El clon de Fab "Y" 1B4 fue del patrón de 9 miembros predominante desde una placa de 96 pocillos (todas con la misma secuencia de aminoácido) desde el tamiz OPGbp depositado en placa optimizado utilizando una elución de OPGbp 1 μ M durante 90 minutos. Una segunda purificación del clon de Fab "AT" 6F11 (designada
20 preparación B) produjo una Cl_{50} similar de 440 nM para PBS y una Cl_{50} de 354 nM para TBS. Una segunda purificación de Fab "Y" (preparación B) produjo una Cl_{50} similar de 4,1 μ M para TBS. El control positivo fue OPGbp [143-317] en TBS o PBS con las IC_{50} s correspondientes de 0,89 y 0,93 nM, respectivamente. De manera similar, se obtuvieron las Cl_{50} con las preparaciones "A" y "B" por duplicado. Los resultados de la preparación "B" de Los Fabs
25 "AT" y "Y" en TBS se muestran en la figura 2.

Ensayo de médula ósea

35 Se purificaron Fabs "AT", "Y" y "P" solubles como en el ejemplo 4 seguido de dos etapas de separación de endotoxina sucesivas utilizando una columna de afinidad de polimixina (~1 ml; BioRad, Hercules, CA) en PBS a temperatura ambiente con arreglo a las instrucciones del fabricante, a excepción de lo que se señala a continuación. Para aumentar la probabilidad de eliminación de endotoxina unida a Fab, tras cada adición de muestra, se reciclaron alícuotas 100 μ l a 150 μ l desde el fondo y la parte superior de la columna cada 5 minutos durante 2 a 2,5 horas. Se eluyó Fab con 3 volúmenes de columna de PBS con glicerol al 4%.

40 Se sometieron a ensayo las muestras para determinar la endotoxina utilizando el sistema de detección de E-toxato (lisado de amebocitos de limulus) (Sigma, St. Louis MO) con arreglo a las instrucciones del fabricante. A continuación, se esterilizaron por filtración las muestras (0,2 μ m). Se desnaturalizó Fab "PE" tras la purificación y se unió escasamente a OPGbp [143-317] en un ensayo ELISA. Se utilizó como control negativo en estos experimentos.

45 El formato de ensayo incluye una pre-incubación de 1 hora del Fab anti-OPGbp con 10 ng/ml de OPGbp humano [143-317] (concentración de células final por pocillo). Se llevaron a cabo los ensayos TRAP en solución utilizando sustrato cromogénico pNPP. En la figura 3 se muestran los resultados. Fab "AT" dio una disminución del 50% (Cl_{50}) a 57,8 nM; Fab "Y" dio una disminución del 50% a 212 nM; Fab "P" dio una disminución del 50% a 1,5 μ M. Se utilizó un peso molecular de Fab estimado de 50.000 en estos cálculos para dar un factor de conversión de 1 μ g/ml = 20 nM.

50 Las Cl_{50} tal como se determinaron por tinción histoquímica TRAP fueron similares a las determinadas en el ensayo pNPP.

Ensayo de células RAW

55 En la figura 4 se muestran los efectos de añadir Fabs "AT", "Y" y "P" solubles al ensayo de células RAW.

60 El punto 50% para el gráfico fue tomado como 1,65 DO_{405} nm. Fab "AT" tiene una Cl_{50} de 15 μ g/ml, 300 nM (suponiendo un peso molecular Fab de 50.000). Fab "Y" tiene una disminución de la señal a 2,15 DO_{405} desde 2,5 DO_{405} , un punto 80%. Por extrapolación, un DO_{405} al punto de 50% de 1,65 para Fab "Y" se alcanzaría a ~400 μ g/ml x 20 = ~8 μ M. "P" no presenta ninguna reactividad detectable en el ensayo.

65

Ejemplo 6

Secuenciado y análisis de clones Fab

5 Las secuencias de ADN y aminoácido previstas para las cadenas ligeras de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se presentan en las figuras 5, 6, 7 y 8, respectivamente. Las secuencias de ADN y aminoácido previstas para cadenas pesadas de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se presentan en las figuras 9, 10, 11 y 12, respectivamente. La figura 13 presenta una matriz de comparación de la secuencia de aminoácido de la cadena pesada y ligera, respectivamente de los cuatro clones de patrón Fab predominantes en función de la identidad y la similitud. Se obtuvieron la identidad y similitud o bien con programa GCG o bien se calculó a mano. Las secuencias de cadena pesada de Fabs "AT" y "Y" tienen la pareja más próxima ya que difieren en un solo aminoácido (cambio conservador) y por tanto tienen una identidad de 99,6% y una similitud de 100%. Se compararon las secuencias de aminoácido de cadena ligera entre los cuatro patrones de arriba tanto la identidad como la similitud entre sí. Fabs "AT", "Y" y "P" presentaron una identidad de al menos 85% y una similitud de al menos 89%. El patrón "S" fue el más disimilar al ser de la familia lambda V más rara.

En la figura 14 se muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Los Fabs "AT" e "Y" tuvieron idénticas secuencias de aminoácido de cadena pesada en CDR1, CDR2 y CDR3. La CDR1 de cadena pesada de Fabs "PE" y "S" tenían 3 restos de aminoácidos idénticos a los de la secuencia CDR1 "AT" e "Y". La secuencia de CDR2 de "P" y "S" presentó una mayor identidad entre sí que con la secuencia CDR2 de "AT" e "Y". Las cadenas ligeras de Los Fabs "AT" e "Y" presentaron longitudes idénticas a las de CDR1, CDR2 y CDR3. Las CDR 1 y 3 de cadena ligera de patrones "AT" e "Y" presentaron identidad en 7 de 11 Restos (64%) y 3 de 5 Restos (60%) respectivamente. Si bien la CDR2 de cadena ligera de patrones "AT" e "Y" no presentan identidad entre sí, cada uno de ellos contiene parte de la secuencia de consenso para la CDR2 de cadena ligera. Cuando se combinaron los primeros 4 restos del patrón "AT" con los últimos 3 restos del patrón "Y", se obtuvo la cadena ligera CDR2 del patrón "P". La cadena ligera CDR3 puede variar de longitud desde 5 a 25 Restos. Por lo tanto, las CDR3 de cadena ligera obtenidas en los patrones "AT", "Y" y "P" es muy corta. El más único de los cuatro clones de patrón predominante fue Fab "S".

En la figura 15 se muestra una comparación de las clases Fab representadas en los cuatro patrones predominantes. Estos resultados fueron obtenidos del análisis de gráfico de ADN V-Base. Según lo esperado los Fabs "AT" e "Y" fueron de la misma familia VH1 (familia 1 pesada variable) con las mismas regiones VDJ (Variable, diversidad y unión). Los Fabs "AT" e "Y" pertenecen a diferentes familias de cadena ligera. Los Fabs "P" y "S" pertenecen a la misma familia de cadena pesada VH3, pero a diferentes familias de cadena ligera. Todas las cadenas pesadas tienen las mismas regiones de unión JH4b.

En las figuras 16-18 se muestra un alineamiento de las secuencias Fab y las secuencias de línea germinal correspondientes para las cadenas pesadas y, en las figuras 19-22 para las cadenas ligeras. Los cambios en las cadenas pesada y ligera de "AT", "Y", "P" y "S" son el resultado de metástasis somática natural que tiene lugar en las secuencias de línea germinal de anticuerpo durante la respuesta a anticuerpo. Las regiones variables de las cadenas pesadas "AT" e "Y" (Los aminoácidos 127 amino terminales de las figuras 9 y 10, respectivamente) tuvieron cambios de aminoácido 17 y 18 respectivamente, en comparación con las secuencias de línea germinal VDJ correspondientes. La región variable de la cadena pesada "P" (los aminoácidos 117 amino terminales en la figura 11) tiene los cambios de aminoácido 16 en comparación con la secuencia de línea germinal VDJ correspondiente. La región variable de la cadena pesada "S" (los aminoácidos 124 amino terminales de la figura 12) tuvieron los cambios de aminoácido 14 en comparación con las secuencias de línea germinal. La región variable de la cadena ligera "AT" (Restos 6-108 en la figura 5) tuvo los cambios de aminoácido 16 en comparación con la secuencia de línea germinal VJ correspondiente; la cadena ligera "Y" (Restos 6-108 en la figura 6) tuvo cambios de aminoácido 14; la cadena ligera "P" (Restos 5-108 en la figura 7) tuvo los cambios de aminoácido 14; y la cadena ligera "S" (Restos 5-112 en la figura 8) tuvo los cambios de aminoácido 12. En general, las diferencias de aminoácido se dieron con mayor frecuencia en las regiones CDR3 de las cadenas tanto pesada como ligera.

Ejemplo 7

55 Clonación y expresión de anticuerpos OPGbp humana de longitud completa

Se convirtieron clones Fab en anticuerpos de longitud completa siguiendo los procedimientos que se indican a continuación.

60 Construcción de pDSR α 19:hCH

Se digirió el plasmidmio pDSR α 19: EPO con Hind III y SaI para eliminar la región de codificación para eritropoyetina. Se utilizó el plasmidio pCRBluntCH1-3 que contenía los dominios C_{H1}, bisagra, C_{H2} y C_{H3} de IgG humana insertados en el vector pCRBlunt (Invitrogen) para obtener un dominio constante IgG1 humano de 1,4 kb.

65 Se digirió pCRBluntCH1-3 con HindIII y SaI y se insertaron las secuencias de dominio constante en pDSR α 19 para generar pDSR α 19: hCH

Construcción de pDSR α 19: AT-VH21

Se clonaron cuatro ADN de cadena pesada Fab anti-huOPGbp en pDSR α 19: hCH para convertir los Fabs en IgGs de longitud completa. La construcción de un plasmidio que codifica cadena pesada "AT" se describe en el presente documento. Se clonaron las otras cadenas pesadas Fab utilizando procedimientos similares. Para generar Fab con una secuencia de señal, se llevó a cabo PCR en tres etapas. En la primera, se utilizaron los cebadores 2249-25 y 2248-22 con la plantilla de ADNc Fab. Las condiciones fueron: 94°C durante 1 minuto, (95°C durante 3 segundos, 50°C durante 1 minuto, 68°C durante 1 minuto) durante 20 ciclos, 68°C durante 10 minutos, con Pfu polimerasa y el tampón y los nucleótidos apropiados. A continuación, se amplificó el producto PCR con los cebadores 2209-21 y 2248-22 seguido de la amplificación con los cebadores 2209-20 y 2248-22. Se limpió el producto PCR final, se cortó con HindIII y BsmBI, y se purificó con gel. Este fragmento contiene el Fab con un sitio 5'-Kozak (iniciación de traducción) y la siguiente señal de secuencia de señal para expresión de mamífero de la cadena pesada "AT" de Fab:

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 25)

Esta secuencia de señal se designa la secuencia de señal VH2₁.

Se digirió el plasmidio pDSR α 19: hCH con HindIII y BamBI para eliminar el poliligador antes de los dominios C_H1-3 de IgG y se insertó el producto PCR Fab para generar pDSR α 19: AT-VH21.

Cebadores:

```

                HindIII Kozak
2209-20 5'-CAGAAGCTTAGACCACC ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC T-3'
(SEQ ID NO: 26 Y 27)
                M E W S W V F L F

2209-21 5'-G AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACG ACT GGT GTC CA-
3' (SEQ ID NO: 28 Y 29)
                S W V F L P F L S V T T G V

2249-25 5'-TCA GTA ACG ACT GGT GTC CAC TCA CAG GTC CAG CTG GTG CAG-3'
(SEQ ID NO: 30 Y 31)
                S V T T G V H S Q V Q L V Q

                BsmBI
2248-22 5'-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTGACC AGG GTG-3' (SEQ ID NO: 32)

```

Construcción de pDSR α 19: AT-L

Se clonaron los ADN de cadena ligera Fabs "AT", "Y", "P" y "S" en pDSR α 19 para convertir los Fab en anticuerpos de longitud completa. Se describe aquí la construcción de un plasmidio que codifica la cadena ligera "AT". Se clonaron los otros Fab utilizando procedimientos similares. Para generar Fab "AT" con una secuencia de señal, se llevó a cabo la PCR en tres etapas. En la primera, se utilizaron los cebadores 2233-50 y 2233-51 con la plantilla de ADNc Fab. Las condiciones de PCR fueron: 94°C durante 1 minuto (95°C durante 30 segundos, 50°C durante 1 minuto, 68°C durante 2 minutos) durante 20 ciclos, 68°C durante 10 minutos con Pfu polimerasa y el tampón y los nucleótidos apropiados. A continuación, se amplificó el producto de PCR con los cebadores 2148-98 y 2233-51 seguido de la amplificación con los cebadores 2148-97 y 2233-51. Se limpió el producto PCR final, se cortó con HindIII y Sa1I, y se purificó con gel. Este fragmento contiene el Fab con un sitio 5' Kozak (iniciación de la traducción) y la siguiente secuencia de señal para expresión de mamífero de la cadena ligera de "AT":

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 33)

Esta secuencia de señal se designa secuencia de señal "ligera".

Se digirió el plasmidio pDSR α 19: EPO con HINDIII y Sa1I para eliminar el gen EPO antes de insertar el producto de PCR de cadena ligera de IgG para generar pDSR α 19: AT-L.

Cebadores:

HindIII Kozak

2148-97 5'-CAG**AAGCTT**GACCACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GG-
3' (SEQ ID NO: 34 Y 35)
M D M R V P A Q L L

2148-98 5'-CC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA TTG TGG TTG AGA GGT GCC AGA
T-3' (SEQ ID NO: 36 Y 37) A Q L L G L L L L
W L R G A R

2233-50 5'-G TGG TTG AGA GGT GCC AGA TGT GAA ATT GTG ATG ACA CAG TCT C-
3' (SEQ ID NO: 38 Y 39)
W L R G A R C E I V M T Q S

Sali

2233-51 5'-TTTGGAC**CTCGAC** TTA TTA ACA CTC TCC CCT G-3' (SEQ ID NO: 40 &
41)
* * C E G R

Construcción de pDSRα19: AT-tPA

- 5 Se construyeron los vectores de expresión para la producción de cadenas pesadas de longitud completa "AT", "Y", "P" y "S" tal como se ha descrito anteriormente, a excepción de que se modificaron los cebadores para introducir la siguiente secuencia de señal:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSRGRFRR (SEQ ID NO: 42)

- 10 Esta secuencia de señal se designa la secuencia de señal "tPA-RGR".

Construcción de pLDH-AT

- 15 Se construyó el vector de expresión que incluía las cadenas pesada y ligera de "AT". Se digirió el plasmidio pDSRα19: AT-Vh21 con AatII y NdeI y se cargaron los extremos con T4 ADN polimerasa. Se purificó con gel el fragmento que contenía el cassette de expresión de cadena pesada "AT" (secuencia de codificación de cadena pesada "AT" flanqueada por el promotor y el sitio de poliadenilación desde pDSRα19) y se ligó con pDSRα19: AT-L que había sido linearizado con NheI, cargado con T4 ADN polimerasa y desfosforilado con fosfatasa alcalina. El cassette de expresión de cadena pesada se encontraba en la misma orientación de transcripción que la cadena ligera y los genes DHFR.
- 20

Preparación de anticuerpo

- 25 Se transfectaron los vectores de expresión que contenían ADNc de codificación de anticuerpos de longitud completa de cadena pesada y ligera "AT", "Y", "S" y "P" (o bien en vectores separados o bien en un único vector) en células CHO y se cultivaron en condiciones que permitieron la expresión de cadenas pesada y ligera y la secreción en el medio de células. Se filtraron los medios acondicionados a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm (Corning, Acton, MA) y se aplicó a columna de sefaroza de proteína G (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) que había sido equilibrada con PBS – solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin cloruro cálcico y sin cloruro de magnesio (Gibco BRL Products, Grand Island NY). Tras la aplicación de muestra se lavó la columna con PBS hasta que la absorbencia a 280 nm alcanzó la línea de referencia. Se consiguió la elución de proteína utilizando glicina 100 mM, pH 2,5. Se recogieron fracciones y se neutralizaron inmediatamente por adición de Tris-HCl 1M, pH 9,2. Se detectaron los anticuerpos con geles de SDS-poliacrilamida visualizados por tinción de Commassie.
- 30
- 35

Se distribuyeron las fracciones que contenían anticuerpo, se concentraron y se diafiltraron en PBS utilizando o bien Centricon 10 (Amicon) o bien, para volúmenes más grandes Centriprep 10 (Amicon).

- 40 El anticuerpo aislado se caracterizó por filtración de gel en Superose 6 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se demostró que corría como una IgG monomérica.

Ejemplo 8

- 45 **Análisis BIAcore de Fab y unión de anticuerpo a OPGbp**

Se determinaron la constante de unión (Kd), constante de velocidad de encendido (ka) y constante de velocidad de apagado (kd) para los Fabs "AT" e "Y" y se determinó el anticuerpo "AT" mediante técnicas de resonancia de plasmón superficial (BIAcore, Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey) cuyos resultados se muestran en la tabla II. Se prepararon Fabs tal como se ha descrito en el ejemplo 4 y se preparó anticuerpo "AT" tal como se ha descrito en el ejemplo 7. Se inmovilizó OPGbp en un CM5-chip por acoplado con amina normal. Se determinaron las constantes de velocidad y Kd con el programa informático BIOEVALUATION 3.0 (Pharmacia).

50

TABLA II
Análisis BIAcore de Fabs "AT" e "Y" y anticuerpo "AT"

	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
Fab "Y"	$9,44 \times 10^5$	$5,91 \times 10^{-3}$	594
Fab "AT"	$2,2 \times 10^6$	0,31	140
"AT" Ab (147 RU)	$5,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-3}$	0,42
"AT" Ab (80 RU)	$8,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^{-3}$	0,33
"AT" Ab (47 RU)	$7,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^{-3}$	0,43

5 La afinidad de unión de Fab "AT" aumentó de aproximadamente 140 nM a aproximadamente entre 0,33 y 0,43 nM, o aproximadamente 350 a 400 veces más, cuando se añadió la región constante de IgG1 Fc como se describe en el ejemplo 7

Ejemplo 9

10 Actividad de anticuerpos anti-OPGbp

Ensayo de células RAW

15 Se sometieron a ensayo preparaciones de anticuerpo "AT" designadas 405, 406 y 407 en un ensayo de células RAW tal como se ha descrito en el ejemplo 1. "AT" 405, "AT"406 y "AT"407 difirieron solamente en las secuencias líder utilizadas para expresión ("AT" 405 fue expresado utilizando la secuencia de señal "ligera", "AT"460 utilizó la secuencia de señal tPA-RGR y "AT"407 utilizó la secuencia de señal VH21). Los anticuerpos maduros purificados fueron idénticos en cada preparación. En la figura 23 se muestran los resultados.

20 Las Cl_{50} para "AT" 405, "AT" 406 y "AT"407 fueron 20,1 nM, 60,3 nM y 21,4 nM, respectivamente, que corresponden a 3,0 ug/ml, 9,0 ug/ml y 3,2 ug/ml, respectivamente (presuponiendo un peso molecular de 150.000). Los controles positivos de OPG[22-194]-Fc y anticuerpo policlonal anti-OPGbp fueron a 33 ng/ml y 150 ng/ml, respectivamente.

25 La diferencia en Cl_{50} en el ensayo de células RAW del fragmento Fab "AT" fue 300 nM en comparación con aproximadamente 20 nM para la longitud completa "AT", o aproximadamente 15 veces más para el anticuerpo de longitud completa "AT". Teniendo en cuenta las diferencias en las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos (150 ng/ml/60 ng/ml = 2,5 veces), el aumento en la avidéz de la función celular para el anticuerpo de longitud completa "AT" fue aproximadamente $15 \times 2,5 = 37,5$ veces.

Ensayo de médula ósea

30 En la figura 24 se muestran los efectos de la adición de preparaciones de "AT"405 o "AT"407 al ensayo de médula ósea murina. Las Cl_{50} para "AT"405 y "AT"407 fueron 2,15 ug/ml (14,4 nM) y 1,85 ug/ml (12,5 nM), respectivamente (peso molecular = 150.000). Un anticuerpo policlonal anti-OPGbp de rata inhibió la formación TRAP con una Cl_{50} de ~50 ng/ml.

35 En un experimento por separado, se sometió a ensayo "AT"406 en el ensayo de co-cultivo de médula ósea e inhibió la formación TRAP con una Cl_{50} de 2,35 ug/ml (14,4 nM) asumiendo un peso molecular de anticuerpo de 150.000 (véase la figura 25).

40 La diferencia en la Cl_{50} en el ensayo de médula ósea para el fragmento Fab "AT" fue aproximadamente 50 nM en comparación con aproximadamente 13 nM para anticuerpo de longitud completa "AT" o un aumento de 3,85 veces más. Teniendo en cuenta las diferencias de las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos (50 nM /9 nM = 5,55 veces), la ganancia aproximada de avidéz de función celular a partir del anticuerpo de longitud completa "AT" fue aproximadamente $3,85 \times 5,55 = 21,4$ veces.

45 Se fusionaron también ADNc que codificaban Fab "Y", "P" y "S" para secuencias CH1, CH2, y CH3 de IgG1 humana tal como se describe en el ejemplo 7 y se transfectaron en células CHO. Se expresaron los anticuerpos resultantes y se purificaron desde medio acondicionado y se eliminó la endotoxina como en el caso anterior. Se sometieron a ensayo los anticuerpos de cadena ligera "S" e "Y" (que recibieron el nombre de "S ligero" e "Y ligero") en el ensayo de médula ósea, mostrándose los resultados en la figura 26. Los anticuerpos "S ligero" e "Y ligero" fueron expresados utilizando las secuencias líder de cadena ligera correspondientes y se designaron "S" 435 e "Y" 429 respectivamente. "Y" 429 ("Y ligero") tenía una Cl_{50} de 23 ug/ml o 154 nM. "S" 435 ("S ligero") no presentó suficiente actividad para una determinación de una Cl_{50} .

55 "Y Campath" y "P ligero" fueron la secuencia Hu-IgG1 "Y" y "P", respectivamente, con la secuencia líder para la cadena "Campath" y "ligera" y se designaron "Y" 442 y "P" 444, respectivamente. "Y" 442 ("Y Campath") tenía una Cl_{50} de 20 ug/ml o 134 nM. "P" 444 ("P ligera") no presentó una actividad detectable (véase la figura 27).

60

La diferencia en la Cl_{50} en el ensayo de la médula ósea del fragmento "Y" Fab fue 212 nM en comparación con 134-154 nM para el anticuerpo de longitud completa "Y" o un aumento de aproximadamente 1,38 a 1,58 veces. Teniendo en cuenta las diferencias de las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos (50 nM/9 nM = 5,55 veces), la ganancia aproximada en la avidéz de la función celular desde "Y" Fab a anticuerpo de longitud completa "Y" fue aproximadamente $(1,38 \text{ a } 1,58) \times 5,55 = 7,7 \text{ a } 8,8$ veces o aproximadamente 8 veces más.

Ejemplo 10

Identificación de epítipo para anticuerpo "AT" sobre OPGbp

Producción de OPGbp murina variante

Se produjo OPGbp [143-317] humana tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Se produjo OPGbp [158-316] murina que contenía los restos de aminoácidos 158 a 316 tal como se muestra en la figura 1 de PCT WO 98/46751 precedido de un resto de metionina N-terminal introducido en *E. coli* y se purificó desde la fracción soluble de bacterias, tal como se ha descrito anteriormente (Lacey et al., Cell. 93, 165-176 (1998)). Se generó OPGbp[158-316] FLAG-murino por introducción de restos de ácido nucleico que codificaban una metionina N-terminal seguido de una secuencia de etiqueta FLAG (DYKDDDDKKL (SEQ ID NO: 99)) fusionada con el extremo N de los Restos 158-316, tal como se muestra en la figura 1 de PCT WO 98/46751 utilizando métodos conocidos entre los expertos en la materia. Se clonó la molécula FLAG-OPGbp [158-316] en el vector de expresión de bacteria pAMG21 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tenía el número de acceso 98113).

Se construyó una variante de polipéptido OPGbp [158-316] FLAG-murina en donde se habían sustituido los restos de aminoácidos SVPTD en las posiciones 229-233 inclusive, tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) de WO 98/46751 con los restos de aminoácidos correspondientes DLATE en las posiciones 230-234 inclusive, tal como se muestra en la figura 4 (SEQ ID NO: 3) de WO 98/46751. El constructo resultante que se denomina "OPGbp[158-316]/DE FLAG-murino" tiene la secuencia de ácido nucleico y proteína que se muestra en la figura 28. Los cambios en la secuencia de aminoácido se localizan en una región de OPGbp comprendida entre las regiones D y E. La figura 29 presenta una comparación de las secuencias de aminoácido murina, humana, y variante DE murina en esta región. Los cambios de secuencia en la variante murina son S229D, V230L, P231A y D233E con la T en la posición 234 invariable. Las secuencias de flanqueo en esta región son virtualmente idénticas entre OPGbp murina y humana.

Se construyó esta molécula utilizando una reacción PCR de dos etapas, comprendiendo la primera etapa dos reacciones PCR por separado, designadas reacción A y reacción B. tanto para la reacción A como para la reacción B se utilizó ADN OPGbp[158-316] pAMG21-FLAG murino como plantilla para PCR. La reacción A empleó oligonucleótidos #2640-90 y #2640-91 para PCR, mientras que la reacción B empleó oligonucleótidos #2640-92 y 2640-93. Se llevó a cabo el termociclado y se purificaron los productos de PCR de las reacciones A y B desde un gel de agarosa aplicando los métodos disponibles en la técnica. La reacción de PCR en segunda etapa, designada reacción C, empleó productos de PCR de reacción A y reacción B purificados como plantilla y oligonucleótidos #2640-90 y #2640-93 como cebadores. Tras el termociclado, se clonó el producto de la reacción C en vector de clonación pCRII-TOPO (invitrogen) y se electroporó en células DH10b (Gibco) utilizando los métodos proporcionados por el fabricante. Se seleccionaron clones y se confirmó la secuencia que verificaba que las mutaciones introducidas tenían como resultado un cambio de la secuencia de aminoácido SVPTD en OPGbp [158-316] murina en DLATE. La secuencia verificó que se había digerido entonces ADN con NdeI y XhoI, se había purificado y se había subclonado en el vector de expresión bacteriana pAMG21 para dar lugar al plásmido pAMG1-FLAG-murino OPGbp[158-316]/DE.

2640-90: CCTCTCATATGGACTACAAGGAC (SEQ ID NO: 100)

2640-91: AGTAGCCAGGTCTCCCGATGTTTCATGATG (SEQ ID NO: 101)

2640-92: CTGGCTACTGAATATCTTCAGCTGATGGTG (SEQ ID NO: 102)

2640-93: CCTCTCCTCGAGTTAGTCTATGTCC (SEQ ID NO: 103)

Se cultivó el hospedador GM94 de *E. coli* (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de acceso 202173) que contenía el plásmido pAMG21-FLAG-murino OPGbp [158-316]/DE en medio 2x YT hasta una fase de crecimiento exponencial y se indujo para que expresara proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG-murina por adición de autoinductor v. Fisher sintético a 100 ng/ml. Aproximadamente 3-6 horas después de la inducción, se aglomeraron las células y se purificó proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG murina recombinante desde la fracción soluble de *E. coli* utilizando los métodos descritos en Lacey et al., *ibid*.

Unión de anticuerpo "AT" a OPGbp[143-317] humana, OPGbp[158-316] murina y OPGbp[158-316]/DE FLAG-murina

Se recubrieron placas Costar E.I.A./R.I.A. (Flat Botton Hig Binding, Cat. # 3590) con 100 μ l/pocillo de proteína OPGbp[143-317] humana, proteína OPGbp[158-316] murina y proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG-murina a 3 μ g/ml en PBS, durante toda la noche a 4°C con agitación. Tras toda la noche de incubación, se sacaron las

soluciones de proteína de la placa y se añadieron 200 µl de suero de pollo al 5% (Gibco/BRL cat # 16110-082) en PBST (PBS más 0,05% Tween 20) a cada pocillo de la placa y se incubaron las placas a temperatura ambiente (RT) durante 90 minutos con agitación. Tras la incubación y el bloqueo se lavaron las placas 4 veces con solución de lavado 1 X K-P en dH₂O (cat# 50-63-00, Kirkegaard & Perry Laboratories) y se secaron. Se diluyó en serie el anticuerpo "AT" purificado o la proteína OPG[22-194]-Fc humana 1:1 desde 2 µg/ml descendientemente hasta 1,953 ng/ml en PBST y se añadieron 100 µl/pocillo a los pocillos apropiados de la placa de microvaloración recubierta con proteína OPGbp[143-317] humana, OPGbp[158-316] murina o OPGbp[158-316]/DE FLAG-murina. Se incubaron las placas durante tres horas a temperatura ambiente, con agitación, se lavaron cuatro veces con solución de lavado 1 x K-P y se secaron. Se diluyó IgG anti-humana de cabra (Fc) (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-036-098) 1:5000 en suero de pollo al 5% en PBST y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 1,25 horas a temperatura ambiente con agitación, se lavaron seis veces con solución de lavado 1 X K-P y se secaron. Se añadieron 100 µl de sustrato ABTS sin diluir (Kirkegaard & Perry; cat · 50-66-00) a cada uno de los pocillos y se incubó el plato a temperatura ambiente hasta que se reveló suficiente color azul-verde. Se detuvo el revelado del color por adición de 100 µl de SDS al 1%. Se llevó a cabo la cuantificación del revelado de color utilizando una lectora de placa de microvaloración con detección a 405 nm.

En la figura 30 se muestran los resultados de EIA. El anticuerpo "AT" se une a OPGbp[143-317] humana pero no muestra una unión detectable a OPGbp [158-316] murina por encima del intervalo de concentración analizado. No obstante, el anticuerpo "AT" se une tanto a OPGbp[158-316]/DE FLAG-murina como OPGbp[143-317] humana en las condiciones de ensayo mencionadas. Se concluyó que los cambios de aminoácido en OPGbp[158-316]/DE murino en comparación con OPGbp[158-316]/DE murina tenían relación con la unión de anticuerpo "AT".

Se sometió a ensayo OPGbp[143-317] /DE FLAG-murino para determinar la actividad en el ensayo de células RAW tal como se ha descrito en el ejemplo 1 y se observó que tenía ED50 similar para la formación de osteoclasto con respecto a OPGbp[143-317] humana, lo que indica que la variante DE es activa para promover la actividad de osteoclasto *in vitro*. Por consiguiente, la unión de anticuerpo "AT" a OPGbp[158-316]/DE murina probablemente inhibe la formación de osteoclasto.

El epítipo del anticuerpo "AT" está localizado en una región de OPGbp humana que incluye al menos restos de aminoácidos DLATE (Restos 230 a 234 de OPGbp humana tal como se muestra en la figura 4 de PCT WO98/46751).

Ejemplo 11

35 Construcción de variantes de Fab "AT" y variantes de anticuerpo

Se utilizaron tres métodos para generar variantes CDR de anticuerpo "AT"; mutagénesis de exploración de alanina de la región CDR3 de cadena pesada; mutagénesis de sustitución de sitios seleccionados en la región CDR3 de cadena pesada y mutagénesis de inserción de la región CDR3 de cadena ligera.

40

Variantes de alanina de CDR3 de cadena pesada

Se llevó a cabo la mutagénesis de exploración de alanina en la región CDR3 de la cadena pesada AT. La secuencia de aminoácido para la exploración de alanina fue:

45

DSSNMVRGBIIIAYFDY (SEQ ID NO: 104)

Se sometieron a anelación los cebadores 12 y 15 entre sí y se extendieron por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en las siguientes condiciones: 25 pmoles para cada cebador, 6 ciclos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 55°C y 20 segundos a 74°C.

50

**12) 5' AGA GAT TCC TCA AAT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA
GCG (SEQ ID NO: 105)**

55

15) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT TCC CCG AAC (SEQ ID NO: 106)

El producto de esta reacción recibe el nombre de plantilla A.

Se extendió la plantilla A por PCR utilizando los cebadores 22 y 14 en las siguientes condiciones: 0,5 microlitros de plantilla A, 10 pmoles cada cebador, 15 ciclos de 30 segundos a 94°C, 2 minutos a 43°C, 20 segundos a 74°C.

60

11) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC TCA AAT ATG (SEQ ID NO: 107)

14) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA GTA CGC (SEQ ID NO: 108)

El producto PCR de esta reacción recibe el nombre de plantilla B.

Se generaron variantes de alanina de CDR3 utilizando la plantilla A o la plantilla B. Se realizaron dos vueltas de PCR (20 ciclos de 94°C durante 20 segundos y 74°C durante 40 segundos) utilizando un cebador que contenía el codón alanina deseado. El cebador que contenía el codón de alanina se encontraba en la orientación de avance para los Restos CDR3 (la numeración sigue el sistema Kabat, ver Kabat et al., Sequences de Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 4ª edición (19991) D95, S96, V100, R100a. El cebador que contenía el codón de alanina se encontraba en la orientación invertida para los Restos S97, N98, M99, G100b, I100c, I100d, I100e, Y100g, Y100h, F100i, D101, Y102.

A continuación, se realizaron las reacciones de mutagénesis con hasta tres reacciones de extensión utilizando seis cebadores comunes. Estas reacciones extendieron el producto para abarcar toda la región CDR3 hasta los sitios de restricción de flanqueo únicos BgqII y BstEII, e incluyéndolos.

A continuación, se muestran los cebadores para la sustitución de alanina en la orientación 5' a 3'. El codón de alanina aparece en negrita.

60) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA **GCT** TCC TCA AAT ATG GTT
CGG (SEQ ID NO: 109)

59) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT **GCC** TCA AAT ATG GTT
CGG (SEQ ID NO: 110)

58) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT **TGC** GGA ATC TCT CGC
ACA GTA (SEQ ID NO: 111)

57) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT **AGC** TGA GGA ATC TCT CGC
ACA (SEQ ID NO: 112)

56) 5' AAT AAT TCC CCG AAC **GGC** ATT TGA GGA ATC TCT CGC
(SEQ ID NO: 113)

55) 5' GAT TCC TCA AAT ATG **GCT** CCG GGA ATT ATT ATA GCG
(SEQ ID NO: 114)

54) 5' GAT TCC TCA AAT ATG GTT **GCC** GGA ATT ATT ATA GCG
TA (SEQ ID NO: 115)

53) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT **TGC** CCG AAC
CAT ATT TGA (SEQ ID NO: 116)

52) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT **GGC** TCC CCG AAC
CAT ATT (SEQ ID NO: 117)

51) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT **GGC** AAT TCC CCG AAC
CAT (SEQ ID NO: 118)

50) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC **TGC** AAT AAT TCC CCG AAC
(SEQ ID NO: 119)

20) 5' GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA **GGC** CGC TAT
AAT AAT TCC (SEQ ID NO: 120)

19) 5' GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA **AGC** GTA CGC TAT
AAT AAT TCC (SEQ ID NO: 121)

18) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC **AGC** ATA GTA CGC
TAT AAT (SEQ ID NO: 122)

17) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA **GGC** AAA ATA GTA CGC
TAT (SEQ ID NO: 123)

16a) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA **GGC** GTC AAA ATA GTA CGC
TAT (SEQ ID NO: 124)

A continuación, se muestran los seis cebadores comunes para PCR de extensión. Las secuencias de los sitios BgIII (hebra superior) BstEII (hebra inferior) de flanqueo se muestran en negrita.

Cebadores comunes directos

5

**10) 5' AGT CTG AGA TCT GAA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT
GCG AGA (SEQ ID NO: 125)**

11) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC TCA AAT ATG (SEQ ID NO: 126)

10

**12) 5' AGA GAT TCC TCA AAT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA
GCG (SEQ ID NO: 127)**

Cebadores comunes inversos

15

13) 5' CTT GAG ACG GTG ACC AGG GTG CCC TGG CCC CA (SEQ ID NO: 128)

14) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA GTA CGC (SEQ ID NO: 129)

15) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT TCC CCG AAC (SEQ ID NO: 130)

20

En la tabla que se muestra a continuación, se indican los pares de cebador y plantilla de partida utilizados en secuencia para construir fragmentos de ADN sintéticos que contienen restos de alanina sustituidos.

TABLA III

Resto CDR	Plantilla	Reacciones PCR Para cebador de alanina	Cebadores de extensión	Cebadores de extensión	Cebadores de extensión
D95	A	60 + 14	10 + 13		
S96	A	59 + 14	10 + 13		
S97	B	10 + 58	10 + 15	10 + 14	10 + 13
N98	B	10 + 57	10 + 15	10 + 14	10 + 13
M99	B	10 + 56	10 + 15	10 + 14	10 + 13
V100	A	55 + 14	10 + 14	10 + 13	
R100a	A	54 + 14	10 + 14	10 + 13	
G100b	A	11 + 53	10 + 14	10 + 13	
I100c	A	11 + 52	10 + 14	10 + 13	
I100d	A	11 + 51	10 + 14	10 + 13	
I100e	A	11 + 50	10 + 14	10 + 13	
Y100g	B	11 + 20	10 + 13		
Y100h	B	11 + 19	10 + 13		
F100i	B	11 + 18	10 + 13		
D101	B	11 + 17	10 + 13		
Y102	B	11 + 16a	10 + 13		

25

Para los cebadores utilizados para la exploración de alanina, las condiciones de PCR fueron 20 ciclos a 94°C durante 20 segundos, a continuación 74°C durante 40 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 + 15, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 42°C durante 1 minuto 30 segundos, 74°C durante 20 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 a 14, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 48-50°C durante 1 minuto 30 segundos, 74°C durante 20 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 a 13, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 64°C durante 1 minuto 30 segundos, 74°C durante 20 segundos. Se digirieron los productos de PCR con las enzimas de restricción BgIII y BstEII y se clonaron en FabAT que había sido digerido con BgIII y BstEII, reemplazando así la CDR3 de AT con la CDR3 sustituida de alanina. Se verificaron los constructos sustituidos con alanina por secuenciado con ADN.

35

Variantes de sustitución de CDR3 de cadena pesada

40

Se utilizó una estrategia similar a la utilizada para la mutagénesis de exploración de alanina para la aleatorización de las posiciones S96, S97 y N98 de la CDR3 de "AT" de cadena pesada. Se generaron las plantillas A y B tal como se ha descrito previamente. Se aleatorizaron las posiciones 96, 97 y 98 con un grupo de cuatro cebadores para cada posición. Las posiciones entre paréntesis tienen nucleótidos variables tal como queda indicado.

Para la posición S96

23) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA G(AT) (ACGT) ATC
TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 131)

24) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA G(CG) (ACGT) ATC
TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 132)

25) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA CT(CG) (ACGT) ATC TCT
CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 133)

26) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA C(AC) (AT) ATC
TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 134)

5 Para la posición S97

27) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT G(AT) (ACGT) GGA ATC
TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 135)

28) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT G(CG) (ACGT) GGA ATC
TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 136)

29) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT CT(CG) (ACGT) GGA ATC TCT
CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 137)

30) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT C(AC) (AT) GGA ATC
TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 138)

Para la posición N98

10

31) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT G(AT) (ACGT) TGA GGA ATC
TCT CGC ACA (SEQ ID NO: 139)

32) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT G(CG) (ACGT) TGA GGA ATC
TCT CGC ACA (SEQ ID NO: 140)

33) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT CT(CG) (ACGT) TGA GGA ATC TCT
CGC ACA (SEQ ID NO: 141)

34) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT C(AC) (AT) TGA GGA ATC
TCT CGC ACA (SEQ ID NO: 142)

15 Se realizaron las reacciones de PCR utilizando el cebador de aleatorización inversa y el cebador 10. Se extendió el producto resultante con cuatro reacciones PCR sucesivas utilizando los pares de cebadores 10 + 15, 10 + 14, 10 + 13 y 10 + 22. Se amplificó el extremo 5' de la región variable de cadena pesada de "AT" a partir de un clon de longitud completa de la región variable de cadena pesada "AT" utilizando los cebadores 16 y 72. Se purificaron con gel todos los productos PCR. Se solaparon los productos de aleatorización con el producto 16/72, siendo los cebadores de flanqueo 16 y 22. A continuación, se clonó la región variable de longitud completa en un vector que contenía la región constante IgG1 como un fragmento HindIII/BsmBI. Se seleccionaron los clones de anticuerpo de longitud completa por secuenciado.

20

Los cebadores utilizaron la PCR de superposición para aleatorización de mutantes

25

10 5' AGT CTG AGA TCT GAA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT
GCG AGA (SEQ ID NO: 143)

16 5' CAG CAG AAG CTT AGA CCA CCA TGG ACA TGA GGG TCC
CCG CTC AGC TCC TGG G (SEQ ID NO: 144)

30

72 5' CAC AGC CGT GTC TTC AGA TCT CAG ACT GCG CAG CTC (SEQ ID NO: 145)

22 5' GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTG (SEQ ID NO: 146)

5 Se convirtieron las variantes S96A, S97A y N98A desde Fabs a anticuerpos de longitud completa por amplificación por PCR del clon Fab que tenía la secuencia de señal bacteriana reemplazada con una secuencia de señal de mamífero. Se utilizó el ADN de plasmidio del Fab que contenía la mutación deseada como plantilla. Los pares de cebador en secuencia utilizados fueron 21 + 22, 98 + 22 y 16 + 22. Se seleccionaron clones correctos por análisis de secuencia de ADN.

10 Se generaron variantes de alanina múltiples (S96A, S97A; S96A, N98A; S97A, N98A y S96A, S97A y N98A) utilizando el plasmidio de IgG1 de longitud completa de cadena pesada de AT como plantilla. Se llevaron a cabo las reacciones PCR iniciales con uno de los cebadores enumerados a continuación y el cebador 22. A continuación, se extendieron estos productos utilizando pares de cebador 10 + 22. A continuación, se solapó ese producto con el producto 16/72 utilizando cebadores de flanqueo 16 y 22, y se clonaron en la región constante de IgG1 como en el caso anterior. Se seleccionaron clones correctos por análisis de secuencia de ADN.

15 S96A, S97A

**63) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC GCA AAT ATG GTT
CGG GGA ATT ATT (SEQ ID NO: 147)**

20 S96A, N98A

**64) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC TCA GCT ATG GTT
CGG GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 148)**

S97A, N98A

25

**65) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC GCA GCT ATG GTT
CGG GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 149)**

S96A, S97A, N98A

30

**66) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC GCA GCT ATG GTT
CGG GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 150)**

**21) 5' GTG GTT GAG AGG TGC CAG ATG TCA GGT CCA GCT GGT
GCA G (SEQ ID NO: 151)**

**98) 5' CCG CTC AGC TCC TGG GGC TCC TGC TAT TGT GGT TGA
GAG GTG CCA GAT (SEQ ID NO: 152)**

35

Variantes de inserción de la región CDR3 de cadena ligera

40 La CDR3 de cadena ligera de AT contiene un bucle de cinco aminoácidos que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09). Se construyeron las variantes de secuencia de CDR3 de cadena ligera del siguiente modo. Se utilizaron los siguientes cebadores para PCR utilizando un plasmidio que contenía ADNc de cadena ligera "AT" Fab como plantilla:

(HincII)CCG GTC AAC ACA CT(ACGT)(ACGT)(GT)G CGG CGG CGC GGG CGT TCG GCC AAG GG (SEQ ID NO: 153) indicando (ACGT) cuatro bases mixtas en esta posición.

45

CCG GGC GCG CCT TAT TAA CAC TC(Ascl) (SEQ ID NO: 154)

50 El producto PCR resultante tenía una secuencia de bucle CDR3 aumentada de cinco a nueve aminoácidos y cambió desde QHTRA A GHTXAAARA pudiendo ser X cualquier aminoácido. Se digirió un clon de AT con digestión HincII y Ascl y se reemplazó la región CDR3 de cadena ligera de "AT" con la secuencia variante. Se aislaron los clones que contenían los veinte restos de aminoácidos en la posición X junto con tres restos de alanina insertados en el bucle CDR3 y se confirmó su identidad por secuenciado de ADN.

Purificación y variantes Fab

Se produjeron variantes de sustitución de alanina de la CDR3 de cadena pesada y variantes de inserción de CDR3 de cadena ligera y se purificaron como fragmentos Fab a través del siguiente procedimiento. Se cultivó cada variante en 50 ml de 2XYT con glucosa al 2% y 100 µg/ml de ampicilina al mismo tiempo que se agitaba a 37°C hasta un DO₆₀₀ de 0,8-1,0. A continuación, se centrifugó cada cultivo y se resuspendió en 50 ml de 2XYT con 100 µg/ml de ampicilina con 1 mM IPTG a 30°C para inducir la producción de Fabs solubles. A continuación, se desplazaron las Fab solubles al área periplásmica y se concentraron durante toda la noche antes de la liberación por choque osmótico. Se llevó a cabo el choque osmótico por lavado de las células con solución de sacarosa 0,5 M fría en tampón Tris y EDTA para romper la pared celular bacteriana y a continuación, por dilución rápida en solución fría de concentración osmótica baja. Se purificaron las Fabs solubles diluidas por cromatografía de afinidad de metal TALON a través de 6 x Restos etiquetados con His en la Fab expresada. Se eliminaron las impurezas por lavado con NaCl y concentraciones de imidazol más bajas antes de eluir la proteína con imidazol. Se analizó la expresión y purificación de cada mutante con manchas de reducción, no reducción y de Western anti-His. Se determinó la concentración de proteína total por A₂₈₀.

Ejemplo 12

Análisis BIAcore de variantes “AT”

Se determinaron la constante de unión (Kd) la constante de velocidad de encendido (Ka) y la constante de velocidad de apagado (kd) para las variantes de anticuerpo “AT” y la constante de velocidad de apagado (Kd) para las variantes Fab “AT” por técnicas de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) utilizando OPGbp [143-317] inmovilizada. En las tablas IV –VIII se muestran los resultados. Las variantes CDR3 de cadena ligera descritas en el ejemplo 11 no muestran una unión detectable.

TABLA IV

Análisis BIAcore de Fabs “AT” desde mutagénesis de exploración de alanina de CDR3 de cadena pesada	
	Kd(s ⁻¹)
AT (alaninas no sustituidas)	0,284
D95A	sin unión detectable
S96A	7,20 x10 ⁻³
S97A	6,20x10 ⁻³
N98A	1,20x10 ⁻²
M99A	1,12
V100A	0,261
R(100a)A	0,303
G(100b)A	0,657
I(100c)A	0,53
I(100d)A	0,622
I(100e)A	6,90x10 ⁻³
A(100f)	0,197
Y(100g)A	7,4x10 ⁻²
Y(100h)A	0,368
F(100i)A	0,251
D110A	0,127
Y111A	0,414

TABLA V

Análisis BIAcore de Abs “AT” de mutagénesis de exploración de alanina de CDR3 de cadena pesada			
	Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kd(s ⁻¹)	K _D (nm)
AT	1,70x10 ⁵	2,00x10 ⁻³	1,18
S96A	2,60x10 ⁵	6,40x10 ⁻²	2,50
S97A	5,30x10 ⁵	1,5x10 ⁻³	2,90
N98A	1,30x10 ⁵	9,00x10 ⁻³	0,67
S96A, S97A	3,17x10 ⁵	2,84x10 ⁻³	8,90
S97A, N98A			Unión no detectable
S96A, S97A, N98A			Unión no detectable
S96A, N98A			Unión no detectable

30

TABLA VI

Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituido en S96 de CDR3 de cadena pesada			
	$Kn(M^{-1}s^{-1})$	$Kd(s^{-1})$	K_D (nM)
S96F	$3,17 \times 10^5$	$2,68 \times 10^{-3}$	8,45
S96Q	$1,16 \times 10^5$	$3,59 \times 10^{-3}$	3,09
S96M	$3,57 \times 10^5$	$8,70 \times 10^{-3}$	2,43
S96V	$5,37 \times 10^5$	$1,21 \times 10^{-3}$	2,25
S96I	$2,99 \times 10^5$	$4,66 \times 10^{-3}$	1,56
S96N	$1,40 \times 10^5$	$2,15 \times 10^{-3}$	1,53
S96P	$1,45 \times 10^5$	$1,88 \times 10^{-3}$	1,29
S96W	$1,61 \times 10^5$	$2,03 \times 10^{-3}$	1,26
S96T	$3,14 \times 10^5$	$1,67 \times 10^{-3}$	0,53
S96D	$2,28 \times 10^5$	$1,18 \times 10^{-3}$	0,51
S96R	$6,97 \times 10^5$	$2,62 \times 10^{-3}$	0,38
S96E	$2,54 \times 10^5$	$9,01 \times 10^{-3}$	0,35
S96K	$4,55 \times 10^5$	$1,41 \times 10^{-3}$	0,31
S96L	$5,84 \times 10^5$	$1,75 \times 10^{-3}$	0,30
S96H	$4,12 \times 10^5$	$7,64 \times 10^{-3}$	1,86
S96G	$3,87 \times 10^5$	$1,50 \times 10^{-3}$	3,85
S96Y	$2,75 \times 10^5$	$1,85 \times 10^{-3}$	0,67

TABLA VII

Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituidas en S97 de CDR3 de cadena pesada			
	$Kn (M^{-1}s^{-1})$	$Kd (s^{-1})$	K_D (nM)
S97F			unión no detectable
S97Y			unión no detectable
S97G			Unión no detectable
S97W			Unión no detectable
S97D			Unión no detectable
S97E	Rápido conectado	Rápido desconectado	1940
S97R	$4,09 \times 10^5$	$1,18 \times 10^{-1}$	28,90
S97P	$1,10 \times 10^5$	$2,69 \times 10^{-2}$	24,50
S97M	$2,33 \times 10^5$	$2,90 \times 10^{-2}$	12,40
S97Q	$7,30 \times 10^5$	$5,98 \times 10^{-3}$	8,19
S97N	$8,95 \times 10^5$	$4,11 \times 10^{-3}$	4,59
S97H	$8,39 \times 10^5$	$2,48 \times 10^{-3}$	3,00
S97T	$4,63 \times 10^5$	$1,16 \times 10^{-3}$	2,51
S97V	$3,04 \times 10^5$	$3,58 \times 10^{-3}$	1,18
S97L	$7,50 \times 10^5$	$6,90 \times 10^{-3}$	0,92
S97I	$2,10 \times 10^6$	$1,80 \times 10^{-3}$	0,87
S97K	$1,45 \times 10^6$	$5,78 \times 10^{-3}$	0,40

TABLA VIII

Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituidas en N98 de CDR3 de cadena pesada			
	$Kn (M^{-1}s^{-1})$	$Kd (s^{-1})$	K_D (nM)
N98K			Unión no detectable
N98F	$3,70 \times 10^3$	$9,90 \times 10^{-2}$	26600
N98Y	$2,72 \times 10^5$	$1,12 \times 10^{-2}$	41,30
N98M	$2,96 \times 10^5$	$8,14 \times 10^{-2}$	27,50
N98T	$2,46 \times 10^5$	$6,62 \times 10^{-2}$	26,90
N98G	$2,30 \times 10^5$	$5,59 \times 10^{-3}$	24,30
N98I	$5,68 \times 10^5$	$4,36 \times 10^{-3}$	7,60
N98W	$2,62 \times 10^5$	$7,68 \times 10^{-3}$	2,93
N98E	$2,72 \times 10^5$	$3,59 \times 10^{-3}$	1,32
N98P	$1,51 \times 10^5$	$1,71 \times 10^{-3}$	1,13
N98H	$2,20 \times 10^5$	$2,34 \times 10^{-3}$	1,06
N98L	$1,48 \times 10^5$	$1,22 \times 10^{-3}$	0,82
N98Q	$1,86 \times 10^5$	$1,51 \times 10^{-3}$	0,81
N98S	$2,67 \times 10^5$	$1,54 \times 10^{-3}$	0,58
N98D	$6,85 \times 10^5$	$3,12 \times 10^{-3}$	0,46
N98V	$4,56 \times 10^5$	$1,97 \times 10^{-4}$	0,43
N98R	$3,59 \times 10^5$	$1,08 \times 10^{-3}$	0,30

Divulgaciones

- 5 1. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno o fragmento, variante o derivado del mismo que se une a una proteína de unión a osteoprotegerina y es un anticuerpo antagonista.
- 10 2. El anticuerpo de 1, en donde la proteína de unión a osteoprotegerina es una proteína de unión a osteoprotegerina de mamífero.
- 15 3. El anticuerpo de 2, en donde la proteína de unión a osteoprotegerina es proteína de unión a osteoprotegerina humana o un fragmento inmunogénico de la misma.
- 20 4. El anticuerpo de 3, en donde el fragmento inmunogénico comprende al menos parte del dominio extracelular de una proteína de unión a osteoprotegerina humana.
- 25 5. El anticuerpo de 1, que inhibe la unión de la proteína de unión a osteoprotegerina al receptor de activación y diferenciación de osteoclastos.
- 30 6. El anticuerpo de 1, que inhibe la formación o la activación de osteoclastos.
- 35 7. El anticuerpo de 1, que inhibe la resorción ósea.
- 40 8. El anticuerpo de 1, que se selecciona entre el grupo que consiste en Fv, scFv, Fab, Fab' y F(ab')₂.
- 45 9. El anticuerpo de 1, que es un anticuerpo humano.
- 50 10. El anticuerpo o el dominio de unión a antígeno que comprende:
- 55 (a) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Fab tal como se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 51) o en la figura 10 (SEQ ID NO: 53);
- (b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende sustituciones conservativas de aminoácidos de la secuencia en (a);
- (c) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia en (a); o
- (d) un fragmento o derivado de (a), (b) o (c);
- en donde el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno se une selectivamente a OPGbp.
- 60 11. El anticuerpo de 10, que además comprende una cadena ligera kappa o lambda.
- 65 12. El anticuerpo de 10, que además comprende una región Fc humana.
13. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que reconoce a un epítipo en OPGbp humana reconocido por un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos pesada de Fab tal como se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 51) o en la figura 10 (SEQ ID NO: 53) y la secuencia de aminoácidos ligera de Fab tal como se muestra en la figura 5 (SEQ ID NO: 43) o en la figura 6 (SEQ ID NO: 45).
14. Un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno que comprende una cadena ligera variable (V_l) y una cadena pesada variable (V_h):
- 50 en donde cada cadena V_l comprende secuencias de aminoácidos de CDR denominadas CDR1(V_l), CDR2(V_l) y CDR3(V_l) separadas por secuencias de aminoácidos marco conservadas, seleccionándose la CDR1(V_l) entre el grupo que consiste en:
- 55 RASQSI~~S~~RYLN (SEQ ID NO: 01);
 RASQSVGSYLA (SEQ ID NO: 02);
 RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO: 03); y
 SQDALPKQY (SEQ ID NO: 04);
- 60 seleccionándose la CDR2(V_l) entre el grupo que consiste en:
- GASSLQS (SEQ ID NO: 05);
 DATNRAT (SEQ ID NO: 06);
 GASSRAT (SEQ ID NO: 07); y
 EDSERPS (SEQ ID NO: 08);
- 65 seleccionándose la CDR3(V_l) entre el grupo que consiste en:

QHTRA (SEQ ID NO: 09);
 QHRRT (SEQ ID NO: 10);
 QQYGA (SEQ ID NO: 11); y
 QSTDSSGTYVV (SEQ ID NO: 12);

en donde las CDR1(V_i), la CDR2(V_i) y la CDR3(V_i) se seleccionan independientemente entre sí; y
 en donde cada cadena V_h comprende secuencias de aminoácidos de CDR denominadas CDR1(V_h),
 CDR2(V_h) y CDR3(V_h) separadas por secuencias de aminoácidos marco conservadas, seleccionándose la
 CDR1(V_h) entre el grupo que consiste en:

NYAIH (SEQ ID NO: 13);
 NYPMH (SEQ ID NO: 14); y
 DYAMH (SEQ ID NO: 15)

seleccionándose la CDR2(V_h) entre el grupo que consiste en:

WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16);
 VISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 17); y
 GISWNSGRIGYADSVKG (SEQ ID NO: 18)

seleccionándose la CDR3(V_h) entre el grupo que consiste en:

DSSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);
 GGGGFDY (SEQ ID NO: 20); y
 GGSTSARYSSGWYY (SEQ ID NO: 21)

en donde las CDR1(V_h), la CDR2(V_h) y la CDR3(V_h) se seleccionan independientemente entre sí.

15. El anticuerpo de 14 que comprende una cadena ligera variable (V_i) y una cadena pesada variable (V_h) en donde:

la cadena V_i comprende la CDR1 que tiene la secuencia RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01), la CDR2 que tiene la secuencia GASSLQS (SEQ ID NO: 05) y la CDR3 que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09); y
 la cadena V_h comprende la CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), la CDR2 que tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y la CDR3 que tiene la secuencia DSSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);
 en donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 en cada cadena V_i y V_h están separadas por secuencias de aminoácidos marco conservadas.

16. El anticuerpo de 14 o 15 que además comprende una región Fc humana.

17. Un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (V_i) y una cadena pesada variable (V_h) en donde:

la cadena V_i comprende una variante reorganizada o somática de la secuencia de línea germinal de la figura 19 (SEQ ID NO: 66); y
 la cadena V_h comprende una variante reorganizada o somática de la secuencia de línea germinal de la figura 16 (SEQ ID NO: 59); y el anticuerpo se une de manera selectiva a una proteína de unión a osteoprotegerina.

18. Un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (V_i) y una cadena pesada variable (V_h) en donde:

la cadena V_i comprende una variante reorganizada o somática de la secuencia de línea germinal de la figura 20 (SEQ ID NO: 68); y
 la cadena V_h comprende una variante reorganizada o somática de la secuencia de línea germinal de la figura 16 (SEQ ID NO: 59); y el anticuerpo se une de manera selectiva a una proteína de unión a osteoprotegerina.

19. Un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (V_i) y una cadena pesada variable (V_h) en donde:

la cadena V_i comprende una variante reorganizada o somática de la secuencia de línea germinal de la figura 21 (SEQ ID NO: 70); y
 la cadena V_h comprende una variante reorganizada o somática de la secuencia de línea germinal de la figura 17 (SEQ ID NO: 62); y el anticuerpo se une de manera selectiva a una proteína de unión a osteoprotegerina.

20. Un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (V_i) y una cadena pesada variable (V_h) en donde:

la cadena V_l comprende una variante reorganizada o somática de la secuencia de línea germinal de la figura 22 (SEQ ID NO: 72); y

la cadena V_h comprende una variante reorganizada o somática de la secuencia de línea germinal de la figura 18 (SEQ ID NO: 64); y el anticuerpo se une de manera selectiva a una proteína de unión a osteoprotegerina.

- 5 21. El anticuerpo de 1, que es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monocatenario o un heteroanticuerpo.
- 10 22. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo de cualquiera de 1, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 o 21.
- 15 23. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de 22.
24. Una célula hospedadora que comprende el vector de 23.
- 25 25. La célula hospedadora de 24 que es una célula CHO.
26. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula hospedadora de 25 en condiciones que permitan la expresión de la molécula de ácido nucleico.
- 20 27. El anticuerpo de 1, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 o 21 en donde el isotipo de IgG se selecciona entre IgG, IgM, IgA, IgE e IgD.
- 25 28. El anticuerpo de 27, en donde el isotipo es IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.
29. Una composición que comprende el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno o el fragmento, variante o derivado del mismo de cualquiera de 1, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 o 21 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 30. Un método para inhibir la formación o activación de osteoclastos que comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz de la composición de 29.
- 35 31. Un método para inhibir la resorción ósea que comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz de la composición de 29.
32. Un método para prevenir o tratar la pérdida de masa ósea que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de la composición de 29.
- 40 33. El método de 32, en donde la pérdida de masa ósea es a causa de la osteoporosis, la metástasis del cáncer al hueso; artritis reumatoide, hipercalcemia por neoplasia y osteoporosis inducida por esteroides.
- 45 34. El método de cualquiera de 30, 31, 32 o 33 que además comprende administrar una composición que comprende al menos un agente contra la resorción ósea adicional.
- 50 35. El método de 34, en donde el agente contra la resorción es estrógeno, un bisfosfonato o un modulador selectivo del receptor de estrógenos.
36. El método de cualquiera de 30, 31, 32 o 33 que además comprende administrar una composición que comprende un agente anabólico para el hueso.
- 55 37. El método de 36, en donde el agente anabólico es la hormona paratiroidea o un complejo de factor de crecimiento insulínico y proteína de unión a factor de crecimiento insulínico.
38. El método de cualquiera de 30, 31, 32 o 33 que además comprende administrar un inhibidor de interleucina 1 o un inhibidor de factor de necrosis tumoral alfa.
39. Un método para prevenir o tratar el crecimiento de células tumorales en el hueso que comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz del compuesto de 29.
- 60 40. Un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno que reconoce a un epítipo DE en la proteína de unión a osteoprotegerina (OPGbp) humana.
41. Un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno que reconoce un epítipo de DE en OPGbp humana.
- 65 42. El anticuerpo o el dominio de unión a antígeno de 40 o 41, en donde el epítipo DE comprende la secuencia DLATE.

43. Un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno que se une a OPGbp murina que comprende las sustituciones de aminoácidos S229D, V230L, P231A y D233E, pero que no se une a OPGbp que carezca de dichas sustituciones.

5 44. El anticuerpo o el dominio de unión a antígeno de 40, 41, 42 o 43 que inhibe la formación o la activación de osteoclastos.

45. El anticuerpo o el dominio de unión a antígeno de 40, 41, 42 o 43 que inhibe la resorción ósea.

10 46. Un anticuerpo que comprende una cadena variable ligera (V_l) y variable pesada (V_h), en donde la cadena V_l comprende la CDR1 que tiene la secuencia RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01), la CDR2 que tiene la secuencia GASSLQS (SEQ ID NO: 05) y la CDR3 que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09), en donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 en cada cadena V_l están separadas por secuencias de aminoácido marco conservadas, y en donde el anticuerpo se une de manera selectiva a una proteína de unión a osteoprotegerina.

15 47. Un anticuerpo que comprende una cadena variable ligera (V_l) y variable pesada (V_h), en donde la cadena V_h comprende la CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), la CDR2 que tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y la CDR3 que tiene la secuencia DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19), en donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 en cada cadena V_h están separadas por secuencias de aminoácidos marco conservadas, y en donde el anticuerpo se une de manera selectiva a una proteína de unión a osteoprotegerina.

20 48. Un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (V_l) y una cadena pesada variable (V_h), en donde:
 25 la cadena V_l comprende la CDR1 que tiene la secuencia RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01), la CDR2 que tiene la secuencia GASSLQS (SEQ ID NO: 05) y la CDR3 que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09); y la cadena V_h comprende la CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), la CDR2 que tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y la CDR3 que tiene la secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

30 XSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 80);
 DXSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 81);
 DSXNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 82);
 35 DSSXMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 83);
 DSSNXVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 84);
 DSSNMXRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 85);
 DSSNMVXGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 86);
 DSSNMVRXIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 87);
 DSSNMVRGXIIAYYFDY (SEQ ID NO: 88);
 40 DSSNMVRGIXIAYYFDY (SEQ ID NO: 89);
 DSSNMVRGIIAXYYFDY (SEQ ID NO: 90);
 DSSNMVRGIIIAXYYFDY (SEQ ID NO: 91);
 DSSNMVRGIIIAXYFDY (SEQ ID NO: 92);
 DSSNMVRGIIIAYXFDY (SEQ ID NO: 93);
 45 DSSNMVRGIIIAYYXDY (SEQ ID NO: 94);
 DSSNMVRGIIIAYYFXD (SEQ ID NO: 95); y
 DSSNMVRGIIIAYYFDX (SEQ ID NO: 96);

50 en donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 en cada cadena V_l y V_h están separadas por secuencias de aminoácidos marco conservadas y X es cualquier aminoácido diferente del aminoácido que reside normalmente en esa posición;
 y en donde el anticuerpo se une selectivamente a una proteína de unión a osteoprotegerina.

55 49. Un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (V_l) y una cadena pesada variable (V_h), en donde:

la cadena V_h comprende la CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), la CDR2 que tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y la CDR3 que tiene la secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

60 XSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 80);
 DXSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 81);
 DSXNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 82);
 DSSXMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 83);
 DSSNXVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 84);
 65 DSSNMXRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 85);
 DSSNMVXGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 86);

5 DSSNMVRXIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 87);
 DSSNMVRGXIIAYYFDY (SEQ ID NO: 88);
 DSSNMVRGIXIAYYFDY (SEQ ID NO: 89);
 DSSNMVRGIIAYYFDY (SEQ ID NO: 90);
 DSSNMVRGIIIYXYFDY (SEQ ID NO: 91);
 DSSNMVRGIIIAXYFDY (SEQ ID NO: 92);
 DSSNMVRGIIIAYXFDY (SEQ ID NO: 93);
 DSSNMVRGIIIAYYXDY (SEQ ID NO: 94);
 DSSNMVRGIIIAYYFXD (SEQ ID NO: 95); y
 10 DSSNMVRGIIIAYYFDX (SEQ ID NO: 96);

15 en donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 en cada cadena V_l y V_h están separadas por secuencias de aminoácidos marco conservadas y X es cualquier aminoácido diferente del aminoácido que reside normalmente en esa posición;
 y en donde el anticuerpo se une selectivamente a una proteína de unión a osteoprotegerina.

50. Un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (V_l) y una cadena pesada variable (V_h), en donde:

20 la cadena V_l comprende la CDR1 que tiene la secuencia RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01), la CDR2 que tiene la secuencia GASSLQS (SEQ ID NO: 05) y la CDR3 que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09); y la cadena V_h comprende la CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), la CDR2 que tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y la CDR3 que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);
 25 en donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 en cada cadena V_l y V_h están separadas por secuencias de aminoácidos marco conservadas, y en donde el anticuerpo se une selectivamente a una proteína de unión a osteoprotegerina.

51. Un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable (V_l) y una cadena pesada variable (V_h), en donde:

30 la cadena V_h comprende la CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), la CDR2 que tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y la CDR3 que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);
 35 en donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 en cada cadena V_l y V_h están separadas por secuencias de aminoácidos marco conservadas, y en donde el anticuerpo se une selectivamente a una proteína de unión a osteoprotegerina.

52. Un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno que se une selectivamente a OPGbp humana con una constante de disociación (KD) de aproximadamente 1 nM o menor.

40 53. Un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno que se une selectivamente a OPGbp humana con una constante de velocidad de disociación (kd) de aproximadamente 3×10^{-3} o menor.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Amgen Inc.

<120> AGENTES DE UNIÓN SELECTIVOS DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A OSTEOPROTEGERINA

50 <130> EP25150IIIHV015pau

<140> aún sin asignar

<141> adjunto

55 <150> EP 08 010 991.1

<151> 16-08-2008

<150> EP 01 911 158.2

<151> 23-02-2001

60 <150> PCT/US01/05973

<151> 23-02-2001

<150> 09/791.153

<151> 22-02-2001

65

<150> 09/511.139

<151> 23-02-2000

<160> 155

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr Leu Asn
1 5 10

15

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 2

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 3

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Leu Ala
1 5 10

35

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

40

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr
1 5

45

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

50

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

55

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

60

Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 7

ES 2 612 124 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 8

15

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 9

25

Gln His Thr Arg Ala
 1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 10

35

Gln His Arg Arg Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 11

45

Gln Gln Tyr Gly Ala
 1 5

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50

<400> 12

Gln Ser Thr Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Val Val
 1 5 10

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

<400> 13

60

ES 2 612 124 T3

Asn Tyr Ala Ile His
1 5

5 <210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Asn Tyr Pro Met His
1 5

10 <210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Asp Tyr Ala Met His
1 5

20 <210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

30 <210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 17

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

Gly

40 <210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

Gly

50 <210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

ES 2 612 124 T3

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

5 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 20

Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

15 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

20 Gly Gly Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr
 1 5 10

25 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22
 ccgactttgc acctagtt 18

30 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 23
 tttgtcgtct ttccagacgt tagt 24

40 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

Thr Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr
 1 5 10 15

His Asp Arg Gly
 20

45 <210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 25

ES 2 612 124 T3

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

Val His Ser

5 <210> 26
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (18)..(44)

<400> 26

cagaagctta gaccacc atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc t 45
 Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe
 1 5

15 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 27

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe
 1 5

25 <210> 28
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(43)

<400> 28

35 g agc tgg gtc ttt ctc ttc ttc ctg tca gta acg act ggt gtc ca 45
 Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly Val
 1 5 10

40 <210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly Val
 1 5 10

45 <210> 30
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(42)

<400> 30

ES 2 612 124 T3

tca gta acg act ggt gtc cac tca cag gtc cag ctg gtg cag 42
 Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln
 1 5 10

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln
 1 5 10

<210> 32
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32
 gtggaggcac tagagacggt gaccaggtg 30

<210> 33
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
 20

<210> 34
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (17)..(46)

<400> 34

cagaagcttg accacc atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg gg 48
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu
 1 5 10

<210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu
 1 5 10

<210> 36
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 612 124 T3

<400> 42

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Phe Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Arg Arg
 20 25 30

5 <210> 43
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(645)

15 <400> 43

tct cac agt gca ctt gaa att gtg atg acg cag tct cca tcc tcc ctg	48
Ser His Ser Ala Leu 5 Glu Ile Val Met Thr 10 Gln Ser Pro Ser Ser 15 Leu	
tct gcg tct gtt gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag	96
Ser Ala Ser Val 20 Gly Asp Arg Val Thr 25 Ile Thr Cys Arg Ala Ser 30 Gln	
agc att agc aga tat tta aat tgg tat cag ctt aaa cca ggg aaa gcc	144
Ser Ile Ser 35 Arg Tyr Leu Asn Trp 40 Tyr Gln Leu Lys 45 Pro Gly Lys Ala	
cct agg ctc ctg atc tat ggt gca tcc agt ttg caa agt gga gtc cca	192
Pro Arg 50 Leu Leu Ile Tyr Gly 55 Ala Ser Ser Leu Gln 60 Ser Gly Val Pro	
tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg gca gag ttc act ctc acc atc	240
Ser Arg Phe Ser Gly 70 Ser Gly Ser Gly Ala Glu 75 Phe Thr Leu Thr 80 Ile	
agc agt cta caa cct gaa gac att gcc act tac tac tgt caa cac act	288
Ser Ser Leu Gln 85 Pro Glu Asp Ile Ala Thr 90 Tyr Tyr Cys Gln His Thr 95	
cgg gcg ttc ggc caa ggg acc aag gtt gaa atc aag cga act gtg gct	336
Arg Ala Phe Gly Gln 100 Gly Thr Lys Val 105 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala 110	
gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct	384
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser 115 120 125	
gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag	432
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys 135 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu 130 140	
gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc	480
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser 145 150 155 160	
cag gag agt gcc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc	528
Gln Glu Ser Ala Thr 165 Glu Gln Asp Ser Lys 170 Asp Ser Thr Tyr Ser 175 Leu	

ES 2 612 124 T3

```

agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc      576
Ser Ser Thr  Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
      180      185      190

tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag      624
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
      195      200      205

agc ttc aac agg gga gag tgt
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys      645
      210      215
    
```

<210> 44
 <211> 215
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44

```

Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
1      5      10      15

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

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro
50      55      60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile
65      70      75      80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr
85      90      95

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210     215
    
```

10

ES 2 612 124 T3

<210> 45
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(645)

10

<400> 45

tct cac agt gca ctt gaa att gtg ctg act cag tct cca gcc acc ctg Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Leu Thr 10 Gln Ser Pro Ala Thr Leu 1 5 15	48
tct ttt tct ccg ggt gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag Ser Phe Ser Pro 20 Gly Glu Arg Ala Thr 25 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln 30	96
agt gtt ggc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aga cct ggc cag gct Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala Trp 40 Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala 35 45	144
ccc agg ccc ctc atc tat gat gca acc aac agg gcc act ggc atc cca Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Asp 55 Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro 50 60	192
acc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile 65 70 75 80	240
agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cac cga Ser Ser Leu Glu Pro 85 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg 90 95	288
agg act ttt ggc cgg ggg acc aag ttg gag atc aaa cga act gtg gct Arg Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala 100 105 110	336
gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro 120 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser 115 125	384
gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag Gly Thr Ala Ser Val Val Cys 135 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu 130 140	432
gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser 145 150 155 160	480
cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc Gln Glu Ser Val Thr 165 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu 170 175	528
agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc Ser Ser Thr Leu Thr 180 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val 185 190	576
tac gcc tgc gaa gtc act cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys 195 200 205	624
agc ttc aac agg gga gag tgt Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210 215	645

<210> 46
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 46

20

Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30
 Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
 35 40 45
 Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 50 55 60
 Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg
 85 90 95
 Arg Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 47
 <211> 645
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(645)

<400> 47

cac agt gca ctt gaa att gtg atg aca cag tct cca ggc acc ctg tct 48
 His Ser Ala Leu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 96
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

15

ES 2 612 124 T3

			20					25				30					
	ggt	agc	agc	agc	tcc	tta	gcc	tgg	tac	cag	cag	aaa	cct	ggc	cag	gct	144
	Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	
			35					40					45				
	ccc	agg	ctc	ctc	atc	tat	ggt	gca	tcc	agc	agg	gcc	act	ggc	atc	cca	192
	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	
		50					55					60					
	gac	agg	ttc	agt	ggc	agt	ggg	tct	ggg	aca	gac	ttc	act	ctc	acc	atc	240
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
	65					70					75					80	
	agc	aga	ctg	gag	cct	gaa	gat	ttt	gca	gtg	tat	tac	tgt	cag	cag	tat	288
	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	
					85					90					95		
	ggt	gct	ttc	ggc	gga	ggg	acc	aag	gtg	gag	atc	aaa	cga	act	gtg	gct	336
	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
				100					105					110			
	gca	cca	tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccg	cca	tct	gat	gag	cag	ttg	aaa	tct	384
	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
			115					120					125				
	gga	act	gcc	tct	ggt	gtg	tgc	ctg	ctg	aat	aac	ttc	tat	ccc	aga	gag	432
	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
		130					135					140					
	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat	aac	gcc	ctc	caa	tcg	ggt	aac	tcc	480
	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
						150					155					160	
	cag	gag	agt	gtc	aca	gag	cag	gac	agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctc	528
	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
					165					170					175		
	agc	agc	acc	ctg	acg	ctg	agc	aaa	gca	gac	tac	gag	aaa	cac	aaa	gtc	576
	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
				180					185					190			
	tac	gcc	tgc	gaa	gtc	acc	cat	cag	ggc	ctg	aac	tcg	ccc	gtc	aca	aag	624
	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Asn	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
			195					200					205				
	agc	ttc	aac	agg	gga	gag	tgt										645
	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210					215										

<210> 48
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 48

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

10

ES 2 612 124 T3

Ser Gly Thr Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 agt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct 384
 Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125
 gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac 432
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 130 135 140
 ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc 480
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac 528
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 165 170 175
 aag tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag 576
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 180 185 190
 tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg 624
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 195 200 205
 gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca 654
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 50
 <211> 218
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 50

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

10

ES 2 612 124 T3

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 165 170 175
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 180 185 190
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 195 200 205
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 51
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(690)

<400> 51

gcc cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg 48
 Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly
 1 5 10
 gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac gac ttc agt aat 96
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn
 20 25 30
 tat gct ata cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg 144
 Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp
 35 40 45
 atg gga tgg atc aac gct ggc aat ggg aac aca aaa ttt tca cag aag 192
 Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys
 50 55 60
 ttc cag ggc aga atc acc gtt acc agg gac aca gcc gcg agc aca gcc 240
 Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala
 65 70 75
 tac atg gag ctg cgc agt ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac 288
 Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 tgt gcg aga gat tcc tca aat atg gtt cgg gga att att ata gcg tac 336
 Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr
 100 105 110
 tat ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc 384
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc 432
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc 480
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc 528
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175

5

10

15

ES 2 612 124 T3

```

gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc 576
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
180 185 190

agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac 624
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
195 200 205

atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa 672
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
210 215 220

gtt gag ccc aaa tct tgt 690
Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230

```

<210> 52
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 52

```

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

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

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

Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys
50 55 60

Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr
100 105 110

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
165 170 175

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

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

```

10

ES 2 612 124 T3

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

<210> 53
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(690)

<400> 53

	gcc gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg	48
	Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly	
	1 5 10 15	
	gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac gac ttc agt aat	96
	Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn	
	20 25 30	
	tat gct ata cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg	144
	Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp	
	35 40 45	
	atg gga tgg atc aac gct ggc aat ggg aac aca aaa ttt tca cag aag	192
	Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys	
	50 55 60	
	ttc cag ggc aga atc acc gtt acc agg gac aca gcc gcg agc aca gcc	240
	Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala	
	65 70 75 80	
	tac atg gag ctg cgc agt ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac	288
	Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
	85 90 95	
	tgt gcg aga gat tcc tca aat atg gtt cgg gga att att ata gcg tac	336
	Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ala Tyr	
	100 105 110	
	tat ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc	384
	Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala	
	115 120 125	
	tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc	432
	Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser	
	130 135 140	
	acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc	480
	Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	
	145 150 155 160	
	ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc	528
	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly	
	165 170 175	
	gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc	576
	Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu	
	180 185 190	
	agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac	624
	Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr	
	195 200 205	
	atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa	672
	Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys	
	210 215 220	

15

ggt gag ccc aaa tct tgt
 val glu pro lys ser cys
 225 230

5
 <210> 54
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54

Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys
 50 55 60
 Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220
 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

10
 <210> 55
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15

ES 2 612 124 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(660)

5

<400> 55

```

gcc gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg      48
Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1      5      10      15

ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt tta gtc tct gga ttc acc ttc aat aac      96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn
20      25      30

tat cct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg      144
Tyr Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35      40      45

gtg gca gtt ata tca tat gat gga aat aat aaa tac tac gca gac tcc      192
Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
50      55      60

gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg      240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65      70      75      80

tat ttg caa atg aac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac      288
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85      90      95

tgt gcg agg ggg ggc ggt ggc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg      336
Cys Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100     105     110

gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg      384
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115     120     125

gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc      432
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130     135     140     145

ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca      480
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145     150     155     160

ggc gcc ctg acc agc ggc gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc      528
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165     170     175

tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc      576
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180     185     190     195

ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac      624
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195     200     205

acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt      660
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210     215     220
    
```

10 <210> 56
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 56

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

ES 2 612 124 T3

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn
 20 25 30
 Tyr Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

<210> 57
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(681)

<400> 57

gcc gag gtg cag ctg ctg gag tct ggg gga ggc ttg gta caa cct gcc 48
 Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat gat 96
 Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
 20 25 30
 tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg 144
 Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

5

10

15

ES 2 612 124 T3

100 105 110
 Gly Ser Tyr Tyr Asn Ile Thr Met Val Arg Gly Val Ile Ile Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

5
 <210> 60
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

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

10
 15
 <210> 61
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 61

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

20

ES 2 612 124 T3

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr
 100 105 110
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

5 <210> 62
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 62

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 10 Ser

15 <210> 63
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 63

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

ES 2 612 124 T3

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 Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr val Ser Ser
 115

5 <210> 64
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 64

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

10 <210> 65
 <211> 123
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 65

Glu val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

20

ES 2 612 124 T3

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

5 <210> 66
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 66

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

10 <210> 67
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 67

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile

20

ES 2 612 124 T3

35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Arg Ala Phe Gly Gln
 85 90 95
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100

5
 <210> 68
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 68

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

10
 15
 <210> 69
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69

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

20

ES 2 612 124 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg Arg Thr Phe Gly Arg
 85 90 95
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100

5 <210> 70
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70

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

10 <210> 71
 <211> 104
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71

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

20

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ala Phe Gly
 85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100

5 <210> 72
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 72

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

10 <210> 73
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 73

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

20

ES 2 612 124 T3

<210> 74
 <211> 522
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(513)

10 <400> 74

```

cat atg gac tac aag gac gac gat gac aag aag ctt aag cct gag gcc 48
  Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala
  1 5 10 15

cag cca ttt gca cac ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg ggt 96
  Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly

tcc cat aaa gtc act ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg gcc 144
  Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala
  35 40 45

aag atc tct aac atg acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac caa 192
  Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln
  50 55 60

gat ggc ttc tat tac ctg tac gct aac att tgc ttt cgg cat cat gaa 240
  Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu
  65 70 75

aca tcg gga gac ctg gct act gaa tat ctt cag ctg atg gtg tat gtc 288
  Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val
  80 85 90 95

gtt aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa gga 336
  Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly
  100 105 110

ggg agc acg aaa aac tgg tcg ggc aat tct gaa ttc cac ttt tat tcc 384
  Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser
  115 120 125

ata aat gtt ggg gga ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att agc 432
  Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser
  130 135 140

att cag gtg tcc aac cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg acg 480
  Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr
  145 150 155

tac ttt ggg gct ttc aaa gtt cag gac ata gac taactcgag 522
  Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
  160 165 170
    
```

<210> 75
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15
 <400> 75

```

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala Gln
  1 5 10 15

Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser
  20 25 30
    
```

ES 2 612 124 T3

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

5 <210> 76
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 76

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Thr
 20 25 30
 Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
 35

10 <210> 77
 <211> 39
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 77

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val
 20 25 30
 Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
 35

20 <210> 78
 <211> 39

ES 2 612 124 T3

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 78

5

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr val val
 20 25 30
 Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
 35

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

10

Asp Leu Ala Thr Glu
 1 5

15

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> xaa es cualquier aminoácido

25

<400> 80

Xaa Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

30

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> xaa es cualquier aminoácido

40

<400> 81

Asp Xaa Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

45

<210> 82
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50

<220>

ES 2 612 124 T3

<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> xaa es cualquier aminoácido

5 <400> 82

Asp Ser Xaa Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15
Tyr

10 <210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> xaa es cualquier aminoácido

20 <400> 83

Asp Ser Ser Xaa Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15
Tyr

25 <210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 84

Asp Ser Ser Asn Xaa Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15
Tyr

35 <210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 85

Asp Ser Ser Asn Met Xaa Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15
Tyr

50

ES 2 612 124 T3

5 <210> 86
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> xaa es cualquier aminoácido

10 <400> 86

Asp Ser Ser Asn Met Val Xaa Gly Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

15 <210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> xaa es cualquier aminoácido

25 <400> 87

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Xaa Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

30 <210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> xaa es cualquier aminoácido

40 <400> 88

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Xaa Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

45 <210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 89

ES 2 612 124 T3

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Xaa Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 90

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Xaa Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 91

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Xaa Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 92
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 92

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Xaa Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)

ES 2 612 124 T3

<223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 93

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Xaa Phe Asp
1 5 10 15

5 Tyr

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

15 <223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 94

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Xaa Asp
1 5 10 15

20 Tyr

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

30 <223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 95

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Xaa
1 5 10 15

35 Tyr

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

45 <223> xaa es cualquier aminoácido

<400> 96

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Xaa

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

50

ES 2 612 124 T3

<211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 103
 cctctcctcg agttagtcta tgtcc 25

<210> 104
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 104

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

15 Tyr

<210> 105
 <211> 39
 <212> ADN
 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 105
 agagattcct caaatatggt tcggggaatt attatagcg 39

25 <210> 106
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 106
 gtagtcaaaa tagtacgcta taataattcc ccgaac 36

<210> 107
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 107
 gtgtattact gtgcgagaga ttctcaaat atg 33

40 <210> 108
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 108
 cagggtgccc tggcccagc agtcaaaata gtacgc 36

50 <210> 109
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 109
 gtgtattact gtgcgagagc ttctcaaat atggttcgg 39

<210> 110
 <211> 39
 <212> ADN
 60 <213> *Homo sapiens*

<400> 110

gtgtattact gtgcgagaga tgcctcaaat atggttcgg 39

5 <210> 111
<211> 42
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 111
aataattccc cgaaccatat ttgcggaatc tctcgcacag ta 42

15 <210> 112
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 112
aataattccc cgaaccatag ctgaggaatc tctcgaca 39

25 <210> 113
<211> 36
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 113
aataattccc cgaacggcat ttgaggaatc tctcgc 36

35 <210> 114
<211> 36
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 114
gattcctcaa atatggctcg ggaattatt atagcg 36

45 <210> 115
<211> 38
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 115
gattcctcaa atatggttgc cggaattatt atagcgta 38

55 <210> 116
<211> 45
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 116
gtagtcaaaa tagtacgcta taataattgc ccgaaccata ttga 45

65 <210> 117
<211> 42
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

70 <400> 117
gtagtcaaaa tagtacgcta taatggctcc ccgaaccata tt 42

75 <210> 118
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

80 <400> 118
gtagtcaaaa tagtacgcta tggcaattcc ccgaaccat 39

ES 2 612 124 T3

<210> 119
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 119
 gtagtcaaaa tagtacgctg caataattcc ccgaac 36
 <210> 120
 10 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 120
 15 ggtgccctgg ccccagtagt caaaataggc cgctataata attcc 45
 <210> 121
 <211> 45
 <212> ADN
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 121
 ggtgccctgg ccccagtagt caaaagcgta cgctataata attcc 45
 25 <210> 122
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 122
 cagggtgccc tggccccagt agtcagcata gtacgctata at 42
 <210> 123
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 123
 40 cagggtgccc tggccccagt aggcaaaata gtacgctat 39
 <210> 124
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 124
 cagggtgccc tggccccagg cgcaaaata gtacgctat 39
 <210> 125
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 125
 55 agtctgagat ctgaagacac ggctgtgtat tactgtgcga ga 42
 <210> 126
 <211> 33
 <212> ADN
 60 <213> *Homo sapiens*
 <400> 126
 gtgtattact gtgcgagaga ttctcaaat atg 33
 65 <210> 127
 <211> 39

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 127
 5 agagattcct caaatatggt tcggggaatt attatagcg 39

 <210> 128
 <211> 32
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <400> 128
 cttgagacgg tgaccagggt gccctggccc ca 32

 <210> 129
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 129
 20 cagggtgccc tggccccagt agtcaaata gtacgc 36

 <210> 130
 <211> 36
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*

 <400> 130
 gtagtcaaaa tagtacgcta taataattcc ccgaac 36

 <210> 131
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 131
 aataattccc cgaaccatat ttgagatagc tatctctcgc acagta 46

 <210> 132
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 132
 45 aataattccc cgaaccatat ttgagcgacg tatctctcgc acagta 46

 <210> 133
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 133
 aataattccc cgaaccatat ttgactcgta tctctcgac agta 44

 <210> 134
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 134
 60 aataattccc cgaaccatat ttgacacata tctctcgac agta 44

 <210> 135
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 65

ES 2 612 124 T3

<400> 135
aataattccc cgaaccatat tgatcgtgg aatctctcgc acagta 46

5 <210> 136
<211> 46
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 136
aataattccc cgaaccatat tgcgacgtgg aatctctcgc acagta 46

15 <210> 137
<211> 44
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 137
aataattccc cgaaccatat tctcgtggaa tctctcgcac agta 44

25 <210> 138
<211> 44
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 138
aataattccc cgaaccatat tcacatggaa tctctcgcac agta 44

35 <210> 139
<211> 43
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 139
aataattccc cgaaccatga tacgttgagg aatctctcgc aca 43

45 <210> 140
<211> 43
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 140
aataattccc cgaaccatgc gacgttgagg aatctctcgc aca 43

55 <210> 141
<211> 41
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 141
aataattccc cgaaccatct cgttgaggaa tctctcgcac a 41

65 <210> 142
<211> 41
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

70 <400> 142
aataattccc cgaaccatca cattgaggaa tctctcgcac a 41

75 <210> 143
<211> 42
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

80 <400> 143

agtctgagat ctgaagacac ggctgtgtat tactgtgcga ga 42
 <210> 144
 <211> 52
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 144
 cagcagaagc ttagaccacc atggacatga gggccccgc ttagctcctg gg 52
 10 <210> 145
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 145
 cacagccgtg tcttcagatc tcagactgcg cagctc 36
 <210> 146
 20 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 146
 25 gtggaggcac tagagacggt gaccaggggtg 30
 <210> 147
 <211> 48
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 147
 gtgtattact gtgcgagaga tgccgcaaat atggttcggg gaattatt 48
 35 <210> 148
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 148
 gtgtattact gtgcgagaga tgccctcagct atggttcggg gaattattat agc 53
 <210> 149
 <211> 53
 45 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 149
 gtgtattact gtgcgagaga ttccgcagct atggttcggg gaattattat agc 53
 50 <210> 150
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 150
 gtgtattact gtgcgagaga tgccgcagct atggttcggg gaattattat agc 53
 <210> 151
 60 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 151
 65 gtggttgaga ggtgccagat gtcaggtcca gctggtgcag 40

ES 2 612 124 T3

<210> 152
<211> 48
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5
<400> 152
ccgctcagct cctggggctc ctgctattgt ggtgagagg tgccagat 48

10
<210> 153
<211> 51
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15
<400> 153
ccggtcaaca cactacgtac gtgtcggcg gcgcgggctg tcggccaagg g 51

20
<210> 154
<211> 23
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 154
ccgggcgcgc cttattaaca ctc 23

25
<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30
<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> xaa es cualquier aminoácido

35
<400> 155

Gly His Thr xaa Ala Ala Ala Arg Ala
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o un dominio de unión a antígeno del mismo que se une a una porción de la secuencia de aminoácidos:
- 5 GGFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIP (SEQ ID NO: 76) desde el resto de aminoácido 212 hasta el resto de aminoácido 250 de OPGbp (proteína de unión a osteoprotegerina) humana, en donde el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno del mismo inhibe la formación o la activación de osteoclastos mediada por OPGbp humana.
- 10 2. Un anticuerpo monoclonal o un dominio de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que se une a la secuencia de aminoácidos DLATE dentro de la SEQ ID NO: 76.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno recombinante.
4. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno quimérico.
- 20 5. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno humanizado.
6. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno completamente humano.
- 25 7. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno monocatenario.
8. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno biespecífico.
- 30 9. El anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, que se selecciona entre Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv.
- 35 10. Un método para producir el anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, que comprende cultivar una célula hospedadora que expresa el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno y recuperar el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno a partir del medio de cultivo o a partir de la célula hospedadora.
- 40 11. El método de la reivindicación 10, en donde la célula hospedadora es una célula eucariota.
12. El método de la reivindicación 10, en donde la célula hospedadora es una célula procariota.
- 45 13. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal o el dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Uso de un anticuerpo monoclonal o de un dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la formación o activación de osteoclastos.
- 50 15. Uso de un anticuerpo monoclonal o de un dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la resorción ósea.
16. Uso de un anticuerpo monoclonal o de un dominio de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1 o 2, para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar la pérdida de masa ósea.
- 55 17. El uso de la reivindicación 16, en donde la pérdida de masa ósea es el resultado de la osteoporosis, la metástasis del cáncer al hueso; la artritis reumatoide, la hipercalcemia por neoplasia y osteoporosis inducida por esteroides.
- 60 18. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde se administra además una composición que comprende al menos un agente contra la resorción ósea.
19. El uso de la reivindicación 18, en donde el agente contra la resorción ósea es estrógeno, un bisfosfonato o un modulador selectivo del receptor de estrógenos.
- 65

20. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde se administra además una composición que comprende un agente anabólico para el hueso.

5 21. El uso de la reivindicación 20, en donde el agente anabólico es hormona paratiroidea o un complejo de factor de crecimiento insulínico y proteína de unión al factor de crecimiento insulínico.

22. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde se administra además un inhibidor de interleucina 1 o un inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa.

Figura 1
ELISA de fago

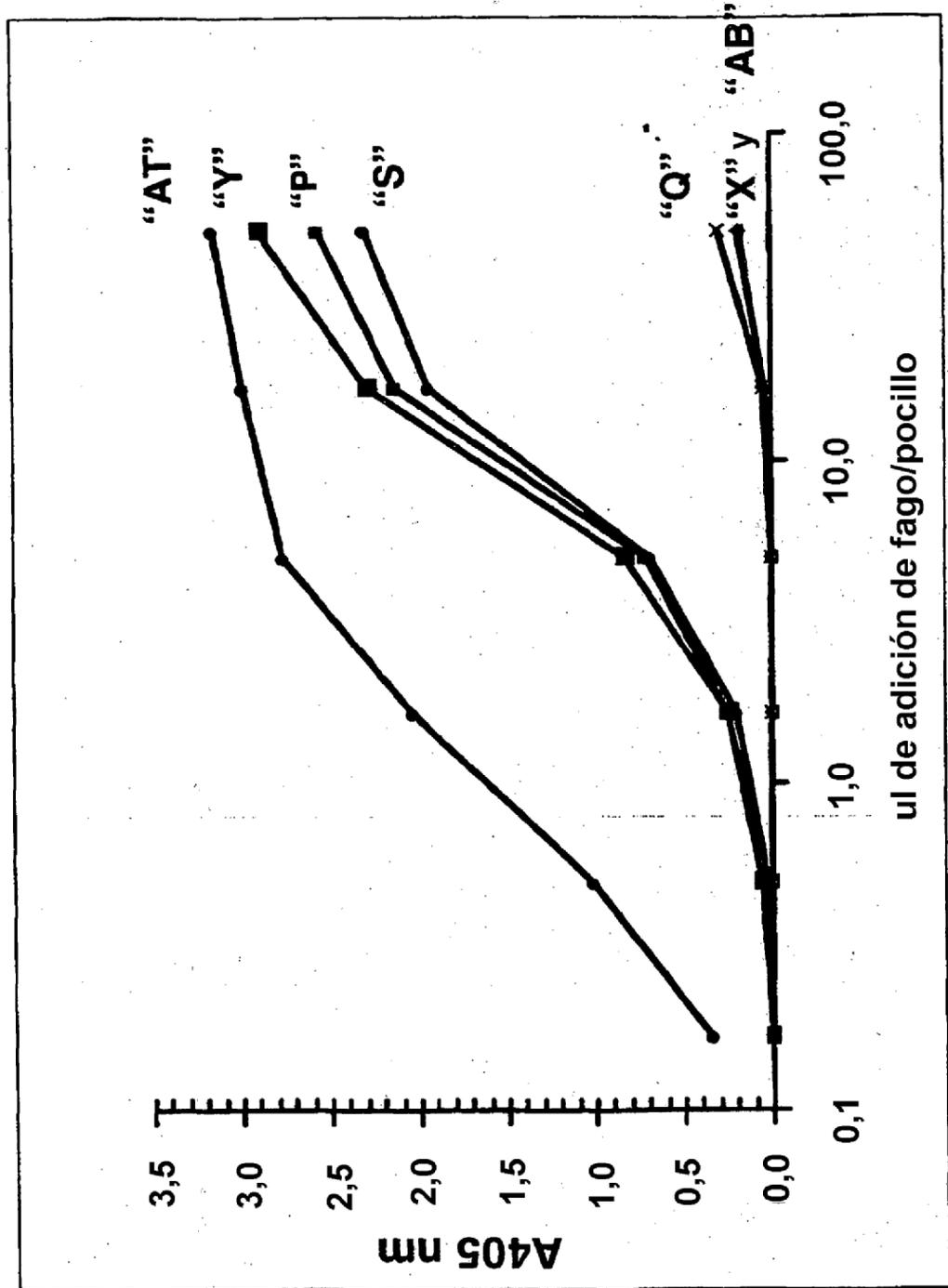


Figura 2
Inhibición de la interacción OPGbp/ODAR mediante los Fab "AT" e "Y"

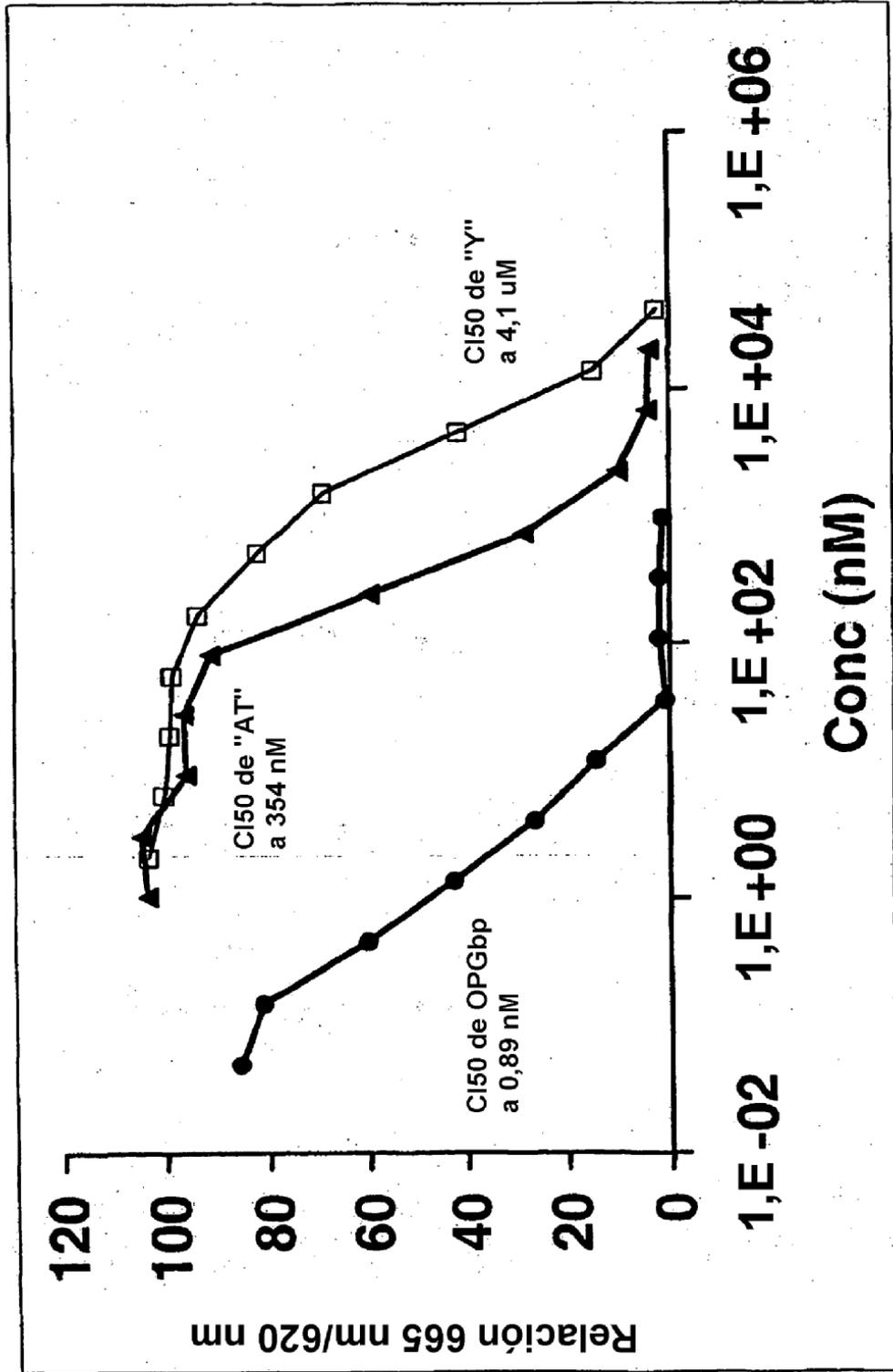


Figura 3
Ensayo de médula ósea
Fabs "AT" "Y" "P"

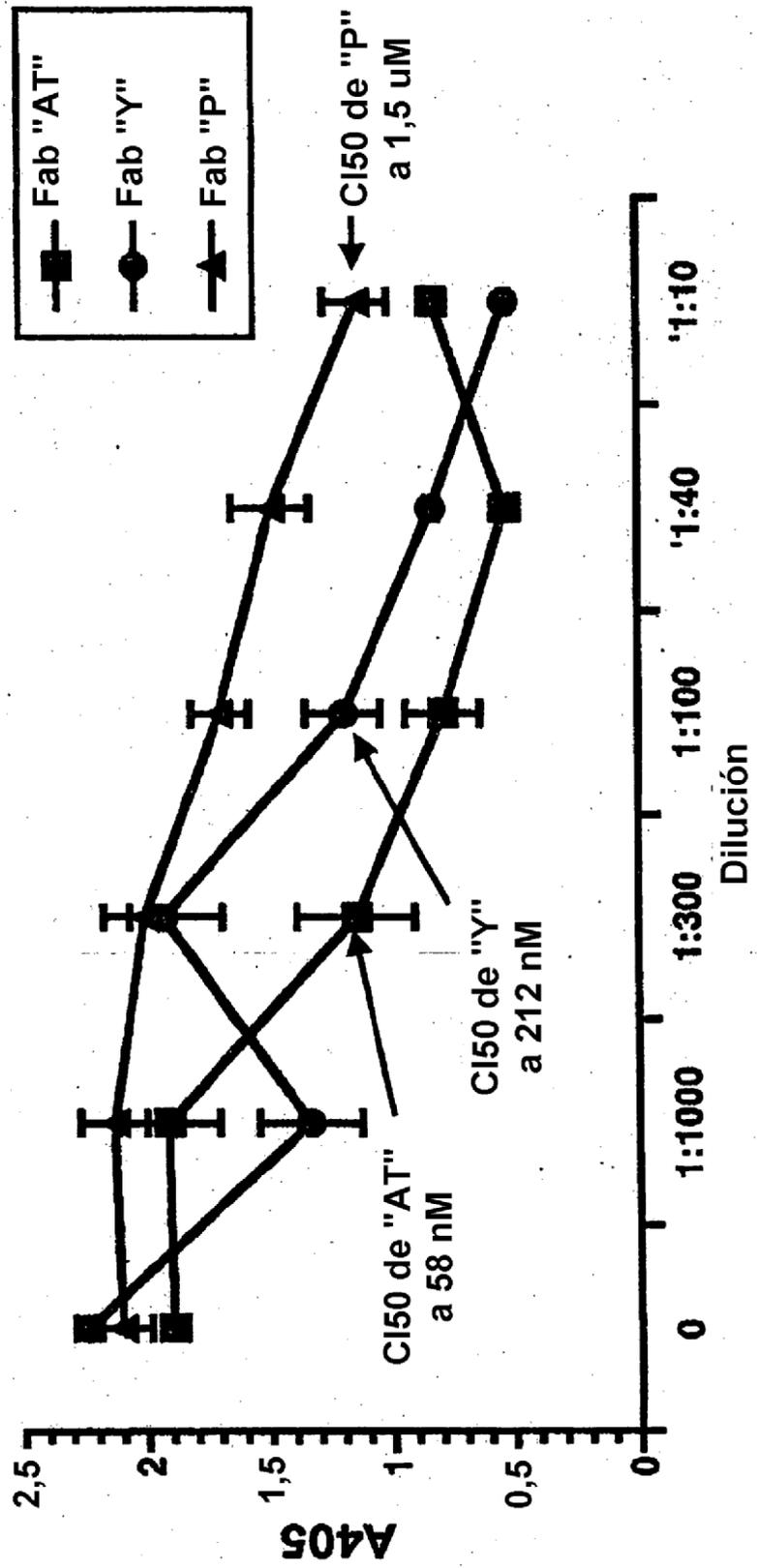


Figura 4
 Bioensayo de células RAW
 Fabs "AT" "Y" y "P"

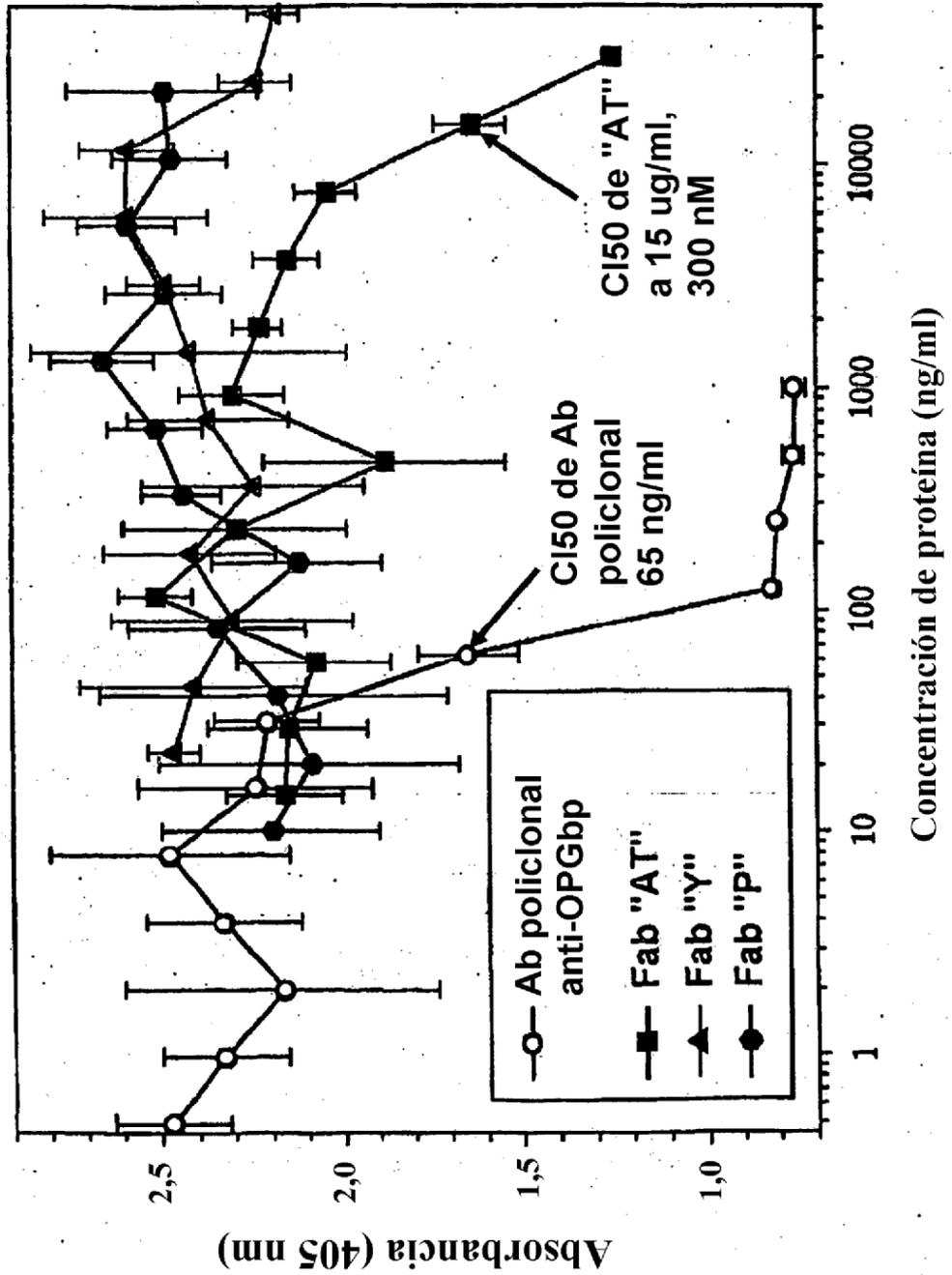


Figura 5

AT LIGERA

TCT	CAC	AGT	GCA	CTT	GAA	ATT	GTG	ATG	ACG	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	48
Ser	His	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	
1				5					10					15		
TCT	GCG	TCT	GTT	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	96
Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	
			20					25					30			
AGC	ATT	AGC	AGA	TAT	TTA	AAT	TGG	TAT	CAG	CTT	AAA	CCA	GGG	AAA	GCC	144
Ser	Ile	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Leu	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	
		35					40					45				
CCT	AGG	CTC	CTG	ATC	TAT	GGT	GCA	TCC	AGT	TTG	CAA	AGT	GGA	GTC	CCA	192
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	
	50					55					60					
TCA	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	GCA	GAG	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	240
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
65					70					75					80	
AGC	AGT	CTA	CAA	CCT	GAA	GAC	ATT	GCC	ACT	TAC	TAC	TGT	CAA	CAC	ACT	288
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Thr	
				85					90					95		
CGG	GCG	TTC	GGC	CAA	GGG	ACC	AAG	GTT	GAA	ATC	AAG	CGA	ACT	GTG	GCT	336
Arg	Ala	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
			100					105					110			
GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	384
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
		115					120					125				
GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC	AGA	GAG	432
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
130						135					140					
GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	480
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
145					150					155					160	
CAG	GAG	AGT	GCC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	528
Gln	Glu	Ser	Ala	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
				165					170					175		
AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	576
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
			180					185					190			
TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	CAT	CAG	GGC	CTG	AGC	TCG	CCC	GTC	ACA	AAG	624
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
		195					200					205				
AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT										645
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215										

Figura 6

Y LIGERA

TCT	CAC	AGT	GCA	CTT	GAA	ATT	GTG	CTG	ACT	CAG	TCT	CCA	GCC	ACC	CTG	48
Ser	His	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	
1				5					10					15		
TCT	TTT	TCT	CCG	GGT	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGT	CAG	96
Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	
			20					25					30			
AGT	GTT	GGC	AGC	TAC	TTA	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	AGA	CCT	GCC	CAG	GCT	144
Ser	Val	Gly	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	
		35					40					45				
CCC	AGG	CCC	CTC	ATC	TAT	GAT	GCA	ACC	AAC	AGG	GCC	ACT	GCC	ATC	CCA	192
Pro	Arg	Pro	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Thr	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	
	50					55					60					
ACC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	240
Thr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
65				70						75					80	
AGC	AGC	CTA	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	ACT	TAT	TAC	TGT	CAA	CAC	CGA	288
Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Arg	
			85						90					95		
AGG	ACT	TTT	GGC	CGG	GGG	ACC	AAG	TTG	GAG	ATC	AAA	CGA	ACT	GTG	GCT	336
Arg	Thr	Phe	Gly	Arg	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
			100					105					110			
GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	384
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
		115					120					125				
GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC	AGA	GAG	432
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
130						135					140					
GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	480
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
145					150					155					160	
CAG	GAG	AGT	GTC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	528
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
				165						170				175		
AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	576
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
			180					185					190			
TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACT	CAT	CAG	GGC	CTG	AGC	TCG	CCC	GTC	ACA	AAG	624
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
		195					200					205				
AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT										645
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215										

Figura 7

P LIGERA

CAC	AGT	GCA	CTT	GAA	ATT	GTG	ATG	ACA	CAG	TCT	CCA	GGC	ACC	CTG	TCT	48
His	Ser	Ala	Leu	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	
1				5					10					15		
TTG	TCT	CCA	GGG	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC	AGG	GCC	AGT	CAG	AGT	96
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	
			20					25					30			
GTT	AGC	AGC	AGC	TCC	TTA	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCT	GGC	CAG	GCT	144
Val	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	
			35				40					45				
CCC	AGG	CTC	CTC	ATC	TAT	GGT	GCA	TCC	AGC	AGG	GCC	ACT	GGC	ATC	CCA	192
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	
	50					55					60					
GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	240
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
	65				70					75					80	
AGC	AGA	CTG	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	GTG	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG	TAT	288
Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	
				85					90						95	
GGT	GCT	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAG	ATC	AAA	CGA	ACT	GTG	GCT	336
Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
			100					105					110			
GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	384
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
		115					120					125				
GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC	AGA	GAG	432
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
	130					135					140					
GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	480
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
	145				150					155					160	
CAG	GAG	AGT	GTC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	528
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
				165					170						175	
AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	576
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
			180					185					190			
TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	CAT	CAG	GGC	CTG	AAC	TCG	CCC	GTC	ACA	AAG	624
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Asn	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
		195					200					205				
AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT										645
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215										

Figura 8

S LIGERA

TCT	CAC	AGT	GCA	CAG	TCT	GTG	CTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCG	GTG	TCA	GTG	48
Ser	His	Ser	Ala	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	
1				5					10					15		
TCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	ACG	ATC	ACC	TGC	TCT	GGA	GAT	GCA	TTG	CCA	96
Ser	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Ala	Leu	Pro	
		20						25					30			
AAG	CAA	TAT	GTT	TAT	TGG	TAC	CGG	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	GCC	CCT	CTA	144
Lys	Gln	Tyr	Val	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Leu	
		35					40					45				
TTG	GTG	ATA	TAT	GAA	GAC	AGT	GAG	AGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GAA	CGA	192
Leu	Val	Ile	Tyr	Glu	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	
	50					55					60					
TTC	TCT	GGC	TCC	AGT	TCA	GGG	ACT	GAA	GTC	ACG	TTG	AGT	ATC	AGT	GGA	240
Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Gly	
65					70					75					80	
GTC	CAG	GCA	GAA	GAC	GAG	GCT	GAC	TAT	TAT	TGT	CAA	TCA	ACA	GAC	AGC	288
Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Thr	Asp	Ser	
				85					90						95	
AGT	GGG	ACT	TAT	GTC	GTC	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	336
Ser	Gly	Thr	Tyr	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	
			100					105						110		
AGT	CAG	CCC	AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC	TCT	384
Ser	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	
		115					120					125				
GAG	GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTG	GTG	TGT	CTC	ATA	AGT	GAC	432
Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	
	130					135					140					
TTC	TAC	CCG	GGA	GCC	GTG	ACA	GTG	GCC	TGG	AAG	GCA	GAT	AGC	AGC	CCC	480
Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	
145					150					155					160	
GTC	AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	ACC	ACA	CCC	TCC	AAA	CAA	AGC	AAC	AAC	528
Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	
				165					170						175	
AAG	TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAT	CTG	AGC	CTG	ACG	CCT	GAG	CAG	TGG	AAG	576
Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	
			180					185						190		
TCC	CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTC	ACG	CAT	GAA	GGG	AGC	ACC	GTG	624
Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	
		195					200					205				
GAG	AAG	ACA	GTG	GCC	CCT	ACA	GAA	TGT	TCA							654
Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser							
	210					215										

Figura 9

AT PESADA

GCC	CAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AGG	AAG	CCT	GGG	48
Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	
1				5				10						15		
GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	GAC	TTC	AGT	AAT	96
Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Asn	
			20					25						30		
TAT	GCT	ATA	CAT	TGG	GTG	CGC	CAG	GCC	CCC	GGA	CAA	AGG	CTT	CAG	TGG	144
Tyr	Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	
		35					40						45			
ATG	GGA	TGG	ATC	AAC	GCT	GGC	AAT	GGG	AAC	ACA	AAA	TTT	TCA	CAG	AAG	192
Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Phe	Ser	Gln	Lys	
	50					55						60				
TTC	CAG	GGC	AGA	ATC	ACC	GTT	ACC	AGG	GAC	ACA	GCC	GCG	AGC	ACA	GCC	240
Phe	Gln	Gly	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	
65					70					75					80	
TAC	ATG	GAG	CTG	CGC	AGT	CTG	AGA	TCT	GAA	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	288
Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
TGT	GCG	AGA	GAT	TCC	TCA	AAT	ATG	GTT	CGG	GGA	ATT	ATT	ATA	GCG	TAC	336
Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Met	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Ile	Ala	Tyr	
			100					105						110		
TAT	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGC	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCA	AGC	GCC	384
Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala		
		115					120					125				
TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	432
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	
	130					135					140					
ACC	TCT	GGG	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	480
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
145					150					155					160	
CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	528
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
				165					170					175		
GTC	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	576
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
			180					185						190		
AGC	AGC	GTA	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	624
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	
		195					200					205				

Figura 9 (continuación)

ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	672
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
	210					215					220					
GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT											690
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys											
225					230											

Figura 10

Y PESADA

GCC	GAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AGG	AAG	CCT	GGG	48
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	
1				5					10					15		
GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	GAC	TTC	AGT	AAT	96
Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Ser	Asn	
			20					25					30			
TAT	GCT	ATA	CAT	TGG	GTG	CGC	CAG	GCC	CCC	GGA	CAA	AGG	CTT	GAG	TGG	144
Tyr	Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
ATG	GGA	TGG	ATC	AAC	GCT	GGC	AAT	GGG	AAC	ACA	AAA	TTT	TCA	CAG	AAG	192
Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Phe	Ser	Gln	Lys	
	50					55					60					
TTC	CAG	GGC	AGA	ATC	ACC	GTT	ACC	AGG	GAC	ACA	GCC	GCG	AGC	ACA	GCC	240
Phe	Gln	Gly	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Ala	
65					70					75					80	
TAC	ATG	GAG	CTG	CGC	AGT	CTG	AGA	TCT	GAA	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	288
Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
TGT	GCG	AGA	GAT	TCC	TCA	AAT	ATG	GTT	CGG	GGA	ATT	ATT	ATA	GCG	TAC	336
Cys	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Asn	Met	Val	Arg	Gly	Ile	Ile	Ile	Ala	Tyr	
			100					105					110			
TAT	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGC	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCA	AGC	GCC	384
Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
		115					120					125				
TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	432
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser
		130				135					140					
ACC	TCT	GGG	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	480
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
145					150					155					160	
CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	528
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
				165					170					175		
GTC	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	576
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
			180					185					190			
AGC	AGC	GTA	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	624
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	
		195					200					205				

Figura 10 (continuación)

ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	672
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
	210					215					220					
GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT											690
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys											
225					230											

Figura 11

P PESADA

GCC	GAG	GTC	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTC	CAG	CCT	GGG	48
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15		
GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	TTA	GTC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AAT	AAC	96
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Asn	
			20					25					30			
TAT	CCT	ATG	CAC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	144
Tyr	Pro	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
			35				40					45				
GTG	GCA	GTT	ATA	TCA	TAT	GAT	GGA	AAT	AAT	AAA	TAC	TAC	GCA	GAC	TCC	192
Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	
	50					55					60					
GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	240
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	
65					70					75					80	
TAT	TTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	288
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
TGT	GCG	AGG	GGG	GGC	GGT	GGC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	336
Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
GTC	ACC	GTC	TCA	AGC	GCC	TCC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	384
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
			115				120					125				
GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC	TCT	GGG	GGC	AÇA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	432
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
	130					135					140					
CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	480
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
145					150					155					160	
GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	528
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
				165					170					175		
TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTA	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	576
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
			180					185					190			
TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	624
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
			195				200					205				
ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GTT	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT					660
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys					
	210					215					220					

Figura 12

S PESADA

GCC	GAG	GTG	CAG	CTG	CTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GCC	TTG	GTA	CAA	CCT	GGC	48
Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15		
AGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	GAT	GAT	96
Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	
			20					25					30			
TAT	GCC	ATG	CAC	TGG	GTC	CGG	CAA	GCT	CCA	GGG	AAG	GGC	CTG	GAG	TGG	144
Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
GTC	TCA	GGT	ATT	AGT	TGG	AAT	AGT	GGT	AGG	ATA	GGC	TAT	GCG	GAC	TCT	192
Val	Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Arg	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	
	50					55					60					
GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAC	GCC	AAG	AAC	TCC	CTG	240
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	
65					70					75					80	
TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGT	CTG	AGA	CCT	GAG	GAC	ACG	GCC	TTC	TAT	TAC	288
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
TGT	GCA	AAA	GGG	GGT	TCT	ACA	AGC	GCG	AGG	TAT	AGC	AGT	GGC	TGG	TAC	336
Cys	Ala	Lys	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Ala	Arg	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Tyr	
			100					105					110			
TAC	TGG	GGC	CAG	GGC	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCA	AGC	GCC	TCC	ACC	AAG	384
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	
	115						120					125				
GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC	TCT	GGG	432
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	
	130					135					140					
GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	480
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
145					150					155					160	
GTG	ACG	GTG	TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTC	CAC	ACC	528
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
				165					170					175		
TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTA	576
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
			180					185					190			
GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC	AAC	624
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	
		195					200					205				
GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GTT	GAG	CCC	672
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	
	210					215					220					

Figura 12 (continuación)

AAA TCT TGT
Lys Ser Cys
225

681

Figura 13
Comparación de secuencia de aminoácidos de Fab

		<u>Matriz de secuencia de cadena pesada</u>			<u>Matriz de secuencia de cadena ligera</u>				
SIMILARITY	IDENTIDAD	IDENTIDAD			IDENTIDAD				
		AT	Y	P	S	AT	Y	P	S
AT	---	99,6	76,9	72,3	AT	---	85,7	86,9	46,9
Y	100	---	78,6	72,8	Y	89,0	---	91,5	47,4
P	80,5	81,6	---	88,6	P	89,4	92,3	---	47,4
S	78,6	79,0	91,8	---	S	59,3	59,8	60,8	---

Figura 14
Comparación de CDR de Fab

Patrón Cadena pesada		CDR1	CDR2	CDR3
AT	NYAIH	WINAGNGNTKFSQKFQG	DSSNMVRGIIIAYYFDY	
Y	NYAIH	WINAGNGNTKFSQKFQG	DSSNMVRGIIIAYYFDY	
P	NYPMH	VISYDGNKYYADSVKKG	GGGGFDY	
S	DYAMH	GISWNSGRIGYADSVKKG	GGTSARYSSGWYY	

Patrón Cadena ligera		CDR1	CDR2	CDR3
AT	RASQISRYLN	GASSLQS	QHTRA	
Y	RASQSVGSYLA	DATNRAT	QHRRT	
P	RASQVSSSSLA	GASSRAT	QQYGA	
S	SGDALPKQY	EDSERPS	QSTDSSGTYVV	

Figura 15
Clases de Fab

Patrón	Cadena pesada		Cadena ligera	
	Familia	V D J	Familia	V J
AT	VH1	1-03 3-10 JH4b	Vk1	012/02 JK1
Y	VH1	1-03 3-10 JH4b	Vk3	L6 JK2
P	VH3	3-30 * JH4b	Vk3	A27 JK4
S	VH3	3-09 6-19 JH4b	V_L3	** JL2/JL3

Figura 16

COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE CADENA PESADA DE LOS FAB "AT" E "Y" CON LA LÍNEA GERMINAL

		H1								
		FR1			CDR1			FR2		
		1	2	3				4		
Locus		123456789012345678901234567890			1ab2345			67890123456789		
1-03		QVQLVQSGAEVKKPGASVKV	SCKASGYTFT		S--YAMH			WVRQAPGQRLEWMG		
"AT"		QVQLVQSGAEVRKPGASVKV	SCKASGYDFS		N YAIH			WVRQAPGQRLEWMG		
"Y"		EVQLVQSGAEVRKPGASVKV	SCKASGYDFS		N YAIH			WVRQAPGQRLEWMG		
H2										
		CDR2			FR3					
		5	6	7	8	9				
Locus		012abc3456789012345		67890123456789012abc345678901234						
1-03		WINA--GNGNTKYSQKFQG		RVTITRDTSA	STAYMELSSLRSEDTAVYYCAR					
"AT"		WINA GNGNTKFSQKFQG		RITVTRDTAA	STAYMELRSLRSEDTAVYYCAR					
"Y"		WINA GNGNTKFSQKFQG		RITVTRDTAA	STAYMELRSLRSEDTAVYYCAR					
CDR3										
Diversidad		3-10	VLLWFGELL*	YYGSGSYYN	ITMVRGVII					
"AT"				DS	SNMVRGIIIAY					
"Y"				DS	SNMVRGIIIAY					
H3										
CDR3										
		100	110							
Unión	JH4	YFDYWGQGLVTVSS								
	"AT"	YFDYWGQGLVTVSS								
	"Y"	YFDYWGQGLVTVSS								

Figura 17

COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE CADENA PESADA DEL FAB "P" CON LA LÍNEA GERMINAL

		H1											
		FR1				CDR1				FR2			
		1			2			3			4		
Locus		123456789012345678901234567890	1ab2345	67890123456789									
3-30		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	S--YGMH	WVRQAPGKGLEWVA									
"P"		EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCLVSGFTFM	N YPMH	WVRQAPGKGLEWVA									

		H2											
		CDR2						FR3					
		5		6		7		8		9			
Locus		012abc3456789012345	67890123456789012abc345678901234										
3-30		VISY--DGSNKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK										
"P"		VISY DGNNKYYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRSEDTAVYYCAR										

Diversidad desconocida

"P" GGG

H3

CDR3

Unión

JH4
"P"

100 110
| |
-----YFDYWGQGTTLVTVSS
GFDYWGQGTTLVTVSS

Figura 18

COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE CADENA PESADA DEL FAB "S" CON LA LÍNEA GERMINAL

		H1			
		FR1	CDR1	FR2	
		1	2	3	4
Locus		12345678901234567890	1ab2345	67890123456789	
3-09		EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS	CAASGFTFD	D--YAMH	WVRQAPGKGLEWVS
"S"		EVQLLES	GGGLVQPGRSLRLS	CAASGFTFD	D YAMH WVRQAPGKGLEWVS

		H2				
		CDR2	FR3			
		5	6	7	8	9
Locus		012abc3456789012345	67890123456789012abc345678901234			
3-09		GISW--NSGSIGYADSVKG	RFTISRDN	AKNSLYLQMN	SLRAEDTALYYCAKD	
"S"		GISW NSGRIGYADSVKG	RFTISRDN	AKNSLYLQMN	SLRPEDTAFYYCAKG	

Diversidad

6-19	GYSSGWY	GIAVAG	V*QWL
"S"	GSTSARY	SS	

		H3	
		CDR3	
		100	110
Unión	JH4	YFDYWGQGT	LVTVSS
	"S"	GWYYWGQGT	LVTVSS

Figura 19

COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE CADENA LIGERA DEL FAB "AT" CON LA LÍNEA GERMINAL

	FR1		L1 ----- CDR1		FR2		L2 ----- CDR2	
	1	2	3		4		5	
Locus	12345678901234567890123		45678901	abcdef234	567890123456789		0123456	
O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		RASQSISS	-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY		AASSLQS	
"AT"	EIVMTQSPSSLSASVGDRVTITC		RASQSISS	YLN	WYQLKPGKAPRLLIY		GASSLQS	

	FR3			L3 ----- CDR3	
	6	7	8	9	
Locus	78901234567890123456789012345678			9012345	
O12	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC			QQSISTP	
"AT"	GVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLPEDIATYYC			QETRA--	

	L3 ----- CDR3	
	100	
Unión	JK1	WTFGQGTKVEIK
"AT"	--	FGQGTKVEIK

Figura 20

COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE CADENA LIGERA DEL FAB "Y" CON LA LÍNEA GERMINAL

	FR1		L1 ----- CDR1		FR2	L2 -----
CDR2	-----		-----		-----	-----
	1	2	3		4	5
Locus	12345678901234567890123	456789012345678901234	567890123456789			
0123456						
L6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSS-----YLA	WYQOKPGQAPRLLIY			
DASNRAT						
"Y"	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSC	RASQSVGS	YLA	WYQORPGQAPRPLIY		
DATNRAT						

	FR3			L3 ----- CDR3
	-----			-----
	6	7	8	9
Locus	7890123456789012345678	9012345		
L6	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC	QQRSNWP		
"Y"	GIPTRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYC	QHR----		

	L3 ----- CDR3 -----
Unión	100
JK2	YTFGQGTKLEIK
"Y"	RTFGRGTKLEIK

Figura 21

COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE CADENA LIGERA DEL FAB "P" CON LA LÍNEA GERMINAL

	FR1		L1 ----- CDR1		FR2	L2 ---
CDR2	-----		-----		-----	-----
	1	2	3		4	5
Locus	12345678901234567890123	45678901234567890123	456789012345678901234		567890123456789	
0123456						
A27	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC		RASQSVSS-----YLA		WYQQKPGQAPRLLIY	
DASNRAT						
"P"	EIVMTQSPGTLSPGERATLSC		RASQSVSS	SSLA	WYQQKPGQAPRLLIY	
GASSRAT						
			L3 ----- CDR3			
	FR3					
	6	7	8	9		
Locus	7890123456789012345678	9012345				
A27	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYC		QQRSNWP			
"P"	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC		QQY----			
	L3 ----- CDR3					
	100					
Unión	JK4	LTFGGGTKVEIK				
	"P"	GAFGGGTKVEIK				

Figura 22

COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE CADENA LIGERA DEL FAB "S" CON LA LÍNEA GERMINAL

	FR1		CDR1	FR2		CDR2
	1	2	3	4	5	
Locus	1234567891234567890123		45678901abc234	567890123456789		01abcde23456
*3m	SYELMQPPSVSVSPGQTARITC		SG-DA-LPKQ-YAY	WYQQKPGQAPVLVIY		KD-----SERPS
"S"	QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC		SG DA LPKQ YVY	WYRQKPGQAPLLVIY		ED SERPS
	FR3		CDR3			
	6	7	8	9		
Locus	789012345678ab90123456789012345678			9012345abcde		
*3m	GIPERFSGSSSG--TTVTLTISGVQAEDEADYYC			QSADSSGTY		
"S"	GIPERFSGSSSG TEVTLTISGVQAEDEADYYC			QSTDSSGTY		
	CDR3					
Unión	100					
	JL2	VVFGGGTKLTVL				
	"S"	VVFGGGTKLTVL				

* La región variable se identificó pero aún no se ha nombrado. La coincidencia siguiente más próxima es "3m", mostrada más arriba

Figura 23
Bioensayo de células RAW
"AT" 405, "AT" 406, "AT" 407

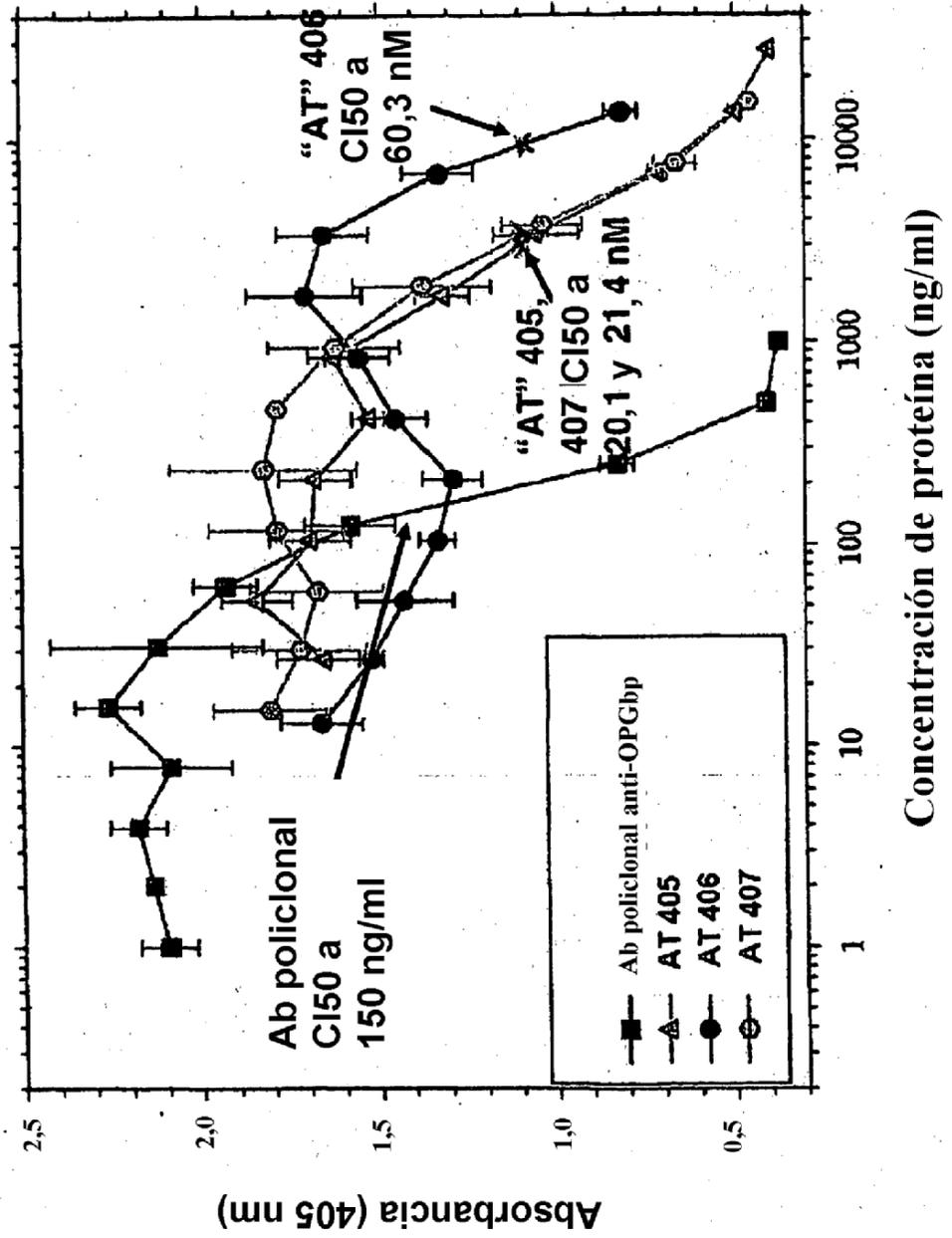


Figura 24
 Ensayo de médula ósea
 "AT" 405, "AT" 407

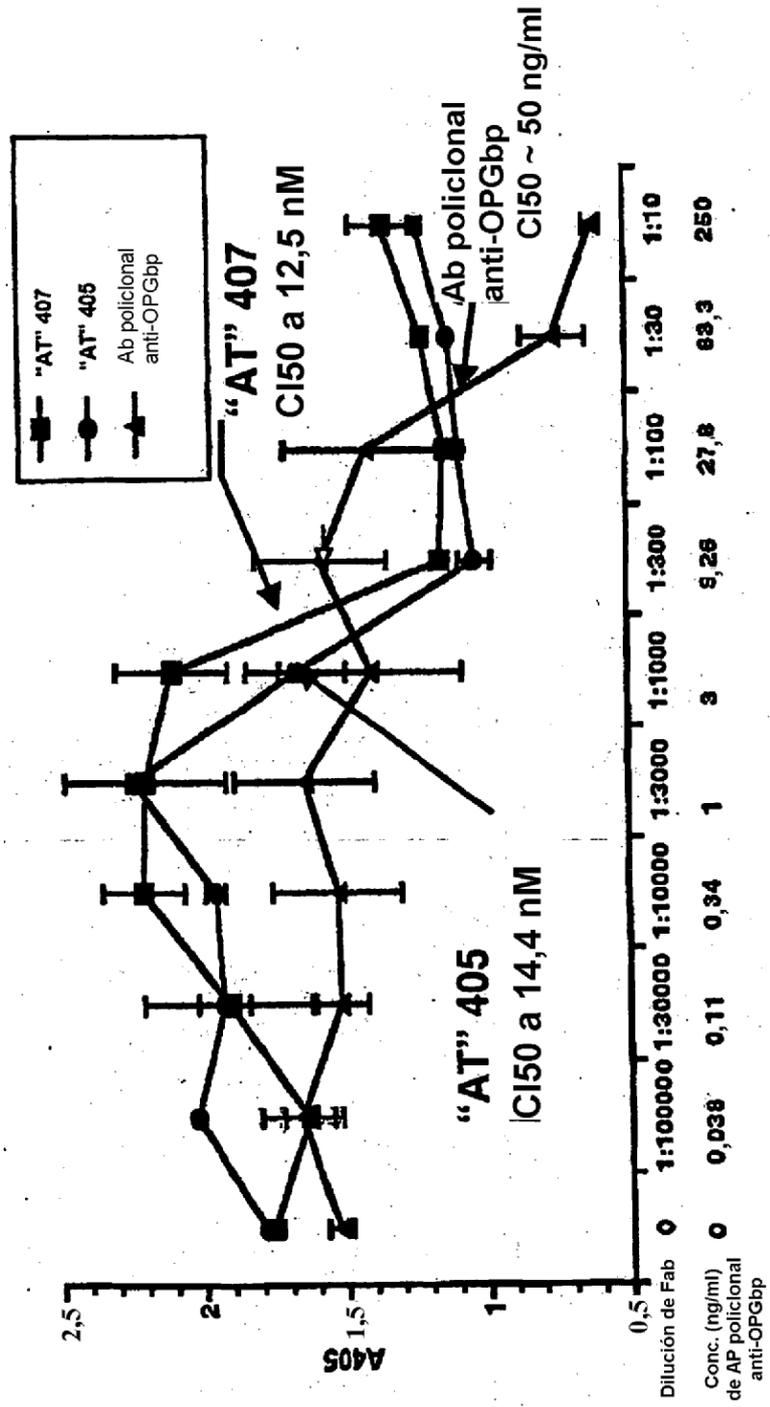


Figura 25
Ensayo de médula ósea "AT" 406

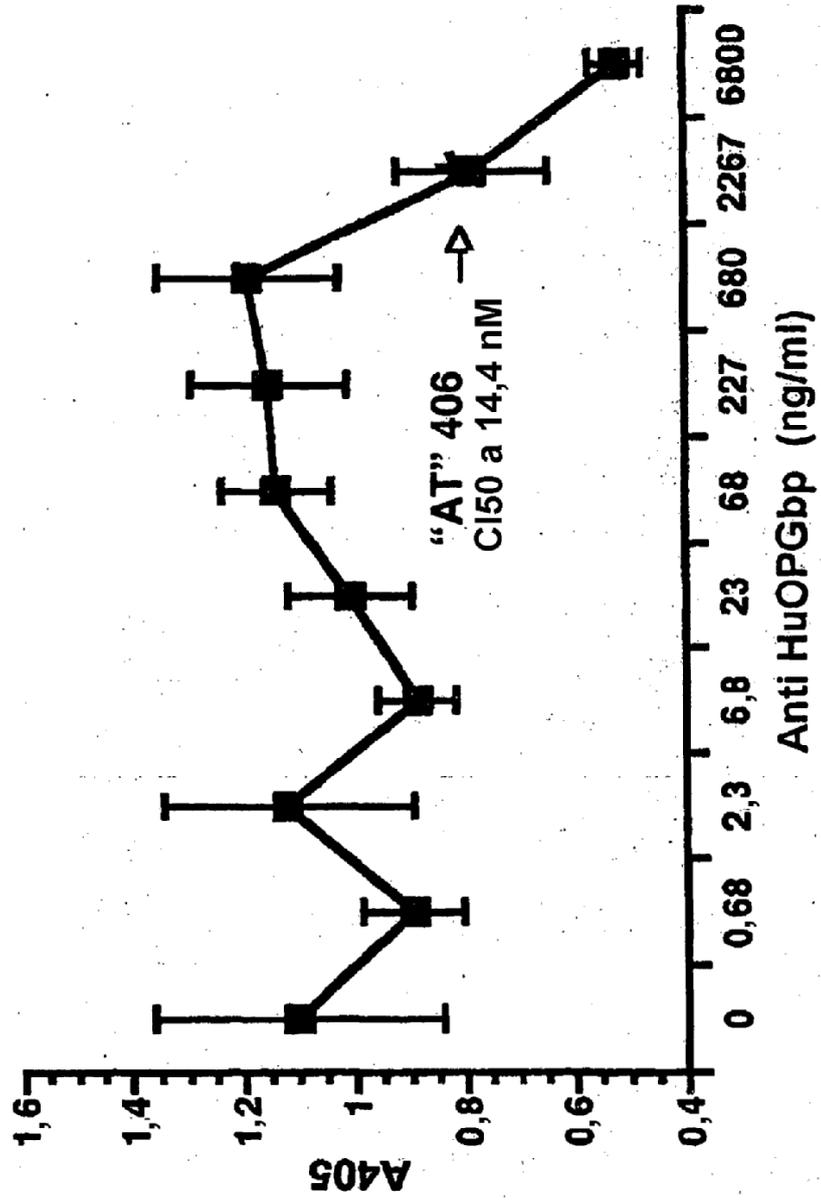


Figura 26
 Ensayo de médula ósea
 "S" 435 e "Y" 429

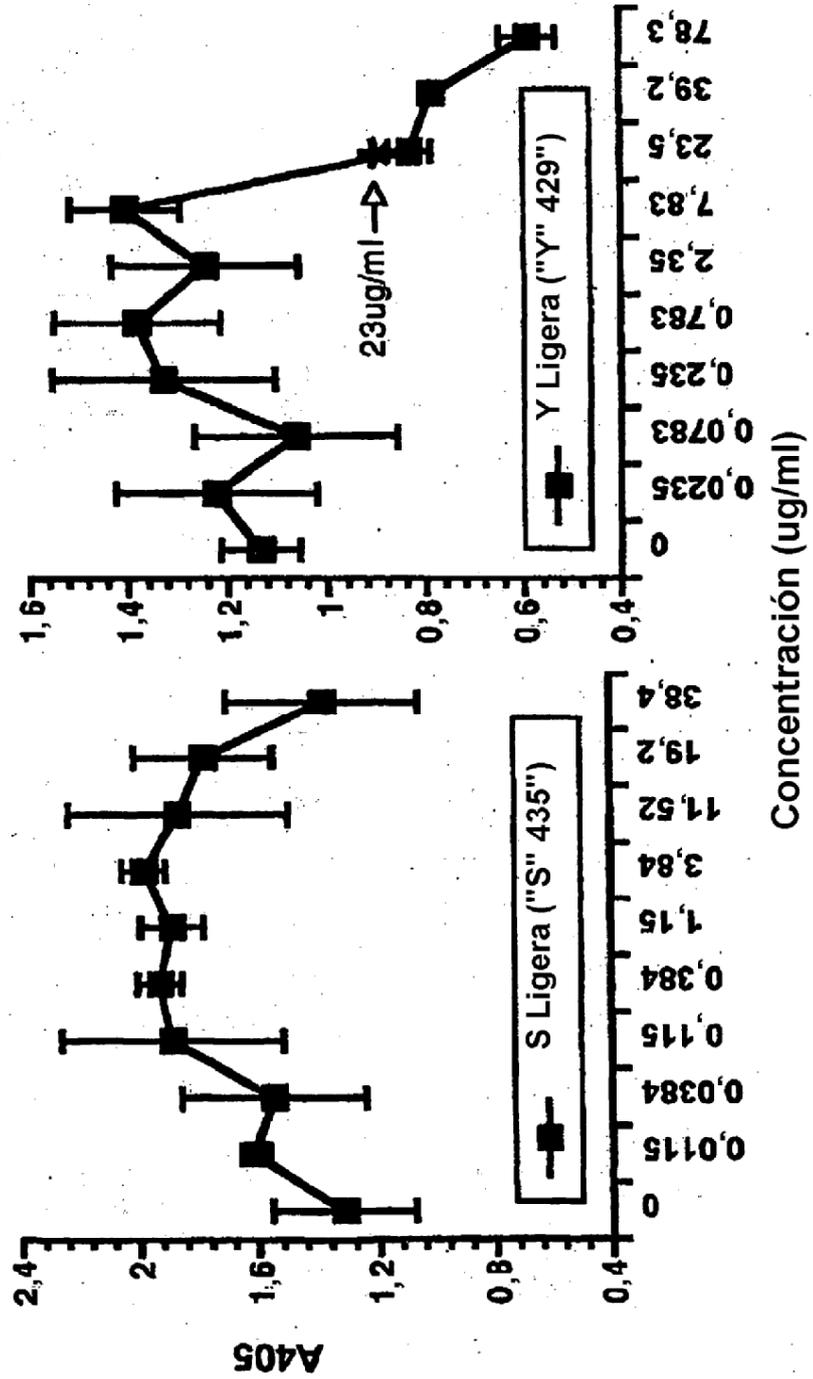


Figura 27
 Ensayo de médula ósea
 "Y" 435 y "P" 444

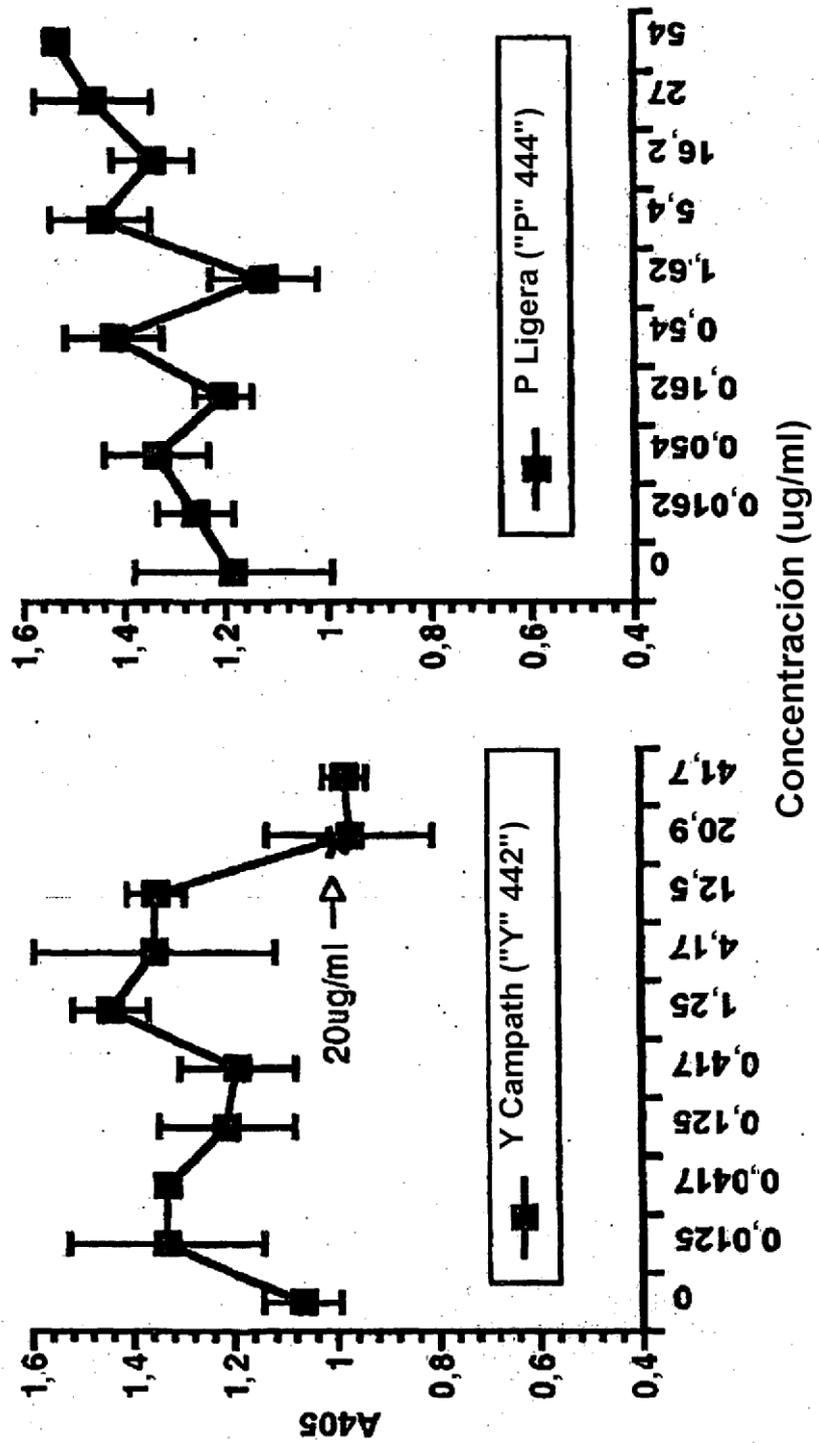


Figura 28

cat atg gac tac aag gac gac gat gac aag aag ctt aag cct gag gcc	48
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala	
1 5 10 15	
cag cca ttt gca cac ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg ggt	96
Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly	
20 25 30	
tcc cat aaa gtc act ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg gcc	144
Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala	
35 40 45	
aag atc tct aac atg acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac caa	192
Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln	
50 55 60	
gat ggc ttc tat tac ctg tac gct aac att tgc ttt cgg cat cat gaa	240
Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu	
65 70 75	
aca tcg gga gac ctg gct act gaa tat ctt cag ctg atg gtg tat gtc	288
Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val	
80 85 90 95	
gtt aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa gga	336
Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly	
100 105 110	
ggg agc acg aaa aac tgg tcg gcc aat tct gaa ttc cac ttt tat tcc	384
Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser	
115 120 125	
ata aat gtt ggg gga ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att agc	432
Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser	
130 135 140	
att cag gtg tcc aac cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg acg	480
Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr	
145 150 155	
tac ttt ggg gct ttc aaa gtt cag gac ata gac taa ctc gag	522
Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp	
160 165 170	

Figura 30

