

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 328**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/18</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/13</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/63</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/663</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008 E 13151551 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2586796**

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

30 Prioridad:

**12.10.2007 EP 07118414**  
**25.02.2008 EP 08151911**  
**29.07.2008 EP 08161342**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.05.2017**

73 Titular/es:

**MEREO BIOPHARMA 3 LIMITED (100.0%)**  
**4th Floor, One Cavendish Place**  
**London W1G 0QF, GB**

72 Inventor/es:

**KNEISSEL, MICHAELA;**  
**HALLEUX, CHRISTINE;**  
**HU, SHOU-IH;**  
**DIEFENBACH-STREIBER, BEATE y**  
**PRASSLER, JOSEF**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 614 328 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).

**Composiciones y métodos para uso de anticuerpos contra esclerostina****Descripción**5 Campo técnico

La presente invención se refiere a anticuerpos contra la esclerostina y composiciones y métodos de uso para dichos anticuerpos para tratar un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o enfermedades relacionadas con anomalías óseas como osteoporosis.

10

Antecedentes de la invención

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

15

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

20

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

25

30

35

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

40

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

45

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

50

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

55

60 **Resumen de la invención**

La invención se define por las reivindicaciones.

Una realización divulgada en la presente proporciona un anticuerpo o una proteína funcional que comprende una porción que enlaza a un antígeno de dicho anticuerpo para un objetivo en el polipéptido de la

65

esclerostina (SEQ ID NO: 155), caracterizado porque el anticuerpo o la proteína funcional enlaza específicamente con el polipéptido de la esclerostina y puede incrementar al menos uno de formación de huesos, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo, masa ósea, calidad ósea y resistencia ósea en un mamífero.

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

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

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

25 Por lo tanto, de acuerdo con otra realización preferida, los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen afinidades con la esclerostina en el rango de pM bajo e inhiben el impacto de la esclerostina en la señalización de wnt con un IC<sub>50</sub> de alrededor de 10 nM.

30 Mas preferiblemente, en otra realización preferida, los anticuerpos de acuerdo con la invención enlazan con una región de la esclerostina comprendida entre los aminoácidos 112 y 126 inclusive (esto es, dicha región consiste de los aminoácidos 112 a 126 de las SEQ ID NO: 155) y entre los aminoácidos 160 y 174 inclusive (esto es dicha región consiste de los aminoácidos 160 a 174 de las SEQ ID NO: 155) de las SEQ ID NO: 155, y más específicamente una región que superpone al menos los siguientes péptidos ARLLPNAIGRGKWWR (SEQ ID NO: 156) y RLVASCKCKRLTRFH (SEQ ID NO:157), respectivamente, y tienen afinidades con la esclerostina en el rango de pM bajo e inhiben el impacto de la esclerostina sobre la señalización de wnt con un IC<sub>50</sub> de alrededor de 10 nM. Tales anticuerpos tienen la capacidad de incrementar la masa ósea en el esqueleto axial y apendicular de un modelo animal de ratón en el nivel efectivo de tratamiento subcutáneo diario con una dosis anabólica estimadamente alta de hormona paratiroides (control positivo) y son por lo tanto útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con anomalías óseas tales como osteoporosis.

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

50 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de MOR05813\_IgG2lambda en la prueba de wnt-1

Figura 2: MOR05813\_IgG2lambda en mineralización inducida por BMP-2 en células MC3T3-1b

55 Figura 3: Efecto de MOR05813\_IgG2lambda en la LRP6-SOST ELISA

Figura 4: Efecto de MOR05813\_IgG2lambda en la prueba de fosfo-Smad1

60 Figura 5: A - Efecto de la anulación de LRP4 (siARN) sobre la acción inhibitoria de SOST en la prueba de wnt-1 en células Hek293 (números negros: con respecto a actividades de STF en la ausencia de SOST, números en negro resaltados: relación de actividades de STF en presencia/ausencia de SOST); especificidad B del efecto de la sobreexpresión de LRP4 sobre SOST IC<sub>50</sub> y Dkk1 IC<sub>50</sub> en la prueba de wnt-1 en células Hek293; especificidad C del efecto de la sobreexpresión de LRP4 sobre SOST en la acción inhibitoria de Dkk1 en la prueba de wnt-1 en células C28a2; especificidad D del efecto de la anulación de LRP4 (siARN) sobre la acción inhibitoria de SOST y Dkk1 en la prueba de wnt-1 en células Hek293;

modulación E de la actividad de MOR05813 por LRP4

- 5 Figura 6: Estudio en ratón in vivo, con pQCT - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa el contenido mineral total en hueso en la metáfisis de tibia proximal
- Figura 7: Estudio en ratón, con pQCT in vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral en hueso total en la metáfisis de tibia proximal
- 10 Figura 8: Estudio en ratón, con pQCT in vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa el espesor cortical en la metáfisis de tibia proximal
- Figura 9: Estudio en ratón, con uQCT in vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa el volumen de hueso esponjoso en la metáfisis de tibia proximal
- 15 Figura 10: Estudio en ratón, con uQCT in vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa el espesor trabecular en la metáfisis de tibia proximal
- Figura 11: Estudio en ratón, con pQCT in vivo - 5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral ósea total adicional en la metáfisis de tibia proximal
- 20 Figura 12: Estudio en ratón, ex vivo DEXA - 5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral ósea adicionalmente en la tibia
- Figura 13: Estudio en ratón, ex vivo DEXA - 5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral ósea adicionalmente en el fémur
- 25 Figura 14: Estudio en ratón, ex vivo DEXA - 5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la densidad mineral en hueso adicional en la espina
- 30 Figura 15: Estudio en ratón, histomorfometría ex vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa las ratas de formación ósea en el esqueleto apendicular (metáfisis del fémur distal)
- Figura 16: Estudio en ratón, histomorfometría ex vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la rata de aposición mineral en el esqueleto apendicular (metáfisis en fémur distal)
- 35 Figura 17: Estudio en ratón, histomorfometría ex vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa la superficie de mineralización en el esqueleto apendicular (metáfisis de fémur distal)
- Figura 18: Estudio en ratón, histomorfometría ex vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 incrementa las ratas de formación de hueso en el esqueleto axial (vértebra lumbar)
- 40 Figura 19: Estudio en ratón, histomorfometría ex vivo - 2.5 semanas de tratamiento con MOR05813 no afectan la reabsorción ósea en el esqueleto apendicular (metáfisis de fémur distal), medida por superficie de osteoclastos
- 45 Figura 20: ELISA que muestra el efecto de MOR05813\_IgG2lambda sobre enlace a SOST de LRP6. Se utilizó SOST 0.9 nM en cada caso
- 50 Figura 21: Estudio en ratón, pQCT in vivo después de co-tratamiento con MOR05813 y ácido zoledrónico, (A) Densidad mineral total en hueso, (B) Contenido mineral total en hueso, (C) Espesor cortical y (D) Densidad mineral en hueso esponjoso
- 55 Figura 22: Estudio en ratón, pQCT in vivo : tratamiento con MOR05813 después de pretratamiento con alendronato (alen), (A) Densidad mineral total en hueso, (B) Contenido mineral total en hueso, (C) Espesor cortical, y (D) Densidad mineral de hueso esponjoso
- 60 Figura 23: Estudio en ratón, in vivo pQCT después de co-tratamiento anabólico con MOR05813 y (i) anti-DKK1, o (ii) PTH, (A) Densidad mineral total ósea, (B) Contenido mineral total en hueso, (C) Espesor cortical, y (D) Densidad mineral de hueso esponjoso

Descripción detallada

65 La presente divulgación se refiere a anticuerpos aislados, particularmente anticuerpos humanos, que

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

enlazan específicamente con la esclerostina y que inhiben las propiedades funcionales de la esclerostina. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se derivan de secuencias de cadenas particulares pesadas y ligeras y/o comprenden características estructurales particulares como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. La divulgación proporciona anticuerpos aislados, métodos para hacer dichos anticuerpos, inmunocombinados y moléculas multivalentes o multispecíficas que comprenden dichos anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunocombinados o moléculas bispecíficas de la divulgación. La invención también se refiere a métodos para utilizar los anticuerpos para inhibir un trastorno o condición asociados con la presencia de la expresión de la esclerostina, por ejemplo, en el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina; por ejemplo, una enfermedad relacionada con los huesos como osteoporosis.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que "se enlaza específicamente al polipéptido de esclerostina" se entiende como la referencia a un anticuerpo que se enlaza al polipéptido de esclerostina con una KD de  $1 \times 10^{-8}$  M o

- 5 menos,  $1 \times 10^{-9}$  M o menos, o  $1 \times 10^{-10}$  M o menos. Un anticuerpo que "reacciona cruzado con un antígeno diferente a la esclerostina" se entiende como referencia a un anticuerpo que enlaza a ese antígeno con una  $K_D$  de  $0.5 \times 10^{-8}$  M o menos,  $5 \times 10^{-9}$  M o menos o  $2 \times 10^{-9}$  M o menos. Un anticuerpo que "no reacciona cruzado con un antígeno en particular" se entiende como referencia a un anticuerpo que se enlaza a ese antígeno, con una  $K_D$  de  $1.5 \times 10^{-8}$  M o más, o una  $K_D$  de entre  $5 \times 10^{-8}$  M y  $10 \times 10^{-8}$  M, o  $1 \times 10^{-7}$  M o mayor. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos que si no reaccionan cruzados con el antígeno exhiben esencialmente enlace indetectable contra estas proteínas en ensayos de enlace estándar.
- 10 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que "bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en una célula con base en una prueba de señalización de wnt" se entiende como referencia un anticuerpo que restaura la señalización inducida por wnt en presencia de esclerostina en una prueba de supertope instantáneo basada en células (STF) con un  $IC_{50}$  menor de 1 mM, 100 nM, 20 nM, 10 nM o menos. Tal ensayo SFT se describe en más detalle en los ejemplos más adelante.
- 15 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que "bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células" se entiende como referencia a un anticuerpo que restaura la mineralización inducida por BMP2 en presencia de esclerostina en una prueba basada en células con un  $IC_{50}$  menor de 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM o menos. Tales pruebas se describen en más detalle en los ejemplos más adelante.
- 20 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que "bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en la prueba de fosforilación de Smad1" se entiende como referencia a un anticuerpo que restaura la fosforilación de Smad1 inducida por BMP6 en presencia de esclerostina en un ensayo basado en células con un  $IC_{50}$  menor de 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM o menos. Tal ensayo se describe en más detalle en los ejemplos más adelante.
- 25 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que "inhibe el enlace de la esclerostina a LRP-6" se refiere a un anticuerpo que inhibe el enlace de la esclerostina a LRP-6 con un  $IC_{50}$  de 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 1 nM o menos. Tal ensayo se describe en más detalle en los ejemplos más adelante.
- 30 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo que "incrementa la formación y masa y densidad de huesos" se refiere a un anticuerpo que es capaz de alcanzar la formación de huesos, masa y densidad en el nivel de un tratamiento intermitente diario con una dosis anabólica alta de PTH como se muestra en el ejemplo 10.
- 35 El término " $K_{assoc}$ " o " $K_a$ ", tal como se utiliza aquí, se entiende como referencia a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno, mientras que el término " $K_{dis}$ " o " $K_D$ ", tal como se utilizan aquí, se entienden como referencia a la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término " $K_D$ ", tal como se utiliza aquí, se entiende como referencia a la constante de disociación, la cual es obtenida a partir de la relación de  $K_d$  a  $K_a$  (esto es,  $K_d/K_a$ ) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de  $K_D$  para los anticuerpos pueden ser determinados utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar el  $K_D$  de un anticuerpo es utilizando resonancia de plasmón en superficie, o utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Blacore®.
- 40 Tal como se utiliza aquí, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno en sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; cuanto más interacciones, más fuerte es la afinidad.
- 45 Tal como se utiliza aquí, el término "avidéz" se refiere a una medida informativa de la estabilidad global o resistencia del complejo anticuerpo-antígeno. Es controlado por tres factores principales: afinidad anticuerpo epítipo; la valencia tanto del antígeno como del anticuerpo; y la disposición estructural de las partes interactuantes. Finalmente estos factores definen la especificidad del anticuerpo, que es, la probabilidad de que el anticuerpo particular se esté enlazando a un epítipo de antígeno preciso.
- 50 Con el fin de obtener una sonda de avidéz más alta, puede construirse un conjugado dimérico, haciendo así interacciones de baja afinidad (tales como las que hay con el anticuerpo de línea germinal) más fácilmente detectadas por FACS. Además, otros medios para incrementar la avidéz del enlace al antígeno involucran la generación de dímeros, trímeros o multímeros de cualquiera de los constructos descritos aquí de los anticuerpos antesclerostina. Tales multímeros pueden ser generados a través de enlace covalente entre módulos individuales, por ejemplo, imitando el enlace natural de terminal C a N o imitando los dímeros de anticuerpos que se mantienen juntos a través de sus regiones constantes. Los enlaces manipulados en la interfaz Fc/Fc pueden ser covalentes o no covalentes. Además, los asociados de dimerización o multimerización diferentes a Fc pueden ser utilizados en los híbridos de esclerostina para crear tales estructuras de orden superior. Por ejemplo, es posible utilizar dominios de multimerización tales como dominios de trimerización descritos en Borean (WO2004039841) o dominios de pentamerización descritos en la solicitud publicada de Patente WO98/18943.
- 60 Tal como se utiliza aquí, el término "reactividad cruzada" se refiere a un anticuerpo o población de
- 65

anticuerpos que se enlazan a epítomos sobre otros antígenos. Esto puede ser causado bien sea por baja avidez o especificidad del anticuerpo o por múltiples antígenos distintos que tienen epítomos idénticos o muy similares. La reactividad cruzada algunas veces es deseable cuando se quiere un enlace general a un grupo relacionado de antígenos o cuando se intenta el etiquetado de especies cruzadas cuando la secuencia del epítomo del antígeno no es altamente conservada en la evolución.

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

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

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

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

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

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

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

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

Detalles adicionales sobre ambos métodos se dan en los Ejemplos.

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

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

#### Anticuerpos monoclonales

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

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

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

En otro aspecto, la divulgación proporciona:

- (i) un anticuerpo monoclonal aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 113 – 121; y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 124 – 132; o
- (ii) una proteína funcional que comprende una porción de enlace a antígeno de la misma.

En otro aspecto, la divulgación proporciona:

- 5 (i) un anticuerpo monoclonal aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de nucleótidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 135 – 143; y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de nucleótidos que ha sido optimizada para expresión en la célula de un mamífero seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 146 – 154; o.
- 10 (ii) una proteína funcional que comprende una porción de enlace a antígeno de la misma.

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

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

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

50 El anticuerpo de la invención comprende: una región variable de cadena pesada CDR1 de la SEQ ID NO: 4; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 15; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 26; una región variable de cadena ligera CDR1 de la SEQ ID NO: 37; una región variable de cadena ligera CDR2 de la SEQ ID NO: 48; y una región variable de cadena ligera CDR3 de la SEQ ID NO: 59.

55 Tal como se utiliza aquí, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o ligeras de longitud completa que son “el producto de” o “derivadas de” una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables o las cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humanos con el antígeno de interés o seleccionando una biblioteca de gen de inmunoglobulina humana desplegada sobre un fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es “el producto de” o “derivado de” una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina germinal humana que es más cercana en secuencia (esto es, el mayor porcentaje de identidad) con respecto a la secuencia del anticuerpo humana. Un anticuerpo humano que es el “producto de” o “derivado de” una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana en particular puede contener diferencias en aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o inducción

intencional de mutaciones dirigidas al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado a partir de una secuencia de línea germinal humana en particular desplegará no más de 10 diferencias en aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana.

En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia en aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal se seleccionan de aquellas que comprenden las secuencias de cadena pesada variable que consisten de las SEQ ID NO: 67 – 68 respectivamente, y las secuencias de cadena ligera variable consistente de las SEQ ID NO: 78 -79 respectivamente.

#### Anticuerpos homólogos

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

Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado (o una proteína funcional que comprende una porción enlazante al antígeno de la misma) que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 67 -77; la región de cadena variable ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 78 -88; el anticuerpo se enlaza específicamente a la esclerostina, y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt basado en células, el anticuerpo bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células o bloquea el efecto inhibitor de la esclerostina en el ensayo de fosforilación de Smad1 o el anticuerpo inhibe el enlace de la esclerostina al LRP-6 o el anticuerpo incrementa la formación y masa y densidad óseas.

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

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

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

5 En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  y/o  $V_L$  pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias definidas anteriormente. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  y/o  $V_L$  pueden ser idénticas excepto una sustitución de aminoácido en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones  $V_H$  y  $V_L$  que tiene alta identidad (esto es 10 80% o mayor) a las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de las SEQ ID NOs 67 – 77 y SEQ ID NOs 78 – 88 respectivamente, puede ser obtenido por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de las moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 89 – 99 y 100 – 110 respectivamente, seguido por la prueba del anticuerpo alterado codificado en cuanto a la función retenida (esto es, las funciones definidas anteriormente) utilizando los ensayos funcionales descritos aquí.

15 En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y/o la cadena ligera de longitud completa pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias definidas anteriormente. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa que tienen alta identidad (esto es, 80% o mayor) a las cadenas pesadas de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID NOs 111 – 121 y cadenas ligeras de longitud completa de cualquiera de SEQ ID NOs 122 – 132 respectivamente, pueden ser obtenidos por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis 20 dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 133 – 143 y SEQ ID NOs: 144 – 154 respectivamente, seguido por la prueba de anticuerpo alterado codificado para la función retenida (esto es, las funciones definidas anteriormente) utilizando los ensayos funcionales descritos aquí.

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

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

35 Tal como se utiliza aquí, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, porcentaje de identidad = # de posiciones idénticas/total # de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, las cuales necesitan ser introducidas para el alineamiento óptico de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse utilizando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitantes que siguen más adelante.

40 El porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput, Appl. Biosci., 4: 11 – 17, 1988) el cual ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM 120, una penalidad de longitud de brecha de 12 y una penalidad de brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444 – 453, 45 1970) el cual ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando bien sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

50 Adicional o alternativamente, las secuencias de proteína de la presente invención pueden ser utilizadas adicionalmente como una "secuencia de pregunta" para llevar a cabo una búsqueda contra bases de datos públicos para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden ser llevada a cabo utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al., 1990 J. Mol Biol. 215: 403 – 10. Las búsquedas de proteína BLAST pueden ser llevadas a cabo con el programa XBLAST, marcación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpos de la invención. Para obtener alineamientos con brecha para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 55 1997 Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389 – 3402. Cuando se utiliza los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden ser usados los parámetros de fondo de los programas respectivos (por ejemplo XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### 60 Anticuerpos con modificaciones conservadoras

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la divulgación tiene una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias CDR tienen secuencias de aminoácidos 65 especificadas con base en los anticuerpos descritos aquí o modificaciones conservadoras de los mismos, y en

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

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

30 En otras realizaciones, un anticuerpo de la divulgación optimizado para expresión en una célula de mamífero tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa y una secuencia de cadena ligera de longitud completa, en donde una o más de estas secuencias tienen secuencias de aminoácidos especificadas con base en los anticuerpos descritos aquí o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos antiesclerostina de la invención. De acuerdo con lo anterior, la divulgación provee un anticuerpo monoclonal aislado utilizado para expresión en una célula de mamífero que consiste de una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa en donde: la cadena pesada de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOs: 111 – 121, y modificaciones conservadoras de los mismos; y la cadena ligera de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 122 – 132, y modificaciones conservadoras de las mismas; el anticuerpo se enlaza específicamente a la esclerostina; y el anticuerpo exhibe al menos una de las siguientes propiedades funcionales: el anticuerpo bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de señalización de wnt basado en células, el anticuerpo bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células o bloquea el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de fosforilación de Smad1 o el anticuerpo inhibe el enlace de la esclerostina al LRP4 - 6 o el anticuerpo incrementa la formación y masa y densidad ósea .

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

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

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

65

Anticuerpos manipulados y modificados

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

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

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

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

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

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

De acuerdo con lo anterior, en otra realización, la divulgación proporciona anticuerpos monoclonales

antiesclerostina aislados, o una proteína funcional que comprende una porción de enlace de antígeno en la misma, que consiste de una región variable de cadena pesada que tiene: una región de CDR1 de VH que consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 1 – 11 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 1 -11; una región CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 12 – 22, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 12 -22; una región CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 23 – 33, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 23 -33; una región CDR1 de VL que tiene de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 34 – 44, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 34 - 44; una región CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 45 – 55, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 45 -55; y una región CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 56 – 66, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 56 -66.

#### 20 Injerto de dominios que enlazan con el antígeno en marcos o supercántigos alternativos

Se pueden emplear una amplia variedad de marcos o supercántigos de anticuerpo/inmunoglobulina siempre y cuando el polipéptido resultante incluya al menos una región de enlace que enlace específicamente con la esclerostina. Dichos marcos o supercántigos incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de las mismas (como los descritos en otra parte en la presente), e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferiblemente que tengan aspectos humanizados. Los anticuerpos de cadena pesada individuales como los identificados en los camélidos son de particular interés a este respecto. Nuevos marcos, supercántigos y fragmentos continúan siendo descubiertos y desarrollados por los expertos en la técnica.

En un aspecto, la invención se refiere a generar anticuerpos no basados en inmunoglobulina usando supercántigos no de inmunoglobulina en los que se pueden injertar los CDR de la invención. Se pueden emplear marcos y supercántigos no de inmunoglobulina conocidos o futuros, siempre que comprenda una región de enlace específica para la proteína objetivo de la SEQ ID NO: 155. Dichos compuestos son conocidos en la presente como "polipéptidos que comprenden una región de enlace específica del objetivo". Ejemplos de marcos no de inmunoglobulina se describen adicionalmente en las secciones siguientes (anticuerpos de camélidos y supercántigo no de anticuerpo).

#### Manipulación de marco o Fc

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

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

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

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

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

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

En todavía otras realizaciones, la región Fc es alterada por reemplazo de al menos un residuo de aminoácido con un diferente residuo de aminoácido para alterar las funciones de efecto del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser reemplazados con un diferente residuo de aminoácido de tal forma que el anticuerpo tiene una afinidad alterada para un ligando de efecto pero retiene la capacidad de enlace del antígeno del anticuerpo original. El ligando de efecto al cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Esta metodología está descrita en mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 624,821 y 5, 648,260 ambas de Winter et al.

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

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

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

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

Adicional o alternativamente, puede hacerse un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras GLcNac bisectadas incrementadas. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado incrementar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones en carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula anfitriona con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en la técnica y pueden ser utilizadas como células anfitrionas en las cuales se expresan anticuerpos recombinantes para producir por lo tanto un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, la EP 1,176,195 de Hang et al., describe una línea celular con un gen FUT8 de funcionalidad perturbada, el cual codifica una fucosil transferasa, tal que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación. La Publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de línea celular CHO, células Lecl3, con capacidad reducida para enlazar fucosa a carbohidratos enlazados con Asn(297), dando como resultado también la hipofucosilación de anticuerpos expresada en esa célula anfitriona (véase también Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733 – 26740). La Publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al.,

describe líneas celulares manipuladas para expresar glicosil transferasas modificantes de la glicoproteína (por ejemplo, beta (1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal forma que los anticuerpos expresados en la línea celular es manipulada exhiben estructuras de GlcNac bisectadas incrementadas lo que da como resultado una actividad ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176 – 180).

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

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

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

#### Métodos para manipular anticuerpos alterados

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

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

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

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

anticuerpo de cadena pesada de longitud completa y/o la secuencia de anticuerpo de cadena ligera de longitud completa para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

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

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

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

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

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

#### 40 Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención

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

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

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

65

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

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

El ADN aislado que codifica la región  $V_L$  puede ser convertido en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también en un gen Fab de cadena ligera) enlazando operativamente el ADN que codifica  $V_L$  a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. La secuencia de genes de región constante de cadena ligera humanos son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo Kabat E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden ser obtenidos por amplificación estándar por PCR. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

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

#### Generación de anticuerpos monoclonales de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, esplenocitos y/o células nodulares linfáticas de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden ser seleccionados para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos a partir de ratones inmunizados pueden ser fusionadas a un sexto del número de células de mielomas de ratón no secretadoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células son sembradas en placa a aproximadamente 2 x 145 en placas de microtitulación de fondo plano, seguidas por incubación de dos semanas en un medio selectivo que contiene 20% de suero de clon fetal, medio condicionado "653" al 18%, origen al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0.055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT es agregado 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden

ser cultivadas en un medio en el cual el HAT es reemplazado con HT. Los pozos individuales pueden entonces ser seleccionados por ELISA en búsqueda de anticuerpos monoclonales IgM e IgG humanos. Una vez que ocurre el crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede ser observado usualmente después de 10 – 14 días. Los hibridomas que secretan el anticuerpo pueden ser resembrados, seleccionados de nuevo, y si todavía son positivos en cuanto a IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden ser subclonados al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden ser entonces cultivados in vitro para generar pequeñas cantidades del anticuerpo en un medio para cultivo de tejidos para su caracterización.

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

#### Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

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

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

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

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión

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

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

Las células anfitrionas de mamíferos para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr, descritas por Urlaub y Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 usadas con un marcador seleccionable DH FR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621, células de mieloma de NSO, células COS y células SP2. En particular, para uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión del gen GS mostrado en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes del anticuerpo se introducen en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos son producidos por el cultivo de células anfitrionas durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o la secreción del anticuerpo hacia el medio de cultivo en el cual están cultivadas las células anfitrionas. Los anticuerpos pueden ser recuperados a partir del medio de cultivo utilizando métodos estándar de purificación de proteínas.

#### Moléculas biespecíficas

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

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

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

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

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

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

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

25 Alternativamente, ambas especificidades de enlace pueden ser codificadas en el mismo sector y expresadas y ensambladas en la misma célula anfitriona. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una mAb, x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o la proteína de fusión ligando x Fab. Una molécula biespecífica puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de enlace, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de enlace. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos No. 5,260,203; la Patente de los Estados Unidos 5,455,030; Patente de los Estados Unidos No. 4,881,175; Patente de los Estados Unidos No. 5,132,405; Patente de los Estados Unidos No. 5,091,513; Patente de los Estados Unidos No. 5,476,786; 30 Patente de los Estados Unidos No. 5,013,653; Patente de los Estados Unidos No. 5,258,498; y Patente de los Estados Unidos No. 5,013,653; Patente de los Estados Unidos No. 5,258,498; y Patente de los Estados Unidos No. 5,482,858.

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

#### 40 Anticuerpos multivalentes

45 En otro aspecto, la presente divulgación provee compuestos multivalentes comprenden al menos dos porciones de enlace a antígeno idénticas o diferentes de los anticuerpos de la invención en que enlazan a la esclerostina. Preferiblemente, dada la naturaleza trimérica de la esclerostina, los compuestos de la invención proporcionan al menos tres o cuatro porciones de enlace al antígeno del anticuerpo. Las porciones de enlace al antígeno pueden ser enlazadas entre sí a través de fusión con proteína o un enlace covalente o no covalente. Alternativamente, se han descrito métodos de enlace para moléculas biespecíficas. Los compuestos tetravalentes pueden ser obtenidos por ejemplo entrecruzamiento de anticuerpos de los anticuerpos de la invención con un anticuerpo que se enlace a las regiones constantes de los anticuerpos de la invención, por ejemplo el Fc o la región bisagra.  
50

Los dominios de trimerización están descritos por ejemplo, en la Patente Borean EP 1 012 280B1. Los módulos pentamerizantes están descritos por ejemplo en PCT/EP97/05897.

#### 55 Composiciones farmacéuticas

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

65 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ser administradas en una terapia de

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

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

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

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascórbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse de tal manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que sea

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

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

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

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

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

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

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

Usos y métodos de la invención

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

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

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

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

25 Tal como se utiliza aquí "un trastorno relacionado con esclerostina" incluye condiciones asociadas con o caracterizadas por niveles aberrantes de esclerostina. Estos incluyen cánceres y condiciones osteoporóticas (por ejemplo, osteoporosis u osteopenia), algunos de los cuales se superponen con "trastornos relacionados con la esclerostina" tal como se define aquí. Los cánceres relacionados con la esclerostina pueden incluir mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple con lesiones osteolíticas), cáncer de seno, cáncer de colon, melanoma, cáncer hepatocelular, cáncer epitelial, cáncer esofágico, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o cáncer pancreático, así como muchas metástasis de los mismos.

30 Un "trastorno relacionado con la esclerostina" también puede incluir condiciones renales y cardiovasculares, debidas al menos a la expresión de la esclerostina en el riñón y en la cardiovascular. Dichos trastornos incluyen pero no se limitan a trastornos renales tales como enfermedades glomerulares (por ejemplo, glomerulonefritis aguda y crónica, glomerulonefritis rápidamente progresiva, síndrome nefrótico, glomerulonefritis focal proliferativa, lesiones glomerulares asociadas con enfermedad sistémica, tales como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, mieloma múltiple, diabetes, enfermedad policística del riñón, neoplasia, enfermedad de células falciformes, y enfermedades inflamatorias crónicas), enfermedades tubulares (por ejemplo, necrosis tubular aguda y fallo renal agudo, enfermedad renal policística, riñón medularmente esponjoso, enfermedad cística medular, diabetes nefrogénica, y acidosis tubular renal), enfermedades túbulointersticiales (por ejemplo, pielonefritis, nefritis túbulointersticial inducida por fármacos y toxinas, nefropatía hipercalcémica, y nefropatía hipocálemica) fallo renal agudo y rápidamente progresivo, fallo renal crónico, nefrolitiasis, gota, enfermedades vasculares (por ejemplo, hipertensión y nefrosclerosis, anemia hemolítica microangiopática, enfermedad renal ateroembólica, necrosis cortical difusa e infartos renales), o tumores (por ejemplo, carcinoma de células renales y nefroblastomas).

35 Dichos trastornos incluyen también pero no se limitan a trastornos cardiovasculares tales como enfermedad cardíaca isquémica (por ejemplo angina pectoris, infarto del miocardio, y enfermedad cardíaca isquémica crónica), enfermedad cardíaca por hipertensión, enfermedad cardiopulmonar, enfermedad cardiovalvular (por ejemplo, fiebre reumática y enfermedad de corazón reumático, endocarditis, prolapso de la válvula mitral y estenosis de la válvula aortica), enfermedades cardíacas congénitas (por ejemplo, lesiones valvulares y vasculares obstructivas, defecto de los septums atriales o ventriculares, y ductus arteriosus patentes), o enfermedad del miocardio (por ejemplo miocarditis, cardiomiopatía congestiva, y cardiomiopatía hipertrófica).

40 Cuando los anticuerpos para la esclerostina se administran junto con otro agente, los dos pueden ser administrados en cualquier orden (esto es secuencialmente) o simultáneamente.

45 De acuerdo con una realización adicional de la invención, los anticuerpos de la invención pueden ser empleados como adjuntos o adyuvantes para otra terapia, por ejemplo, una terapia que utilice un inhibidor de resorción ósea, por ejemplo una terapia para osteoporosis, en particular una terapia que emplee calcio, una

60

65

5 calcitonona o un análogo o un derivado de la misma, por ejemplo, calcitonina de salmón, anguila o humana, calcilíticos, calcimiméticos (por ejemplo cinacalcet), una hormona esteroide, por ejemplo un estrógeno, un agonista de estrógeno parcial o una combinación estrógeno-gestágeno, un SERM (modulador del receptor de estrógenos selectivo), por ejemplo raloxifeno, lasofoxifeno, bazedoxifeno, arzoxifeno, FC1271, Tibolona (Livial®), un SARM (modulador del receptor selectivo de andrógeno), un anticuerpo RANKL (tal como denosumab), un inhibidor de la cathepsina K, vitamina D o un análogo del mismo o PTH, un fragmento de PTH o un derivado de PTH, por ejemplo PTH (1-84) (tal como Preys™), PTH (1-34) (tal como Fortes™), PTH (1-36), PTH (1-38), PTH (1-31)NH<sub>2</sub> o PTS 893. De acuerdo con otra realización, los anticuerpos de la invención pueden ser empleados en combinación con otras metodologías de terapia de osteoporosis actuales, incluyendo bisfosfonatos (por ejemplo, Fosamax™ (alendronato), Actonel™ (risedronato sodio), Bonviva™ (ácido ibandronico), Zometa™ (ácido zoledrónico), Aclasta™/Reclast™ (ácido zoledrónico), olpadronato, neridronato, skelid, bonefos), estatinas, esteroides anabólicos, sales de lantano y estroncio, y fluoruro de sodio.

15 En una realización específica, los anticuerpos de la invención pueden ser administrados en combinación con un agente modulador de LRP4, esto es, un agente que modula la expresión o la actividad del LRP4, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante de LRP4.

20 En otra realización específica, los anticuerpos de la invención pueden ser administrados en combinación con un agente modulador de DKK1, esto es como un agente que interfiere o neutraliza el antagonismo mediado por Dkk-1 de la señalización de Wnt, por ejemplo, un anticuerpo neutralizador de DKK1.

25 Así, la invención también provee el uso de un anticuerpo o proteína funcional de la invención y (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes liberadores de hormona paratiroides (calcilíticos), y la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que es mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel incrementado de esclerostina.

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

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

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

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

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

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

60 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención provee adicionalmente métodos para detectar la presencia de esclerostina (por ejemplo, antígeno de esclerostina humana) en una muestra, o medir la cantidad de esclerostina, comprendiendo poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo de la invención o una región de enlace al antígeno del mismo, el cual específicamente se enlaza a la esclerostina, bajo

condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y esclerostina. La formación de un complejo se detecta entonces, en donde una diferencia en la formación de complejo entre la muestra comparada con la muestra de control es indicativa de la presencia de esclerostina en la muestra.

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

15 Habiendo sido descrita la invención completamente, se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que son ilustrativos y no pretenden ser adicionalmente limitantes. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de cerciorarse usando no más que la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en la presente. Tales equivalentes están dentro del alcance de la presente divulgación.

20

**Ejemplos:**

**Ensayos funcionales**

25 Ensayos de fosfatasa alcalina (ALP)

Células

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

Medio de cultivo

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

40

Soluciones de reserva

45 Ácido ascórbico 10 mM (Wako Pure Chemical Cat#013-12061) en DMEM-LG, BMP-2 14 nM (R&D Cat#355-BM-010) en ácido acético 5 mM y albúmina de suero bovino al 0.1% (BSA, Sigma Cat#A-8806);  $\beta$ -glicerofosfato 1 M (Sigma Cat#G9891) en solución Tyrode; solución Tyrode: 9.72g de sal de Tyrode (Sigma Cat#T2145) y 1g de NaHCO<sub>3</sub> en 1L de H<sub>2</sub>O, regulador de sustrato ALP: glicina 25 mM y MgCL<sub>2</sub> 0.5 mM, pH 10.5; solución de sustrato ALP: 5mg de p-nitrofenil fosfato (sustrato Sigma 104, Sigma Cat#50942-200TAB) en 3.75ml de regulador de sustrato ALP, pH 10.5; p-nitrofenol 1 mM (Sigma Cat#104-1) en solución de sustrato ALP.

50 Ensayo

55 Para los ensayos ALP, las células MC3T3 1b fueron cultivadas en medio de cultivo de ensayo (correspondiente al medio de cultivo de mantenimiento en ausencia de G418). Las MC3T3 1 b fueron sembradas en 200  $\mu$ l 3x10<sup>4</sup> células/ml si la inducción comenzó 72 horas después o 2x10<sup>4</sup> células/ml si la inducción comenzó 96 horas después. Las placas fueron incubadas durante 72 horas o 96 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, antes de que se iniciara la inducción utilizando medio completo (complementando el medio de cultivo con  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM (bGP) y ácido ascórbico 50  $\mu$ M (AA)). Los anticuerpos por probar fueron diluidos con medio completo. El anticuerpo junto con BMP-2 (0.7 nM) y esclerostina (50 nM) fueron agregados a los pozos (por triplicado) en un volumen final de 200  $\mu$ l de medio completo. En cada placa, se incluyeron 4 controles internos en triplicado: un control de solvente (BSA), un control de BMP-2 (0.7 nM), BMP-2 + esclerostina (BMP-2 (0.7 nM) y esclerostina (50 nM)) y un control de esclerostina (50 nM). Las placas fueron incubadas durante otras 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al final del periodo de inducción el ensayo fue terminado eliminando el medio y agregando 150  $\mu$ l de solución de sustrato de ALP (recién preparada) a cada pozo. Las placas fueron incubadas durante 3 – 30 minutos. Se agregaron 100  $\mu$ l de NaOH 1M para detener la reacción y las placas fueron agitadas sobre un agitador de placas. Se leyó la OD contra un blanco a 405 nM y se calculó la actividad de ALP en nmol/minuto. Se utilizó esclerostina 50 nM para obtener al

65

menos 70% de inhibición de producción de ALP inducida por BMP-2 [0.7 nM BMP-2].

Ensayo de WNT

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

Transfección de células HEK293

10 En el día 1, se sembraron las células HEK293 a  $1.3 - 1.4 \times 10^5$  células por pozo (en volumen de 0.5 ml) de una placa de poli-D-lisina de 24 pozos (BD-BioCoat #356414) en DMEM (Gibco, Cat#61965-026) que contenía 10% de suero de ternera fetal (FCS), 1% de L-glutamina (Gibco, Cat #25030.024), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco, cat #11140) sin antibióticos. La transfección fue llevada a cabo en el día 2 con lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat#11668-019). Para cada pozo que se iba a transfectar, se agregaron las siguientes cantidades de plásmidos hasta un volumen final de 50  $\mu$ l OptiMEM@I (Gibco, Cat#31985-047): para pozos de control (pcDNA3+, 480 ng; SuperTopFlash (STF) 20 ng; phRL-CMV, 0.5 ng) y para pozos de tratamiento con Wnt1 (pcDNA-wnt1, 20 ng; pcDNA3+, 460 ng; SuperTopFlash (STF) 20 ng; phRL-CMV, 0.5 ng).

20 En un segundo tubo, se diluyeron 1.6  $\mu$ l de lipofectamina 2000 en 50  $\mu$ l de OptiMEM@I y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. El contenido de los dos tubos fue mezclado entonces agregando el contenido del tubo de lípido al tubo de ADN y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo ADN-lípido. El complejo ADN-lípido (100  $\mu$ l) fue agregado entonces de manera homogénea a los pozos y se incubó a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 5 horas. Al final de la incubación de 5 horas, las celdas estaban listas para tratamiento con los reactivos de prueba tales como SOST, anticuerpos etc.

25 Establecimiento de la inhibición dependiente de la dosis de SOST

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

35 Prueba de los anticuerpos anti SOST

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

Ensayo con luciferasa

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

55 Cálculo de los datos

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

Ensayo de mineralización

Células

65 Las células MC3T3 1b son un clon de las células MC3T3-JP que expresan OSE2-luc. Este clon fue

obtenido después de transfección de MC3T3-JP (osteoblastos de ratón MC3T3-E1, clon de Japón, Jp; un amable obsequio del Dr. T. Kokkubo, Novartis, Japón) utilizando 8x-OSE2wt-mOG2luc en pcDNA3.1+.

Medio de cultivo

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

Ensayo de Mineralización

El calcio asociado con la matriz depositado en los pozos fue determinado en células MC3T3-1b utilizando el kit de calcio (Axon Lab, Cat#AXON0012). Las células fueron sembradas a 6x10<sup>3</sup> células/pozo o 2x10<sup>3</sup> células/pozo para mejorar la respuesta de las células en placas de 96 pozos en 100  $\mu$ l de medio de cultivo de ensayo (medio de cultivo de mantenimiento sin G418) y se incubaron durante 3 días hasta alcanzar la confluencia. El medio de cultivo de ensayo fue cambiado entonces y se probaron los compuestos agregados junto con  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM (bGP; Sigma Cat#G9891) y ácido ascórbico 50  $\mu$ M (AA; Wako Pure Chemical Cat#013-12061). Antes de su adición a las células, la esclerostina y los Fab que se iban a probar fueron preincubados en una placa separada durante 2 horas a temperatura ambiente; entre tanto las placas de ensayo de 96 pozos recibieron BMP-2 2.1 o 2.8 nM (R&D Systems, Cat#355-BM-010) antes de recibir la mezcla esclerostina-Fab. Las células fueron incubadas durante 14 días y el medio de ensayo se reemplazó cada 3-4 días. En resumen, al final de la incubación, las células fueron lavadas dos veces con 200  $\mu$ l de PBS/pozo, se agregaron 50  $\mu$ l de HCl 0.5 M en cada pozo y las placas fueron congeladas a -20°C durante un mínimo de 24 horas. En el momento apropiado, las placas fueron descongeladas hasta temperatura ambiente durante 2 horas y se transfirieron 10  $\mu$ l de cada pozo a una nueva placa de 96 pozos. Se agregó entonces Solución de Trabajo de Calcio (1:5) (200  $\mu$ l) y 5-30 minutos después, las placas fueron leídas a 595 nM sobre un lector de microplacas.

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

Fosforilación de SMAD1 Western

Material

- Osteoblastos de ratón MC3T3-E1 (clon de Japón, amable obsequio del Dr. T. Kokkubo, Novartis, Japón)
- células C3H10T1/2 (embrión mesenquimal de ratón; ATCC, Cat.Nb.: CCL-226)
- SCL no-glicosilado, derivado de E. coli (Novartis, PSU5257)
- 15N SCL no-glicosilado, derivado de E. coli (Novartis, PSU11274)
- hSOST-APP, glicosilado, derivado de HEK-EBNA (Novartis, BTP11100)
- rhSCL, glicosilado, derivado de células de mieloma de ratón (R&D Systems, Cat.Nb.: 1406-ST/CF) Anticuerpo anti hSOST (R&D Systems, Cat.Nb.: AF1406)
- Reactivo de extracción phosphoSafe (Novagen, Cat. Nb.: 71296-3)
- Coctel inhibidor de proteasa conjunto III (Calbiochem, Cat. Nb.: 539134)
- Gel de tris acetato NuPAGE Novex al 7%, 1.5 mm, 15 pozos (Invitrogen, Cat. Nb.: EA03585)
- Regulador de desarrollo tris-acetato SDS 20x (Invitrogen, Cat. Nb.: LA0041)
- Antioxidante NuPAGE (Invitrogen, Cat. Nb.: NP0005)
- Membrana de transferencia inmobilon-P de 0.45  $\mu$ m (Millipore, Cat. Nb.: IPVH00010)
- Papel de cromatografía Wattman (Merck, Cat. Nb.: 3587600)
- XCell SureLock Mini-Cell and XCell II Blot Module (Invitrogen)
- Lector de microplacas VersaMax (Bucher)

Cultivo y extracción de células

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

Las células fueron sembradas en medio de cultivo de mantenimiento en placas de 6 pozos (3 ml/pozo) y cultivadas hasta la confluencia (con 1.4x10<sup>5</sup> células de MC3T3-1b/pozo, la confluencia fue alcanzada en el día 3; con las células C3H10T1/2 a 1.0x10<sup>5</sup> células/pozo, la confluencia fue alcanzada en el día 3). Después de la caída del suero durante la noche en el medio de cultivo que contenía FBS al 1%, el medio fue reemplazado con uno fresco

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

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

## 20 Inmunoprecipitación Western

El anticuerpo Smad (H-465) (Santa Cruz, Cat.Nb.; sc-7153) es una IgG policlonal de conejo, elevada contra aminoácidos 1-465 que representan el Smad1 de longitud completa de origen humano. Debería reconocer Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8 de origen humano, de rata y ratón. El anticuerpo fosfo-Smad1 (Ser463/465)/Smad5 (Ser463/465)/Smad8 (Ser426/428) (Cell Signalling, Cat#9511) es una IgG policlonal de conejo, elevada contra un fosfopéptido sintético correspondiente a residuos que circundan la Ser463/465 de mad5 humano. Debe detectar niveles endógenos de Smad1 solamente cuando son fosforilados de manera dual en la serina 463 y serina 465, así como Smad5 y Smad8 solamente cuando son fosforilados en los sitios equivalentes de origen humano, de ratón, de rata, de mink y de xenopous. El anticuerpo no tiene reacción cruzada con otras proteínas relacionadas con Smad.

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

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

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

Rad) and Camera. Se determinó un tiempo de exposición óptimo de 1 a 2 minutos por comparación de imágenes tomadas desde 30 segundos hasta 5 minutos.

5 Análisis de datos

Las actividades de quimioluminiscencia fueron medidas utilizando Quantity One (Bio-Rad) y los valores EC<sub>50</sub> fueron calculados utilizando el software Xlfit4. Cada señal de fosfo-Smad fue normalizada por su correspondiente señal total de Smad.

10 ELISA de LRP6 / Esclerostina

15 Placas no tratadas de microtitulación de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µl/pozo de LRP6/Fc (1 µg/ml, R&D Systems, Cat#1505-LR) diluido en PBS. Como control para enlace no específico (NSB), algunos pozos fueron llenados con 100 µl/pozo de PBS. Las placas fueron recubiertas con película plástica e incubadas durante la noche a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, las placas fueron lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 (Fluka, Cat#93773) al 0.05% en PBS y los pozos fueron bloqueados durante 1 hora a 37°C agregando 300 µl/pozo de regulador de bloqueo SuperBlock (Pierce, Cat#37535) en TBS. Después de la incubación, la solución de bloqueo fue retirada y se agregaron 100 µl/pozo de esclerostina (derivada de E.coli, Novartis; 1 – 1000 ng/ml,) diluida en BSA al 1% en PBS. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Después de esto, se agregaron 100 µl/ pozo de anticuerpo antiesclerostina (1µg/ml) diluido en BSA al 1% en PBS y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Finalmente, se agregaron 100 µl/pozo de IgG Ab anticabra conjugado con ALP (1:5000; Sigma Cat#A-7888) diluido en BSA al 1% (Sigma Cat. Nb.:A-7888) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y las placas fueron lavadas entonces 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Para determinar la ALP, se agregaron 100 µl/pozo de sustrato ALP (Sigma, Cat#S0942) en solución (1 tableta por 5ml de regulador de sustrato de dietanolamina 1x; Pierce, Cat#34064) a las placas durante 90 minutos y se midió la densidad óptica a 405 nm.

30 Sobreexpresión de LRP4 en células HEK293

35 Las células HEK293 (ATCC Cat#CRL-1573) fueron cultivadas de rutina en DMEM/F12 (Invitrogen Cat#21331-020) complementado con FCS al 10% (BioConcept Cat#2-01F10-I, lote Z04459P), L-glutamina 2 mM (Invitrogen Cat#25030-024), 100 IU de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen Cat#15140-122) y HEPES 10 mM (Invitrogen Cat#15630-056). Las células Hek293 fueron sembradas a 5x10<sup>4</sup> células/pozo en poli-D-lisina en formato de placa de 48 pozos y se incubó durante 24 horas antes de llevar a cabo la transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen Cat#11668-019). Para cada pozo que se iba a transfectar, se agregaron las siguientes cantidades de plásmidos hasta un volumen final de 25 µl de OptiMEM® (Gibco, Cat#31985-047) y se mezclaron suavemente: para pozos de control (pmaxGFP, 62.5 ng, pcDNA3+, 125 ng; SuperTopFlash (STF) 62.5 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 0.75 ng) y para pozos de tratamiento con Wnt1 (pmaxGFP, 62.5 ng, pcDNA-wnt1, 62.5 ng; pcDNA3+, 62.5 ng; Super-TopFlash (STF) 62.5 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 0.75 ng) y para pozos de tratamiento de LRP4-Wnt1 (pcDNA3+-LRP4, 62.5 ng, pcDNA3+-wnt1, 62.5 ng; pcDNA3+, 62.5 ng; SuperTopFlash (STF) 62.5 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 0.75 ng). En un segundo tubo, se diluyeron 0.8 µl de Lipofectamina 2000 hasta un volumen final de 25 ml de OptiMEM® y se incubó a temperatura ambiente a durante 5 minutos. El contenido de los dos tubos fue mezclado entonces agregando el contenido en el tubo de lípido al tubo de ADN y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo ADN-lípido. El complejo ADN-lípido (50 µl) fue agregado entonces homogéneamente a los pozos e incubado a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 5 horas. Al final de la incubación de 5 horas, las células estaban listas para un tratamiento de 20 horas con reactivos de prueba tales como SOST, DKK1 (R&D Cat#1096- DK), anticuerpos, etc. El ensayo con luciferasa fue llevado a cabo como se describe bajo "Ensayo Wnt" agregando alternativamente 150 µl de regulador de lisis pasivo.

Sobreexpresión de LRP4 en células C28A2

55 Las células C28a2 (de Mary Goldring, Harvard Institutes of Medicine, Boston, MA, US) fueron cultivadas en el mismo medio que las HEK293 (véase arriba) excepto que no estaba presente el HEPES y se agregó un suplemento de aminoácidos no esenciales (Gibco Cat#11140). Las células C28a2 fueron sembradas a 1x10<sup>5</sup> células /pozo en un formato de placa de 24 pozos en un medio de cultivo libre de antibióticos e incubadas durante la noche antes de llevar a cabo la transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen Cat#11668-019). Para cada pozo que se iba a transfectar, se agregó la siguiente cantidad de plásmidos (600 ng/pozo total) a un volumen final de 50 µl de OptiMEM® (Gibco, Cat#31985-047) y se mezcló suavemente: para pozos de control (SuperTopFlash (STF) 100 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 2 ng y pcADN3+, 500 ng para compensar) y para tratamiento de pozos con Wnt1 (plásmido de pcADN-wnt1, 100 ng; plásmido de LRP5, 100 ng; SuperTopFlash (STF) 100 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 2 ng y pcADN3+, 300 ng) y para pozos de tratamiento con LRP4-Wnt1 (plásmido de pcADN-wnt1, 100 ng; plásmido de LRP5, 100 ng; plásmido de LRP4, 100 ng; SuperTopFlash (STF) 100 ng; plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40, 2 ng y pcADN3+, 200 ng). En un segundo tubo, se

diluyeron 1.6 µl de Lipofectamina 2000 en 48.4 µl de OptiMEM®I y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. El contenido de los dos tubos fue mezclado entonces por la adición del contenido del tubo de lípidos al tubo de ADN y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo ADN-lípido. El complejo ADN-Lípido (100 µl) fue entonces agregado de manera homogénea a los pozos y se incubó a 37°C. en CO<sub>2</sub> al 5% durante 2 horas. Al final de la incubación de 2 horas, el medio de transfección fue reemplazado por 400 µl/pozo de medio de cultivo libre de antibióticos y las células fueron incubadas durante 24 horas. Las células fueron tratadas entonces durante 20 horas con reactivos de prueba tales como SOST, o DKK1 (R&D Cat#1096-DK). El ensayo de luciferasa se llevó a cabo como se describe bajo "ensayo Wnt".

#### 10 Anulación de LRP4 en células HEK293

Las células Hek293 Wnt1/STF/Renilla (un clon estable obtenido a partir de la transfección estable de células de Hek293 (ATCC Cat#CRL-1573)) con el plásmido de expresión Wnt1, el plásmido informador SuperTopFlash, y el plásmido de luciferasa de renilla de guía de SV40) fueron cultivados de manera rutinaria en DMEM 4500 g/L de glucosa (Invitrogen Cat#41965-035) suplementado con FCS al 10% (Amimed Cat#2-0F100-I), L-glutamina 2 mM (Invitrogen Cat#25030-081), 100 IU/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (Gibco Cat#15140-163), 6 µg/ml de puromicina (Invitrogen Cat#ant-pr-1), 150 µg/ml de zeocina (Invitrogen Cat#45-0430) y 150 µg/ml de higromicina (Invitrogen Cat#10687-010). Los antibióticos de la selección fueron dejados durante los experimentos de anulación. Las células fueron sembradas a 0.6x10<sup>5</sup> células/pozo en un formato de placas de 24 pozos de poli-D-lisina y se dejaron unir durante la noche antes de llevar a cabo la transfección de siARN de LRP4 con HiPerFect (Qiagen Cat#301707). Las secuencias sentido y antisentido del ARNsi de LRP4 usada son como sigue:

LRP4a: TAAATTATCATAAAGTCCTAA / AGGACTTTATGATAATTTATT; (SEQ ID NOs:160/161)  
 LRP4b: ATAGTGGTTAAATAACTCCAG / GGAGTTATTTAACCCTATT; (SEQ ID NOs:162/163)  
 LRP4c: TAAATTCTCGTGATGTGCCAT / GGCACATCACGAGAATTTATT; (SEQ ID NOs:164/165)  
 LRP4d: TTTCTTATAGCACAGCTGGTT / CCAGCTGTGCTATAAGAAATT; (SEQ ID NOs:166/167)  
 LRP4e: TAGACCTTTCCATCCACGCTG / GCGTGGATGGAAAGGTCTATT; (SEQ ID NOs:168/169)

Para cada pozo que se iba a transfectar, se prepararon dos tubos eppendorf: el primero contenía 0.2 µl de una solución de reserva 20 nM de uno de los ARNsi de LRP4 o 0.1 µl de una solución de reserva 20 nM de dos ARNsi LRP4 (la concentración final de ARNsi/pozo es 6.6 nM) y 50 µl de Optimem y el segundo, 3 µl de HiPerFect y 47 µl de Optimem. El contenido del segundo tubo fue agregado al primero, se sometió rápidamente a vórtex y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de esta mezcla entonces al pozo respectivo, y las células fueron incubadas a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5% durante 30 horas. Después de esto, la mezcla de transfección fue retirada y se reemplazó por medio de cultivo fresco libre de antibiótico (450 µl/pozo) y se dejó incubar por otras 24 horas. Antes del tratamiento con SOST o DKK1, se retiró el medio, se reemplazó por medio de cultivo fresco libre de antibióticos que contenía una dilución apropiada de SOST o DKK1 (R&D Cat#1096-DK) y las células fueron incubadas durante 20 horas a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5%. La determinación de luciferasa se lleva a cabo entonces como se describe bajo "ensayo de Wnt".

#### Modelos animales

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

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

#### Protocolo de tratamiento

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

concentración: 2.5 mg/ml, volumen de aplicación : 10ml/kg  
 Vehículo: Citrato 50 mM, NaCl 140 mM  
 Anticuerpo antiestrosclerostina: anti-SOST-MOR05813, h/mlgG2a,  
 2.45 mg/ml, volumen de aplicación: 10 ml/kg  
 Vehículo: Citrato 50 mM, NaCl 140 mM

5

hPTH (1-34) (Bachem, Bubendorf, Suiza) 100 µg/kg  
 vehículo: PBS+BSA 0.1 %

10 GRUPOS DE TRATAMIENTO:

1 control de isotipo iv. = anti-PC-mlgG2a  
 2 anti-SOST-MOR05813 iv.  
 3 control sc de vehículo = PBS+BSA 0.1%  
 4 hPTH (1-34) sc.

15

CONDICIONES DE MANTENIMIENTO

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

ESTABLECIMIENTO DEL BIENESTAR ANIMAL

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

MÉTODOS

30 TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA CUANTITATIVA PERIFÉRICA (pQCT)

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

35

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

40

MICROTOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA (microCT)

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

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

55 ABSORCIOMETRIA DE RAYOS X DE ENERGÍA DUAL (DEXA)

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

MARCACIÓN CON FLUOROCROMO:

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

necropsia.

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

## HISTOLOGÍA E HISTOMORFOMETRÍA

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

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

### Determinación de afinidad

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

35 Las constantes cinéticas  $k_{on}$  y  $k_{off}$  fueron determinadas con diluciones seriadas del respectivo enlace de Fab a esclerostina del antígeno inmovilizada por vía covalente utilizando el instrumento BIAcore 3000 (BIAcore, Uppsala, Suecia). Para el estándar de inmovilización del antígeno covalente se utilizó química de acoplamiento EDC-NHS amina. Las mediciones cinéticas fueron hechas en PBS (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 1,76 mM  $KH_2PO_4$  pH 7.4) a una rata de flujo de 20 µl/minuto utilizando un rango de concentración de Fab desde 1.5 - 500 nM. El tiempo de inyección para cada concentración fue 1 minuto, seguido por 3 minutos de fase de disociación. Para la regeneración se utilizó 2 x 5 µl de glicina 10 mM pH 1.5. Todos los sensogramas fueron acoplados utilizando el software de evaluación BIA 3.1 (BIAcore).

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

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

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

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

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

65 Para la determinación de KD fueron usadas, las fracciones de monómeros (al menos 90% de contenido de monómero, analizado por SEC analítico; Superdex75, Amersham Pharmacia) de Fab. La determinación de afinidad con base en electroquimioluminiscencia (ECL) en solución y la evaluación de los datos se llevaron a cabo

básicamente como se describe por Haenel et al., 2005. Una cantidad constante de Fab (25 pM) fue equilibrada con diferentes concentraciones (diluciones en serie 3n) de esclerostina humana, de ratón o Cynomolgus no marcadas (concentración de partida: 500 pM) en solución. Se agregaron la esclerostina humana biotinilada (0.5 µg/ml) acoplada con perlas paramagnéticas M-280 estreptavidina, Dynal) y BV-tag™ (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, Reino Unido) de anticuerpo antihumano marcado (Fab)'2 y se incubó durante 30 minutos. Subsecuentemente, la concentración del Fab no enlazado fue cuantificada a través de detección por ECL utilizando el analizador M-SERIES® 384 (BioVeris Europe).

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

#### Ensayo de potencia de inhibición de enlace al receptor utilizando BioVeris TM

Para el ensayo de potencia de inhibición de enlace con base en BioVeris™ se acopló BMP-2 humano recombinante directamente (química NHS/EDC) a perlas magnéticas de ácido carboxílico M-270 (Dynal) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo fue llevado a cabo en una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pozos (Nunc). Se diluyeron 50 µl/pozo de Fab purificado en regulador de ensayo (PBS + Tween 20 al 1% (restringido) o Tween 20 al 0.1% (menos restringido) + BSA al 1%) en etapas de dilución 1:3 (concentración de partida: 1000 nM). Se agregaron 50 µl/pozo de esclerostina humana biotinilada (4 nM) a cada dilución de Fab. Después de la incubación durante 90 minutos agitando a 400 rpm en un Eppendorf Thermomixer a 22°C, se agregaron 25 µl de las perlas recubiertas con BMP-2 (2.7E07 perlas x ml) y estreptavidina diluida 1:500 marcada con BV-tag™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante BioVeris Europa) a cada pozo y se incubaron durante 30 minutos (800 rpm, a 22°C). La detección se llevó a cabo utilizando la BioVeris M-384 SERIES® Workstation (BioVeris Europe). Para la determinación del EC50 se utilizó un modelo de ajuste logístico de 4 parámetros (XLfit, IDBS).

#### Producción de Inmunoglobulinas

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

Con el fin de expresar la IgG de longitud completa, se subclonaron fragmentos de dominio variable de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de vectores de expresión de Fab en vectores pMorph®Ig apropiados: se usaron pMorph®\_h\_Ig1 y pMorph®2\_h/m\_Ig2a quimérico humano/ratón. Las enzimas de restricción EcoRI, MfeI, BlnI se utilizaron para subclonar el fragmento del dominio de VH en pMorph®\_h\_IgG1 o pMorph®2\_h/m\_IgG2a y EcoRV, BsiWI, HpaI para subclonar el fragmento del dominio VL en vectores pMorph®\_h\_IgK, pMorph®\_h\_Igλ y pMorph®2\_h/m\_Igλ respectivamente.

Las enzimas de restricción EcoRI, MfeI y BlnI fueron utilizadas para subclonar el fragmento del dominio VH en pMORPH®\_h\_IgG1: el esqueleto del vector fue generado por digestión de EcoRI/BlnI y extracción del fragmento de 6400 bp mientras que el fragmento VH (350 bp) fue producido por digestión con MfeI y BlnI y purificación subsecuente. El vector y el inserto fueron ligados a través de sobrantes compatibles generados por las digestiones de EcoRI y MfeI, respectivamente, y a través del sitio BlnI. Por lo tanto, los sitios de restricción EcoRI y MfeI son destruidos.

Las enzimas de restricción MfeI y BlnI fueron utilizadas para subclonar el fragmento del dominio VH en pMORPH®2\_h/m\_IgG2a. En esta nueva generación de vectores IgG, por otras modificaciones, el sitio EcoRI (el cual permitió solamente la subclonación a través de sobrantes compatibles) fue reemplazado por el sitio MfeI permitiendo así la digestión de MfeI/BlnI de ambos, vector e inserto.

La subclonación del fragmento del dominio VL en pMORPH®\_h\_Igk fue llevada a cabo a través de los sitios EcoRV y BsiWI, mientras que la subclonación en pMORPH®\_h\_Igλ y pMORPH®2\_h/m\_Ig λ fueron hechas utilizando EcoRV y HpaI.

#### Expresión transiente y purificación de la IgG humana

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

#### **Ejemplo 1: Generación de proteínas de esclerostina recombinante humanas y cyno**

La codificación de ADNc de longitud completa para el precursor de esclerostina humana (GenBank Acc.No AF326739) con la característica de un péptido de señalización natural (aa 1-213, NPL 005002) fue clonada en el vector de expresión de mamífero pRS5a por inserción en los sitios de restricción Asp718 y Xba1. Se agregó una

etiqueta de detección y purificación de proteína (APP = EFRH) al terminal C del gen.

5 Después de la verificación de la expresión a escala pequeña en ensayos de transfección transientes en placa de 6 pozos, la generación de las reservas de transfección estable fue iniciada por transfección de cuatro reservas (1.0x10E6 células cada uno) por lipofección. 48 horas después de la transfección la selección de los transfectantes fue iniciada mediante la adición del antibiótico Zeocin™ a una concentración de 100 µg/ml. Una vez que todas las cuatro reservas habían reiniciado el crecimiento normal se establecieron los títulos de proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad analítica sobre anti APP HPLC y la reserva de producción más alta – reserva2 – fue seleccionada para la adaptación a un medio libre de suero y escalamiento posterior. 10 Simultáneamente, los ensayos de expresión transiente de escala grande sobre la escala 10-I fueron llevados a cabo también utilizando polietilenimina como transportador del ADN plásmido durante la transfección del sistema biorreactor Wave™ (C20SPS-F, Art.-No. 100.001, Wave Biotech) como sistema de cultivo. Los sobrenadantes del cultivo celular de 12-22 fueron recolectados 7-10 días después de la transfección y se concentraron mediante filtración de flujo cruzado y diafiltración antes de la purificación. 15

Los SOST humano y cyno fueron purificados por cromatografía de inmuoafinidad. En resumen, los lotes de sobrenadantes de cultivo de tejidos 10-20 L fueron concentrados a 1-2 L por filtración cruzada (corte de 10 kDa) y se aplicaron a 2 ml/minuto sobre una columna de Sepharose anti APP de 50 ml preparada por acoplamiento del anti-Ab1-40/APP (6E10-A5) monoclonal exclusivo a Sepharose 4B activada con CNBr de acuerdo con las instrucciones del fabricante (10 mg de anticuerpo por ml resina). Después del lavado de línea base con PBS, el material enlazado fue eluido con glicina 100 mM, el pH 2.7 fue neutralizado y se filtró para esterilidad. La concentración de proteína fue determinada por A280 utilizando factores de absorción computarizados. Las proteínas purificadas fueron caracterizadas finalmente por SDS-PAGE, secuenciamiento en terminal N y LC-MS. Una alícuota de SOST humana fue biotinilada en PBS durante 1 hora a 37°C utilizando sulfo-NHS-Ic-biotina 1 mM (Uptima; UP54398A). El reactivo en exceso fue retirado entonces por diálisis extensa contra PBS. 20 25

SOST humano derivado de E. coli

30 SOST aa24-213 (NPL006071, plásmido pXI504) marcado con His<sub>6</sub>-PreScission y SOST aa24-213 (NPL006690, plásmido pXI515) fueron producidos por replicación. Se transformaron E.coli Tuner (DE3) con cada plásmido.

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

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

45 Las pellas de células húmedas de la fermentación anterior fueron lisadas en 8 volúmenes de Tris pH 8.0 50 mM (que contenía EDTA, DTT y Benzamidina-HCl cada uno 5 mM) utilizando un emulsificador Avestin C-50 y se centrifugaron durante 30 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante fue descartado y la pella resultante fue resuspendida en 10 volúmenes de regulador de lisis y se centrifugó de nuevo. El proceso fue repetido 3 veces más, después de lo cual el regulador de lisis fue reemplazado con agua Milli-Q, que contenía DTT 5mM. Las pellas fueron lavadas dos veces adicionales bajo estas condiciones. Los cuerpos de inclusión fueron disueltos en guanidina-HCl 8 M (que contenía DTT 100mM, Tris pH 8 50 Mm y EDTA 5mM) durante 3-4 horas a temperatura ambiente, luego se centrifugaron a 20,000 rpm durante 30 minutos, se filtraron a través de un filtro 0.45 µm. La replicación fue iniciada con una dilución rápida con 88 volúmenes (PSU11274) y 92 volúmenes (PSU5257) de regulador de replicación helado (Tris 0.5M que contenía arginina-HCl 0.9 M, GSH 5 mM y GSSG pH 8 0.5 mM). La solución fue almacenada a 4°C durante 1 semana. En este punto, las dos preparaciones fueron tratadas de forma ligeramente diferente, debido al requerimiento para retirar la etiqueta his6 del PSU5257 antes de completar la replicación. 50 55

PSU5257

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

65 PSU11274

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

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

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

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

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

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

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

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

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

45 Estas reservas fueron sometidas individualmente a

- a) una criba en fase sólida donde los antígenos (esclerostina humana y de ratón) fueron recubiertos directamente sobre placas de microtitulación Maxisorb de 96 pozos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) o
- 50 b) una criba de captura y semisolución en donde el antígeno (esclerostina biotinilada), respectivamente el complejo fago-antígeno fue capturado sobre bandas limpias de N/A o
- c) una criba de soluciones con esclerostina biotinilada en donde el complejo fago-antígeno fue capturado por perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads M-280; Dynal) para cada reserva de criba.

55 • Criba en fase sólida sobre esclerostina

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

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

65 Después de lavado (2 x 400 µl de PBS) de la placa de Maxisorb recubierta y bloqueada, se agregaron 300

µl de los fagos preadsorbidos a los pozos recubiertos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Esta incubación fue seguida por 10 ciclos de lavado con PBS y PBS/Tween 20 al 0.05% a temperatura ambiente.

5 Los fagos enlazados fueron eluidos agregando 300 µl de DDT 20 mM en Tris/HCl 10 mM pH 8.0 por pozo durante 10 minutos a temperatura ambiente. El eluido fue retirado y se agregó a 15 ml de células de *E. coli* TG1F+ cultivadas hasta 1 OD<sub>600nm</sub> de 0.6 – 0.8. La infección por fago del *E. coli* fue permitida durante 45 minutos a 37°C sin agitación. Después de centrifugación durante 5 minutos a 4120 x g, las pellas bacterianas fueron resuspendidas cada una en 600 µl de medio 2xYT, sembradas sobre placas de agar LB-CG e incubadas O/N a 30°C. Las colonias fueron entonces raspadas de las placas y los fagos fueron rescatados y amplificados.

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

• Criba por semisolución en esclerostina

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

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

30 La solución de fago bloqueada (Chemiblock/Tween 20 al 0.05%) fue agregada a los pozos N/A bloqueados durante 30 minutos y esta etapa fue repetida durante otros 30 minutos con el fin de retirar los enlazantes NeutrAvidin. Los fagos prelavados fueron transferidos y la esclerostina biotinilada fue inmovilizada sobre tiras limpias de N/A, selladas con una lámina e incubadas O/N a temperatura ambiente con agitación.

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

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

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

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

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

• Criba en solución sobre esclerostina

60 Para este tipo de criba se lavaron 200 µl de perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads M-280; Dynal) con PBS y se bloquearon con Chemiblock durante 2 horas a temperatura ambiente. Se bloquearon 500 µl de fagos con Chemiblock durante 1 hora a temperatura ambiente en rotación. Los fagos bloqueados fueron preadsorbidos dos veces contra 50 µl de perlas magnéticas de estreptavidina bloqueadas durante 30 minutos. El sobrenadante del fago fue transferido a un nuevo tubo de reacción bloqueado de 2 ml y se agregaron diferentes concentraciones de esclerostina biotinilada humana (véase Tablas 5, 6 y 7) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación. Se agregaron 100 µl de las perlas magnéticas de estreptavidina bloqueadas a cada reserva de criba y se

incubaron durante 10 minutos sobre un rotador. Las perlas fueron recolectadas con un separador de partículas (Dynal MPC-E) durante aproximadamente 2.5 minutos y la solución fue retirada cuidadosamente.

5 Después de los ciclos de lavado (Tabla 2), los fagos enlazados fueron eluidos agregando 300  $\mu$ l de DDT 20 mM en 10 mM Tris/HCl pH 8.0 por pozo durante 10 minutos a temperatura ambiente. El eluido fue retirado y se agregó a 15 ml de células de *E. coli* TG1 F+ cultivadas hasta un OD<sub>600 nm</sub> de 0.6 – 0.8. La infección por fago de *E. coli* fue permitida durante 45 minutos a 37°C sin agitación. Después de la centrifugación durante 5 minutos a 4120 x g, las pellas bacterianas fueron resuspendidas cada una en 600  $\mu$ l de medio 2xYT, sembradas sobre placas de agar LB-CG e incubadas O/N a 30°C. Las colonias fueron entonces raspadas de las placas y los fagos fueron rescatados y amplificados.

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

#### Subclonación y expresión de fragmentos Fab seleccionados

##### Microexpresión de fragmentos Fab seleccionados

20 Para facilitar la expresión rápida de Fab solubles, los insertos de codificación de Fab de los fagos HuCAL GOLD® seleccionados fueron subclonados a través de XbaI y EcoRI a partir del vector de despliegue respectivo en el vector de expresión de *E. coli* pMORPH®X9\_MH (Rauchenberger et al., 2003). Después de la transformación de los plásmidos de expresión en las células de *E. coli* TG1 F- se seleccionaron clones individuales resistentes al cloranfenicol en los pozos de una placa de microtitulación estéril de 96 pozos prellenada con 100  $\mu$ l de medio 2xYT-CG y se cultivaron O/N a 37°C. Se transfirieron 5  $\mu$ l de cada cultivo de *E. coli* TG-1 a una placa de microtitulación estéril de 96 pozos prellena con 100  $\mu$ l de medio 2xYT suplementado con 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol y 0.1 % de glucosa por pozo. Las placas de microtitulación fueron incubadas a 30°C agitando a 400 rpm sobre un agitador de microplacas hasta que los cultivos estuvieron ligeramente turbios (aproximadamente 2-4 horas) con un OD<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0.5. A estas placas de expresión, se agregaron 20  $\mu$ l de medio 2xYT suplementado con 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol e IPTG 3 mM (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) por pozo (concentración final: IPTG 0.5 mM), las placas de microtitulación fueron selladas con una cinta permeable al gas, y se incubaron durante la noche a 30°C con agitación a 400 rpm.

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

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

40 La expresión de los fragmentos Fab codificada por pMORPH®X9\_Fab\_MH en células de *E. coli* TG1 F- en escala mayor fue llevada a cabo en cultivos en matraces agitados utilizando 750 ml de medio 2xYT suplementado con 34  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. Los cultivos fueron agitados a 30°C hasta que el OD<sub>600nm</sub> alcanzó 0.5. La expresión de Fab fue inducida por la adición de IPTG 0.75 mM (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) y cultivó durante 20 horas adicionales a 30°C. Las células fueron recolectadas y perturbadas utilizando lisozima y fragmentos Fab aislados por cromatografía sobre Ni-NTA. Los pesos moleculares aparentes fueron determinados por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con estándares de calibración. Las concentraciones fueron determinadas por espectrofotometría UV (Krebs et al., 2001).

#### **Ejemplo 2: Identificación de anticuerpos HuCAL® específicos de esclerostina**

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

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

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

65

anticuerpo secundario. La fluorescencia fue medida en un lector de placas TECAN Spectrafluor.

Selección por captura con esclerostina biotinilada

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

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

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

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

Resultados:

25 Después de las cribas las reservas de fago enriquecidas fueron subclonadas a partir del vector de la biblioteca pMORPH®23 (permitiendo un despliegue del anticuerpo eficiente sobre la superficie del fago) en el vector de expresión pMORPH®X9\_Fab\_MH el cual media en la expresión periplásmica de los Fab solubles. Los clones individuales fueron seleccionados y los Fab solubles fueron expresados a partir de estos clones individuales. En total, se analizaron aproximadamente 4600 clones en selección primaria la cual fue ejecutada por enlace de los Fab directamente a partir de los lisados bacterianos a esclerostina humana y de ratón y movilizadas sobre placas de microtitulación Maxisorp o por captura de los Fab a través del anticuerpo anti Fd en placas de microtitulación Maxisorp seguido por enlace de la esclerostina humana biotinilada. La detección fue llevada a cabo en ELISA después de marcación con un anticuerpo (Fab)´2 antihumano marcado con fosfatasa alcalina o utilizando estreptavidina fosfatasa alcalina.

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

Caracterización de los Fab de HuCAL GOLD®

Determinación de afinidad utilizando Biacore

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

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

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

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

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

Conversiones de IgG de enlaces originales y caracterización de IgG

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

IgG en Bioensayo primario

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

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

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

Para incrementar la afinidad y la actividad biológica de los cuatro fragmentos de anticuerpos seleccionados, las regiones LCDR3 y LCDR2 fueron optimizadas en paralelo por mutagénesis en casete utilizando mutagénesis dirigida (Virnekas et al., 1994), en donde las regiones marco fueron mantenidas constantes. Antes de la clonación de las bibliotecas de maduración, todos los fragmentos Fab originales fueron transferidos desde el vector de expresión pMORPH@x9\_MH al vector de maduración CysDisplay™ pMORPH@25 a través de los sitios de restricción XbaI/EcoRI. Este vector provee la proteína de fago pIII fusionada en el terminal N a un residuo de cisteína así como una cisteína terminal en C fusionada a la cadena del anticuerpo Fd y permite así un despliegue enlazado por disulfuro de los respectivos fragmentos de Fab sobre la superficie del fago.

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

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

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

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

Estrategias de criba para maduración por afinidad

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

Candidato 1: MOR04518 (L-CDR3 maduración)  
 Candidato 1: MOR04518 (H-CDR2 maduración)  
 Candidato 2: MOR04520 (H-CDR2 maduración)  
 Candidato 3: MOR04532 (L-CDR3 maduración)  
 Candidato 3: MOR04532 (H-CDR2 maduración)  
 Candidato 4: MOR04799 (L-CDR3 maduración)  
 Candidato 4: MOR04799 (H-CDR2 maduración)

Para cada biblioteca candidato se ejecutaron tres diferentes cribas. Para cada estrategia de criba fueron

5 aplicadas diferentes condiciones de restricción. Para incrementar la restricción de la criba y para seleccionar ratas mejoradas, se llevaron a cabo lavado y competición con Fab originales o con esclerostina recombinante soluble. Después de las cribas de maduración, las reservas de fagémidos enriquecidos fueron subclonadas en el vector de expresión pMORPH@x9\_MH. Aproximadamente se seleccionaron 2900 clones y los Fab se expresaron por inducción con IPTG.

Clasificación de afinidad BioVeris TM y selección de afinidades mejoradas

10 Para la identificación de Fab específicos de esclerostina mejorados en afinidad los lisados bacterianos de aproximadamente 2900 clones fueron diluidos y verificados en cuanto al enlace de Fab con esclerostina humana biotinilada inmovilizada sobre perlas recubiertas con estreptavidina. El enlace fue analizado con una BioVeris Workstation. Estos clones que dan las señales más altas indican una afinidad mejorada y fueron por lo tanto escogidos para análisis posterior por titulación en equilibrio en solución.

15 Para este propósito, se seleccionaron 176 clones individuales y las afinidades preliminares fueron determinadas a través de una titulación de equilibrio en solución de 4 puntos (SET) en BioVeris. A partir de estos datos, se seleccionaron 24 clones que mostraban las mejores afinidades. Estos Fab fueron purificados en la escala mg.

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

Fab optimizados en bioensayo primario

25 Los Fab optimizados fueron probados en el ensayo de ALP celular. La mayor parte de ellos fueron inactivos; y se observó una reversión variable de la inhibición de esclerostina con algunos Fab. Por lo tanto, una selección de clones fue convertida en formato IgG2a humano/ratón y se probó de la misma manera. Pero estos clones en el formato IgG2a humano/ratón no pudieron invertir completamente la inhibición de esclerostina y no se pudo alcanzar el criterio de EC50 deseado (<10nM). El candidato mejor madurado MOR05177 (VL madurado a partir del MOR04518 original) mostró un Fab de 50 nM o a 140 – 467 nM de IgG2a humana/de ratón con restauración de 75 – 85% de la señal ALP.

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

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

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

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

50 Al probar todos los Fab originales se identificaron dos anticuerpos adicionales como patrones prometedores para una maduración de afinidad adicional. La figura 1 muestra la actividad de MOR05813\_IgG2lambda, uno de los anticuerpos más potentes identificados en el ensayo de wnt-1.

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

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

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

60 La figura 2 muestra un ejemplo de mineralización en presencia de MOR05813\_Fab. El anticuerpo podría restaurar la mineralización inducida por BMP-2 hasta un máximo de 80% de la respuesta inicial, en donde un Fab antilisozima usado como control negativo no tuvo efecto.

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

La ELISA de LRP6 / esclerostina se basa en la capacidad de la esclerostina para enlazarse a LRP6. Para caracterizar adicionalmente los Fab producidos, se probó una selección de Fab e IgG en este ensayo. En la presencia de un anticuerpo antiesclerostina de R&D (1000 ng/ml= $\sim$ 7 nM), el enlace de esclerostina (0.9 nM) a LRP6 fue inhibido en un 68% en comparación con el control (datos no mostrados). La MOR05813\_IgG2 lambda inhibió el enlace de esclerostina a LRP6 hasta un 90% a 90 nM, mientras que una IgG antilisoizima utilizada como control negativo no tuvo efecto sobre el enlace de la esclerostina a LRP6 (figura 3).

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

El ensayo fosfo-Smad-1 (Western) se basa en la capacidad de BMP-6 para inducir la fosforilación de Smad1 al cabo de 15 minutos en células MC3T3. La MOR05318\_IgG2 lambda inhibió la acción de la esclerostina sobre fosforilación de Smad1 inducida por BMP-6 con un EC<sub>50</sub> de 115 nM y restauró la fosforilación de Smad1 hasta un máximo de 66% de la fosforilación inducida por BMP-6. El control negativo de IgG antilisoizima (IgG C) no tuvo efecto (figura 4).

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

Con la excepción del ARNsi LRP4 e, la anulación del ARNm LRP4 no afecta la actividad de STF en ausencia de SOST. Sin embargo, reduce la habilidad del SOST para inhibir la actividad de STF, entre 10 y 30%. Esto fue cierto para todos los cinco ARNsi probados individualmente (figura 5A) o en diferentes combinaciones (datos no mostrados). Por sobreexpresión el LRP4 disminuyó el IC50 de SOST en 5 y 16 veces en el ensayo superinstantáneo de HEK y c28a2, respectivamente (figura 5B y C). Este efecto fue específico en el sentido de que el LRP4 sobreexpresado no tenía efecto sobre la anulación del IC50 de DKK1 del LRP4 (ARNsi que disminuye la acción inhibitoria de SOST en STF inducido por Wnt-1, mientras que no disminuye la acción inhibitoria del DKK1 (figura 5E). A su vez, el LRP4 disminuye la acción del anticuerpo anti SOST incrementando el EC50 del MOR05813\_IgG2a desde 17.2 nM hasta 30 nM (figura 5E). Estos datos sugieren que el LRP4 es un facilitador de la acción del SOST.

#### **Ejemplo 9: Nueva maduración**

Para incrementar la afinidad y la actividad biológica de dos fragmentos de anticuerpos recién seleccionados con base en los resultados obtenidos a partir de los bioensayos, las regiones LCDR3 y HCDR2 fueron optimizadas en paralelo por mutagénesis en casete utilizando mutagénesis dirigida (Virnekas et al., 1994), mediante lo cual las regiones marco fueron mantenidas constantes. Antes de clonar las bibliotecas de maduración, todos los fragmentos de Fab originales fueron transferidos del vector de expresión pMORPH@X9\_MH en el vector de maduración CysDisplayTM pMORPH@25 a través de los sitios de restricción XbaI/EcoRI. Este vector provee la proteína de fago PIII fusionada en el terminal N a un residuo de cisteína así como una cisteína terminal C fusionada a una cadena del anticuerpo Fd y permite así el despliegue enlazado por disulfuro de los respectivos fragmentos de Fab sobre la superficie del fago.

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

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

Los tamaños de las bibliotecas de maduración variaron entre 2x10<sup>7</sup> y 2x10<sup>8</sup> clones con una señal de fondo de clonación por debajo del 1%, y el control de calidad por secuenciamiento reveló una buena calidad de cada biblioteca. Para cada biblioteca de maduración de LCDR3 y HCDR2, los fagos que despliegan el anticuerpo fueron preparados y los títulos de los fagos fueron determinados por titulación de mancha.

#### Estrategias de criba para maduración por afinidad adicional

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

Candidato 1: MOR04525 (L-CDR3 maduración)

Candidato 1: MOR04525 (H-CDR2 maduración)

Candidato 2: MOR04529 (L-CDR3 maduración)

## Candidato 2: MOR04529 (H-CDR2 maduración)

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

Después de las cribas las reservas de fagémidos enriquecidas fueron subclonadas en el vector de expresión pMORPH@X9\_MH. Se seleccionaron aproximadamente 1600 clones individuales y los Fab fueron expresados por inducción con IPTG.

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

**Ejemplo 10: Caracterización de anticuerpos antiesclerostina en estudios in vivo**

Ratones OF1/IC hembra de ocho meses de edad ( $n=16$ /grupo, Charles River, Francia) recibieron administración dos veces a la semana por vía intravenosa de anticuerpo antiesclerostina MOR05813 (24.5 mg/kg, mlgG2a) o anticuerpo de control de isotipo (anti-PC-mlgG2a). Los grupos de control recibieron diariamente por vía subcutánea 100 microg/kg de PTH (1-34) o vehículo (PBS + BSA al 0.1%). El tratamiento duró 2.5 semanas para todos los animales. La mitad de los animales ( $n=8$ /grupo) fue sacrificada en ese momento para análisis histomorfométrico. Estos animales habían recibido marcadores de fluorocromo 10 y 3 días antes de la necropsia para evaluación histomorfométrica de la dinámica de formación de huesos. El tratamiento continuo para el resto de los animales ( $n=8$ /grupo) hasta 5 semanas.

Los animales fueron monitoreados en cuanto a los cambios en masa, densidad y geometría ósea. La tomografía computarizada cuantitativa periférica in vivo [pQCT] demostró que el MOR05177 es un anabólico óseo fuerte en la tibia proximal de ratones mayores que incrementan el contenido mineral de los huesos (figura 6) y la densidad (figura 7). El efecto anabólico óseo ocurre tanto en el compartimiento óseo cortical (figura 8) como esponjoso (figura 9). Estos datos sugieren que el efecto inhibitor observado de la MOR05813 sobre la acción de la esclerostina en el ensayo de informador de señalización de Wnt en células no osteoblásticas se traduce en inducción de respuestas de formación de hueso debido a la inhibición de la esclerostina in vivo. La magnitud de la respuesta anabólica ósea en ratones es comparable con el anabolismo óseo inducido por una alta dosis de hPTH (1-34).

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

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

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

**Ejemplo 11: Selección de anticuerpos que bloquean por cruzamiento la esclerostina que enlaza a anticuerpos de la presente invención**Ensayo de bloqueo cruzado Biacore

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

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

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

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

Los dos anticuerpos a los cuales se va a establecer la capacidad para bloqueo cruzado uno con otro se mezclan en cantidades estequiométricas, por ejemplo, en una relación molar uno a uno, de sitios de enlace en un regulador adecuado para crear la mezcla de prueba. El regulador usado es típicamente un regulador que normalmente se utiliza en la química de proteínas, tal como por ejemplo PBS (NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7.4). Cuando se calculan las concentraciones de una base de un sitio de enlace se asume que el peso molecular de un anticuerpo es el peso molecular total del anticuerpo dividido por el número de sitios de enlace objetivo (esto es esclerostina) sobre ese anticuerpo.

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

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

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

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

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

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

#### Ensayo de bloqueo cruzado basado en ELISA

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

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

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

Este ensayo se describe en más detalle más adelante para dos anticuerpos denominados Ab-X y Ab-Y. en

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

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

#### **Ejemplo 12: ELISA para detectar el efecto MOR05813\_IgG2lambda sobre el enlace de SOST de LRP6**

##### ELISA de LRP6 /Esclerostina

Placas no tratadas de microtitulación de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µl/pozo de LRP6/Fc (1 µg/ml, R&D Systems, Cat#1505-LR) diluido en PBS. Como control para el enlace no específico (NSB), algunos pocos pozos fueron rellenos con 100 µl/pozo de PBS. Las placas fueron cubiertas con película plástica e incubadas durante la noche a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, las placas fueron lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0,05% (Fluka, Cat#93773) en PBS y los pozos fueron bloqueados durante 1 hora a 37°C agregando 300 µl/pozo de regulador de bloqueo SuperBlock (Pierce, Cat#37535) en TBS. Después de la incubación, la solución de bloqueo fue retirada y se agregaron 100 µl/pozo de esclerostina (derivada de E.coli, Novartis; 1 – 1000 ng/ml) diluida en BSA al 1% en PBS. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Después de esto, 100 µl/pozo de anticuerpo antiesclerostina (1µg/ml) diluido en BSA al 1% en PBS fueron agregados y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lavadas 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Finalmente, 100 µl/pozo de IgG Ab de anti cabra conjugada con ALP (1: 5000; Sigma Cat#A-7888) diluido en BSA al 1% (Sigma Cat. Nb.:A-7888) en PBS fueron agregados durante 1 hora a temperatura ambiente y las placas fueron lavadas entonces 3 veces con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS. Para determinar ALP, se agregaron 100 µl/pozo de sustrato de ALP (Sigma, Cat#S0942) en solución (1 tableta por 5 ml de regulador de sustrato de dietanolamina 1x; Pierce, Cat#34064) a las placas durante 90 minutos y se midió la densidad óptica a 405 nm.

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

La ELISA de LRP6 / esclerostina se basa sobre la capacidad de la esclerostina para enlazar LRP6. Para caracterizar adicionalmente los Fab producidos, se prueba una selección de Fab e IgG en este ensayo. En la presencia de un anticuerpo antiesclerostina de R&D (1000 ng/ml ≈7nM), el enlace de esclerostina (0.9 nM) a LRP6 fue inhibido en 68% en comparación con el control (datos no mostrados). La MOR05813\_IgG2 lambda inhibe el enlace de la esclerostina a LRP6 hasta en 90% a 90 nM, mientras que una IgG antilisoizima usada como control negativo no tuvo efecto sobre el enlace de la esclerostina a LRP6 (figura 20).

#### **Ejemplo 13: Cotratamiento utilizando MOR05813**

##### MOR05813 + ácido zoledrónico

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

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

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

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

#### MOR05813 + pretratamiento con alendronato

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

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

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

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

#### MOR05813 + DKK1 o hPTH

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

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

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

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

#### Referencias

- Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ (2004) Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 18(1):1-12.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, USA
- Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W. (2001) Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 10(5):537-43
- Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, Dioszegi M, Dikkers FG, Hildering P, Willems PJ, Verheij JB, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W. (2002) Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet* 39(2):91-7.
- Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepfer BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J (2001) Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 68(3):577-89.
- Chen, B.P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73-75. 1994
- Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865-881
- Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B, Hamdy NA, Lowik CW, Hamersma H, Beighton P, Papapoulos SE. (2005) Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers. *J Clin Endocrinol Metab* 90(12):6392-5
- Haenel C, Satzger M, Della Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005) Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration. *Anal Biochem* 339(1):182-4
- Keller H, Kneissel M. (2005) SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 37(2):148-58.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL®) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.
- Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X. Q., Schier, R., Sohlmann, P., Winter, J., Wolle, J., and Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.
- Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 280(20):19883-7
- Löhning, C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.
- Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, Ovcharenko D, Plajzer-Frick I, Rubin EM. (2005) Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 15(7):928-35
- Low, N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359-368

5 Rauchenberger,R., Borges,E., Thomassen-Wolf,E., Rom,E., Adar,R., Yaniv,Y., Malka,M., Chumakov,I., Kotzer, S., Resnitzky,D., Knappik,A., Reiffert,S., Prassler,J., Jury,K., Waldherr,D., Bauer,S., Kretschmar,T., Yayon,A., and Rothe,C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278(40):38194-38205

10 Semenov MV, He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST.*J Biol Chem.* 2006 Oct 19;

15 van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PH, Vrieling H, Papapoulos SE, Ten Dijke P, Lowik CW (2006) Wnt but not BMP Signaling is Involved in the Inhibitory Action of Sclerostin on BMP-Stimulated Bone Formation.

20 Virnekas B, Ge L, Pluckthun A, Schneider KC, Wellenhofer G, Moroney SE (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 22(25):5600-5607

25 *J Bone Miner Res* 2006 Oct 10 Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist.

30 *EMBO J* 22(23):6267-76 Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, Skonier JE, Yu C, Latham JA (2005) Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem.* 28;280(4):2498-502

<110> Novartis AG

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

35 <130> 52279

<160> 171

<170> PatentIn version 3.2

40 <210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Asn

1 5 10

50 <210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser

1 5 10

60 <210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

65 <400> 3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Asn

1 5 10

ES 2 614 328 T3

5 <210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 4  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser  
 1 5 10

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

20 <400> 5  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser  
 1 5 10

25 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 6  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser  
 1 5 10

35 <210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 7  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser  
 1 5 10

45 <210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 8  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser  
 1 5 10

55 <210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 9  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser  
 1 5 10

65

ES 2 614 328 T3

<210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 10  
  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser  
 10 1 5 10  
  
 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 11  
  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser His Trp Leu Ser  
 20 1 5 10  
  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 12  
  
 Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 30 1 5 10 15  
  
 Ser Val Lys Gly  
 35 20  
  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 13  
  
 Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 45 1 5 10 15  
  
 Ser Val Lys Gly  
 50 20  
  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 14  
  
 Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 60 1 5 10 15  
  
 Ser Val Lys Gly  
 65 20

ES 2 614 328 T3

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 15  
 Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Gly  
 20  
 15  
 <210> 16  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 16  
 Trp Val Ser Val Thr Gly Val His Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 1 5 10 15  
 25  
 Val Lys Gly  
 30  
 <210> 17  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 17  
 Trp Val Ser Val Ile Gly Asn Trp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 1 5 10 15  
 40  
 Val Lys Gly  
 45  
 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18  
 50  
 Trp Val Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 1 5 10 15  
 55  
 Val Lys Gly  
 60  
 <210> 19  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19  
 65

ES 2 614 328 T3

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

Val Lys Gly

10 <210> 20  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15 <400> 20

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

Ser Val Lys Gly  
20

25 <210> 21  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 21

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

Val Lys Gly

40 <210> 22  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 22

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

Val Lys Gly

55 <210> 23  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

60 <400> 23

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

65 <210> 24  
<211> 8

ES 2 614 328 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24  
 5 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 25  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25  
 15 Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp Phe  
 1 5 10 15  
 <210> 26  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26  
 25 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 27  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 27  
 35 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 28  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 28  
 45 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 29  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 29  
 55 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 65

ES 2 614 328 T3

<213> Homo sapiens  
 <400> 30  
 5 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 31  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 31  
 15 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 32  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 32  
 25 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 33  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens  
 <400> 33  
 35 Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr  
 1 5  
 <210> 34  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens  
 <400> 34  
 45 Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val His  
 50 1 5 10  
 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens  
 <400> 35  
 60 Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Gly  
 65 20

ES 2 614 328 T3

5 <210> 36  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 36

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

15 <210> 37  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 37

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

25 <210> 38  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 38

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

35 <210> 39  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 39

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

45 <210> 40  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 40

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

55 <210> 41  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41

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

65 <210> 41  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41

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

ES 2 614 328 T3

5 <210> 42  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 42

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

15 <210> 43  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 43

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

25 <210> 44  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 44

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

35 <210> 45  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 45

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

45 <210> 46  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 46

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

55 <210> 47  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 47

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

65

ES 2 614 328 T3

5 <210> 48  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 48

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

15 <210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49

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

25 <210> 50  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 50

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

35 <210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

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

45 <210> 52  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 52

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

55 <210> 53  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 53

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

65

ES 2 614 328 T3

<210> 54  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 54  
  
 Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser  
 1 5 10  
 10  
  
 <210> 55  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 55  
  
 Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser  
 1 5 10  
 20  
  
 <210> 56  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 56  
  
 Gly Ser Trp Ala Gly Ser Ser Gly Ser Tyr  
 1 5 10  
 30  
  
 <210> 57  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 57  
  
 Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr  
 1 5 10  
 40  
  
 <210> 58  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <400> 58  
  
 Ala Ser Trp Thr Gly Val Glu Pro Asp Tyr  
 1 5 10  
 50  
  
 <210> 59  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55  
 <400> 59  
  
 Gln Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Glu  
 1 5 10  
 60  
  
 <210> 60  
 <211> 10  
 65

ES 2 614 328 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 60  
 5                   Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   1                   5                   10  
  
 10           <210> 61  
              <211> 10  
              <212> PRT  
              <213> Homo sapiens  
  
 15           <400> 61  
                   Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   1                   5                   10  
  
 20           <210> 62  
              <211> 10  
              <212> PRT  
              <213> Homo sapiens  
 25           <400> 62  
                   Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   1                   5                   10  
 30           <210> 63  
              <211> 10  
              <212> PRT  
              <213> Homo sapiens  
 35           <400> 63  
                   Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   1                   5                   10  
 40           <210> 64  
              <211> 10  
              <212> PRT  
              <213> Homo sapiens  
 45           <400> 64  
                   Ser Thr Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu  
                   1                   5                   10  
 50           <210> 65  
              <211> 10  
              <212> PRT  
              <213> Homo sapiens  
 55           <400> 65  
                   Ser Ser Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr  
                   1                   5                   10  
 60           <210> 66

ES 2 614 328 T3

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 66

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

10

<210> 67  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 67

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

<210> 68  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 68

60

65

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

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

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

35 Val Thr Val Ser Ser  
115

40 <210> 69  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45

50

55

60

65

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

40 <210> 70  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 70  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His

55

60

65

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

30 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 71  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 71  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

ES 2 614 328 T3

Thr Val Ser Ser  
115

5 <210> 72  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 72

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

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

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

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

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

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

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

45 Thr Val Ser Ser  
115

50 <210> 73  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55 <400> 73

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

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

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

ES 2 614 328 T3

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

5  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

10  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

15  
 Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

20  
 Thr Val Ser Ser  
 115

25  
 <210> 74  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 74

30  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

35  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His  
 20 25 30

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

45  
 Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

50  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

55  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

60  
 Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

65  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 75  
 <211> 117  
 <212> PRT

ES 2 614 328 T3

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

35 Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 76

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

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

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

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

65

ES 2 614 328 T3

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

5

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

10

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

15

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 77  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 77

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 78  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

65

<400> 78



ES 2 614 328 T3

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

5           Gln

<210> 80  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

<210> 81  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50           <400> 81

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

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

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

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

Gln

20 <210> 82  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 82

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

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

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

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

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

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

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

Gln

60 <210> 83  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

65

ES 2 614 328 T3

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

Gln

35  
 <210> 84  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 84

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

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

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

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

60  
 65

ES 2 614 328 T3

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

5

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

10

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

15

Gln

<210> 85  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 85

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

Gln

<210> 86  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

65

<400> 86

ES 2 614 328 T3

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 5 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile  
 20 25 30  
 10 Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 15 Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60  
 20 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80  
 25 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Tyr Asp Gly Pro  
 85 90 95  
 30 Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110  
 35 Gln  
 <210> 87  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 87  
 Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 45 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile  
 20 25 30  
 50 Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 55 Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60  
 60 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80  
 65 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser

ES 2 614 328 T3

					85					90						95	
5	Leu	Thr	Ser	Tyr	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	
				100					105					110			
10	Gln																
	<210>	88															
	<211>	113															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
15	<400>	88															
20	Asp	Ile	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
25	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Asp	Ile	
				20					25					30			
30	Asn	Asp	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	
			35					40					45				
35	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	
		50					55					60					
40	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	
	65					70					75					80	
45	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Thr	Tyr	Asp	Gly	Pro	
					85					90					95		
50	Gly	Leu	Ser	Glu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	
				100					105					110			
55	Gln																
	<210>	89															
	<211>	372															
	<212>	ADN															
	<213>	Homo sapiens															
60	<400>	89															
	caggtgcaat	tggtggaaag	cggcggcggc	ctggtgcaac	cgggcggcag	cctgcgtctg											60
65	agctgcgcgg	cctccggatt	taccttttct	tottatgta	tgaattgggt	gcgccaagcc											120
	cctgggaagg	gtctcgagtg	ggtgagcttt	atctctggtg	attctagcaa	tacctattat											180

ES 2 614 328 T3

	gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcbc gcgtactttt	300
5	atgcatggtc atcttgggtg tggtctttct atggattttt ggggccaagg caccctggtg	360
	acggttagct ca	372
10	<210> 90 <211> 351 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 90	
	caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	60
20	agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc	120
	cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat	180
25	gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcbc gcgtgatact	300
	tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggtagctc a	351
30	<210> 91 <211> 372 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 91	
	caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	60
40	agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatgtta tgaattgggt gcgccaagcc	120
	cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcttt atctctggtg attctagcaa tacctattat	180
45	gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcbc gcgtactttt	300
	atgcatggtc atcttgggtg tggtctttct atggattttt ggggccaagg caccctggtg	360
50	acggttagct ca	372
55	<210> 92 <211> 351 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 92	
60		
65		

ES 2 614 328 T3

	caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	60
	agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc	120
5	cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat	180
	gcgatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat	240
10	ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgatact	300
	tatcttcatt ttgattattg gggccaaggg accctgggtga cggttagctc a	351
15	<210> 93 <211> 348 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 93	
	caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	60
	agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc	120
25	cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgtt actggtgttc atggtgatac ttattatgct	180
	gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataaatt cgaaaaacac cctgtatctg	240
30	caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat	300
	cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca	348
35	<210> 94 <211> 348 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 94	
	caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	60
	agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc	120
45	cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgtt attggttaatt ggggtgatac ttattatgct	180
	gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataaatt cgaaaaacac cctgtatctg	240
50	caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat	300
	cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca	348
55	<210> 95 <211> 348 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 95	
65		

ES 2 614 328 T3

caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60  
 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120  
 5 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgtt actactcatc agggttatac ttattatgct 180  
 gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240  
 10 caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300  
  
 cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348  
 15  
 <210> 96  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 96  
  
 caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60  
 25 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120  
 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcgtt actaatcgtt atggttatac ttattatgct 180  
 30 gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240  
 caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300  
 cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348  
 35  
 <210> 97  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 97  
  
 caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60  
 45 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120  
 cctgggaagg gtctcgagt ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat 180  
 50 gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcbc gcgtgatact 300  
 tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggttagctc a 351  
 55  
  
 <210> 98  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 60  
 <400> 98  
  
 65

ES 2 614 328 T3

	caggtgcaat tgggtgaaag cggcgggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	60
	agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc	120
5	cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attactcctt atggtgatac ttattatgct	180
	gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataaatt cgaaaaacac cctgtatctg	240
10	caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat	300
	cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca	348
15	<210> 99 <211> 348 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 99	
	caggtgcaat tgggtgaaag cggcgggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg	60
	agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc	120
25	cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attactcctt atggtgatac ttattatgct	180
	gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataaatt cgaaaaacac cctgtatctg	240
30	caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat	300
	cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca	348
35	<210> 100 <211> 330 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 100	
	gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgac caggtcagac cgcgcgtatc	60
45	tcgtgtagcg gcgataatat tggttctttt tatgttcatt ggtaccagca gaaaccggg	120
	caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aataatcgtc cctcaggcat cccggaacgc	180
	tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg acctgacca ttagcggcac tcaggcggaa	240
50	gacgaagcgg attattattg cggttcttgg gctggttctt ctggttctta tgtgtttggc	300
	ggccgcacga agttaaccgt tcttggccag	330
55	<210> 101 <211> 339 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 101	
65		

ES 2 614 328 T3

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60  
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120  
 5 catccccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcagggcgtg 180  
 agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240  
 10 caagcgggaag acgaagcggga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat 300  
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag 339

15 <210> 102  
 <211> 330  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 102  
 gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgccac caggtcagac cgcgcgatc 60  
 tcgtgtacgg gcgataatat tggttctttt tatgttcatt ggtaccagca gaaaccggg 120  
 25 caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aataatcgtc cctcaggcat cccggaacgc 180  
 tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcagggcgaa 240  
 30 gacgaagcgg attattattg cgcttcttgg actggtgttg agcctgatta tgtgtttggc 300  
 ggcggcacga agttaaccgt tcttggccag 330

35 <210> 103  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 103  
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60  
 45 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag 120  
 catccccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcagggcgtg 180  
 50 agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240  
 caagcgggaag acgaagcggga ttattattgc cagtcttatg ctggttctta tctttctgag 300  
 55 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag 339

60 <210> 104  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 104

65

ES 2 614 328 T3

	gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
	tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
5	catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcagggcgtg	180
	agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
10	caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
	gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339
15	<210> 105 <211> 339 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 105	
	gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
	tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
25	catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcagggcgtg	180
	agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
30	caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
	gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339
35	<210> 106 <211> 339 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 106	
	gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
	tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
45	catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcagggcgtg	180
	agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
50	caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
	gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339
55	<210> 107 <211> 339 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 107	
65		

ES 2 614 328 T3

	gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
	tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
5	catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
	agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
10	caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
	gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339
15	<210> 108 <211> 339 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 108	
	gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
	tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
25	catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
	agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
30	caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tctacttatg atggtcctgg tctttctgag	300
	gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339
35	<210> 109 <211> 339 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 109	
	gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
	tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
45	catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg	180
	agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
50	caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
	gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339
55	<210> 110 <211> 339 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 110	
65		

ES 2 614 328 T3

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

15 <210> 111  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 111

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

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

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

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 614 328 T3

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

ES 2 614 328 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 112  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

60

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

65

ES 2 614 328 T3

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30  
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 115 120 125  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 130 135 140  
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 165 170 175  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 180 185 190  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 195 200 205  
 Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
 210 215 220  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val  
 225 230 235 240  
 Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe  
 245 250 255  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

ES 2 614 328 T3

				260					265					270			
5	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
				275				280					285				
10	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		290					295					300					
15	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	
	305					310					315					320	
20	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
					325					330					335		
25	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				340					345						350		
30	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
			355					360					365				
35	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
		370					375					380					
40	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
	385					390					395					400	
45	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	
					405					410					415		
50	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				420					425						430		
55	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
			435					440					445				
60	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
		450					455					460					
65	<210> 113 <211> 469 <212> PRT <213> Homo sapiens  <400> 113																

ES 2 614 328 T3

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

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 614 328 T3

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 260 265 270  
 5  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 275 280 285  
 10  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 290 295 300  
 15  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 305 310 315 320  
 20  
 Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335  
 25  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala  
 340 345 350  
 30  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365  
 35  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380  
 40  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400  
 45  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 50  
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430  
 55  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 60  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460  
 65  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 465  
 <210> 114  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 614 328 T3

<400> 114

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 614 328 T3

<400> 115

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 614 328 T3

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 245 250 255  
 5 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 260 265 270  
 10 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 275 280 285  
 15 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 290 295 300  
 20 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 305 310 315 320  
 25 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 325 330 335  
 30 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 340 345 350  
 35 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 355 360 365  
 40 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 370 375 380  
 45 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 385 390 395 400  
 50 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
 405 410 415  
 55 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 420 425 430  
 60 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 435 440 445  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460  
 <210> 116  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 614 328 T3

<400> 116

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 614 328 T3

<211> 461  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 117  
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser  
 1 5 10 15  
 10 Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30  
 15 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 20 Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 25 Glu Trp Val Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 65 70 75 80  
 30 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
 85 90 95  
 35 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 40 Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125  
 45 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 130 135 140  
 50 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 145 150 155 160  
 55 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 165 170 175  
 60 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 180 185 190  
 65 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 195 200 205  
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 210 215 220

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 118

ES 2 614 328 T3

<211> 465  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 118  
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15  
 10 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30  
 15 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 20 Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 25 Glu Trp Val Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 65 70 75 80  
 30 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
 85 90 95  
 35 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 40 Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125  
 45 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr  
 130 135 140  
 50 Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu  
 145 150 155 160  
 55 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp  
 165 170 175  
 60 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 180 185 190  
 65 Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser  
 195 200 205  
 Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser  
 210 215 220

ES 2 614 328 T3

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys  
 225 230 235 240

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro  
 245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser  
 260 265 270

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

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr  
 290 295 300

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val  
 305 310 315 320

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu  
 325 330 335

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg  
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val  
 355 360 365

Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr  
 370 375 380

Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr  
 385 390 395 400

Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu  
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys  
 420 425 430

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu  
 435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly  
 450 455 460

# ES 2 614 328 T3

Lys  
465

5

<210> 119  
<211> 462  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 119

15

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 614 328 T3

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

5

<210> 120  
<211> 461  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 120

15

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser



ES 2 614 328 T3

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

5 <210> 121  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 121  
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 614 328 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 614 328 T3

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly  
 20 25 30  
 5 Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp  
 35 40 45  
 10 Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys  
 50 55 60  
 15 Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val  
 65 70 75 80  
 20 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr  
 85 90 95  
 25 Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser  
 100 105 110  
 30 Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 115 120 125  
 35 Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro  
 130 135 140  
 40 Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
 145 150 155 160  
 45 Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp  
 165 170 175  
 50 Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln  
 180 185 190  
 55 Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu  
 195 200 205  
 60 Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly  
 210 215 220  
 65 Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 225 230 235  
 <210> 124  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 614 328 T3

<400> 124

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

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val  
 20 25 30

Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly  
 35 40 45

Ser Phe Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val  
 50 55 60

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg  
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly  
 85 90 95

Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Thr Gly  
 100 105 110

Val Glu Pro Asp Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 115 120 125

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 165 170 175

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 180 185 190

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 195 200 205

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 210 215 220

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 225 230

ES 2 614 328 T3

<210> 125  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 125

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

ES 2 614 328 T3

	210		215		220	
5	Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser					
	225		230		235	
10	<210> 126					
	<211> 237					
	<212> PRT					
	<213> Homo sapiens					
	<400> 126					
15	Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr					
	1		5		10	15
20	Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly					
		20		25		30
25	Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp					
		35		40		45
30	Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys					
		50		55		60
35	Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val					
		65		70		75
40	Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr					
			85		90	95
45	Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser					
		100		105		110
50	Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu					
		115		120		125
55	Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro					
		130		135		140
60	Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu					
		145		150		155
65	Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp					
			165		170	175
70	Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln					
		180		185		190

ES 2 614 328 T3

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu  
 195 200 205  
 5  
 Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly  
 210 215 220  
 10  
 Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 225 230 235  
 15  
 <210> 127  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 127  
 Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15  
 25  
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly  
 20 25 30  
 30  
 Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp  
 35 40 45  
 35  
 Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys  
 50 55 60  
 40  
 Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val  
 65 70 75 80  
 45  
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr  
 85 90 95  
 50  
 Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser  
 100 105 110  
 55  
 Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 115 120 125  
 60  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro  
 130 135 140  
 65  
 Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
 145 150 155 160  
 65  
 Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp

ES 2 614 328 T3

					165					170						175
5	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln
				180					185					190		
10	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu
			195					200					205			
15	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly
		210					215					220				
20	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser			
	225					230					235					
25	<210> 128 <211> 237 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 128															
30	Met	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr
	1				5					10					15	
35	Gly	Thr	Arg	Cys	Asp	Ile	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly
				20					25					30		
40	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp
			35					40					45			
45	Val	Gly	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys
		50					55					60				
50	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val
	65					70					75					80
55	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr
					85					90					95	
60	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser
				100					105					110		
65	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
			115					120					125			
70	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro
		130					135					140				

ES 2 614 328 T3

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
 145 150 155 160  
 5  
 Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp  
 165 170 175  
 10  
 Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln  
 180 185 190  
 15  
 Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu  
 195 200 205  
 20  
 Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly  
 210 215 220  
 25  
 Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 225 230 235  
 30  
 <210> 129  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 129  
 35  
 Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15  
 40  
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly  
 20 25 30  
 45  
 Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp  
 35 40 45  
 50  
 Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys  
 50 55 60  
 55  
 Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val  
 65 70 75 80  
 60  
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr  
 85 90 95  
 65  
 Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser  
 100 105 110  
 Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu



ES 2 614 328 T3

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr  
100 105 110

5 Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
115 120 125

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

15 Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
145 150 155 160

20 Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp  
165 170 175

25 Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln  
180 185 190

30 Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu  
195 200 205

35 Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly  
210 215 220

40 Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
225 230 235

<210> 131  
<211> 237  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 131  
Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
1 5 10 15

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

55 Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp  
35 40 45

60 Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys  
50 55 60

65 Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val

ES 2 614 328 T3

	65				70					75				80		
5	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser 85	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly 90	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr 95
10	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser 110
15	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu 125
20	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro 140
25	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu 160
30	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp 175
35	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln 190
40	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu 205
45	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly 220
50	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser			
	225					230					235					
	<210> 132 <211> 237 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 132															
55	Met	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr 15
60	Gly	Thr	Arg	Cys	Asp	Ile	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly 30
65	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp 45
			35					40								

ES 2 614 328 T3

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys  
50 55 60

5 Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val  
65 70 75 80

10 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr  
85 90 95

15 Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr  
100 105 110

20 Tyr Asp Gly Pro Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
115 120 125

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

30 Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
145 150 155 160

35 Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp  
165 170 175

40 Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln  
180 185 190

45 Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu  
195 200 205

50 Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly  
210 215 220

55 Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
225 230 235

<210> 133  
<211> 1410  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 133

60

65

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagcgt gcaggcccag 60  
 gtgcagctgg tcgagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcagc tacgtgatga actgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggagtgggt gtccttcacg agcggcgaca gcagcaacac ctactacgcc 240  
 10 gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300  
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gaccttcagt 360  
 15 cacggccacc tgggcggagg actgagcatg gatttctggg gccagggcac cctggtcacc 420  
 gtctcctcag cttccaccaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 480  
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540  
 20 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600  
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacag tgcctccag caacttcggc 660  
 25 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 720  
 gttgagcgcg aatgtttgtg cgagtgccca ccgtgccccag caccacctgt ggcaggaccg 780  
 30 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840  
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 900  
 35 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960  
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccggt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020  
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080  
 40 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200  
 45 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260  
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320  
 50 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380  
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1410

55 <210> 134  
 <211> 1389  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 134

65

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60  
 gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240  
 10 gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300  
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360  
 15 ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420  
 ggcccatccg tcttccccct ggcgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480  
 ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcagge 540  
 20 gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
 ctcagcagcg tgggtgacagt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac 660  
 25 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcga atggtgtgtc 720  
 gagtgcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 780  
 30 aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctg ggtggtggac 840  
 gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900  
 aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960  
 35 ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020  
 aaaggcctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080  
 40 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140  
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200  
 45 cagccggaga acaactaaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260  
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320  
 50 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380  
 ggtaaatga 1389

55 <210> 135  
 <211> 1410  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 135

65

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagcgt gcaggcccag 60  
 gtgcagctgg tgcagctctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggettccac cttcagcagc tacgtgatga actgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggagtgggt gtccttcacg agcggcgaca gcagcaacac ctactacgcc 240  
 10 gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300  
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtaact actgcgcccg gaccttcctg 360  
 15 cacggccacc tgggcggagg actgagcatg gatttctggg gccagggcac cctggtcacc 420  
 gtctcctcag cttccaccaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgcctg ctccaggagc 480  
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540  
 20 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600  
 cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacag tgccctccag caacttcggc 660  
 25 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 720  
 gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgocca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 780  
 30 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 840  
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 900  
 35 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960  
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccggt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020  
 40 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tgcagaaaac catctccaaa 1080  
 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggaggagatg 1140  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgectg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200  
 45 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260  
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320  
 50 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgacaacca ctacacgcag 1380  
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1410  
  
 <210> 136  
 <211> 1389  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 136

65

ES 2 614 328 T3

	atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag	60
	gtgcagctgg tgcgagcgcg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc	120
5	tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct	180
	ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc	240
10	gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg	300
	cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac	360
15	ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag	420
	ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc	480
20	ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcaggc	540
	gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	600
	ctcagcagcg tgggtgacagt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac	660
25	gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttggtgc	720
	gagtgcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca	780
30	aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctg ggtggtggac	840
	gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	900
35	aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc	960
	ctcaccgttg tgcaccagga ctgggtgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	1020
40	aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa	1080
	ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg	1140
45	acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcggcg tggagtggga gagcaatggg	1200
	cagccggaga acaactaaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctttcttc	1260
	ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1320
50	tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1380
	ggtaaata	1389
55	<210> 137 <211> 1386 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 137	
65		

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60  
 gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgacc ggcgtgcacg gcgacaccta ctacgccgac 240  
 10 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300  
 atgaacagcc tgcggggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360  
 15 cacttcgact actggggcca gggcacacct gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420  
 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480  
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540  
 20 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600  
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgta 660  
 25 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgc aaatg ttgtgtcgag 720  
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780  
 30 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840  
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
 35 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc 960  
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020  
 ggctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080  
 40 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140  
 tgcctgttca aaggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caatgggag 1200  
 45 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260  
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320  
 50 gtgatgatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380  
 aaatga 1386

55 <210> 138  
 <211> 1386  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 138

65

ES 2 614 328 T3

	atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag	60
	gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc	120
5	tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct	180
	ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc ggcaactggg gcgacaccta ctacgccgac	240
10	agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag	300
	atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagggg cacctacctg	360
15	cacttcgact actggggcca gggcacccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc	420
	ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg	480
20	ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct	540
	ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	600
	agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta	660
25	gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcgaaatg ttgtgtcgag	720
	tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa	780
30	cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg	840
	agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900
35	gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc	960
	accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	1020
40	ggcctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca	1080
	caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc	1140
	tgctgtgtca aaggettcta ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200
45	ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc	1260
	tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1320
50	gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1380
	aatga	1386
55	<210> 139 <211> 1386 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 139	
65		

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60  
 gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgacc acccaccagg gctacaccta ctacgccgac 240  
 10 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300  
 atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360  
 15 cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420  
 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480  
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcctt 540  
 20 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 600  
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta 660  
 25 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaagt ttgtgctcag 720  
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780  
 30 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg 840  
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
 35 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc 960  
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020  
 ggctccccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080  
 40 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140  
 tgcttggctc aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
 45 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260  
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320  
 50 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380  
 aaatga 1386

55 <210> 140  
 <211> 1386  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 140

65

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60  
 gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgccacc aacagatacg gctacaccta ctacgccgac 240  
 10 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300  
 atgaacagcc tgcggggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagga cacctacctg 360  
 cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420  
 15 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480  
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggecct 540  
 20 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600  
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta 660  
 25 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcgaaatg ttgtgtcgag 720  
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780  
 30 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840  
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc 960  
 35 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa 1020  
 ggctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080  
 40 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140  
 tgcctggta aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
 45 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260  
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320  
 50 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380  
 aaatga 1386

55 <210> 141  
 <211> 1389  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 141

65

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60  
 gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240  
 10 gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300  
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360  
 15 ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420  
 ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480  
 ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcagggc 540  
 20 gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
 ctcagcagcg tgggtgacagt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac 660  
 25 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcga atggtgtgtc 720  
 gagtgcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 780  
 30 aaacccaagg acacctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctg ggtggtggac 840  
 gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900  
 35 aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960  
 ctaccgcttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020  
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080  
 40 ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140  
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200  
 45 cagccggaga acaactaaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260  
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320  
 50 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380  
 ggtaaatga 1389  
 <210> 142  
 <211> 1386  
 55 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 142  
 60  
 65

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60  
 gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc accccctacg gcgacaccta ctacgccgac 240  
 10 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300  
 atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360  
 15 cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420  
 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480  
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540  
 20 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600  
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttccggcacc agacctacac ctgcaacgta 660  
 25 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaagc ttgtgtcgag 720  
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780  
 30 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840  
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtaoagtgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
 35 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc 960  
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020  
 ggccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080  
 40 cagggtgata ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140  
 tgccctggta aaggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
 45 ccggagaaca actacaagac cacacctcc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1260  
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320  
 50 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380  
 aaatga 1386

55 <210> 143  
 <211> 1386  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 143

65

ES 2 614 328 T3

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60  
 gtgcagctgg tgcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120  
 5 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180  
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc accccctacg gcgacaccta ctacgccgac 240  
 10 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaacaccct gtacctgcag 300  
 atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360  
 15 cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420  
 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480  
 20 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa cccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540  
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600  
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta 660  
 25 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag 720  
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 780  
 30 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840  
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900  
 35 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc 960  
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020  
 40 ggctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080  
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140  
 tgcttggta aaggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200  
 45 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc 1260  
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320  
 50 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380  
 aaatga 1386

55 <210> 144  
 <211> 393  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 144

65

ES 2 614 328 T3

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcaactggctg gtttcgctac cgtagcgcag 60  
 gccgatatcg aactgacca gccgccttca gtgagcgttg caccaggtca gaccgcgcgt 120  
 5 atctcgtgta gcggcgataa tattggttct ttttatgttc attggtacca gcagaaacct 180  
 gggcaggcgc cagttcttgt gatttatgat gataataatc gtccctcagg catcccggaa 240  
 10 cgctttagcg gatccaacag cggcaacacc gcgaccctga ccattagcgg cactcaggcg 300  
 gaagacgaag cggattatta ttgcggttct tgggctggtt cttctgggtc ttatgtgttt 360  
 15 ggcgccgca cgaagttaac cgttcttggc cag 393

<210> 145  
 <211> 714  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<900> 145  
 25 atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcgctg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc 60  
 gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120  
 30 agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180  
 cccccggca agggcccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240  
 35 agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300  
 caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac 360  
 gtgtttggcg gcggaaccaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggetgc ccctcggctc 420  
 40 actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480  
 ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggagatag cagccccgctc 540  
 45 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcgccagc 600  
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggctc 660  
 50 acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

<210> 146  
 <211> 705  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 146

60

65

ES 2 614 328 T3

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggttgc 60  
 gacatcgagc tgaccagcc cccagcgtg agcgtggccc ctggccagac cgcccggatc 120  
 5 agctgcagcg gcgacaacat cggcagcttc tacgtgact ggtatcagca gaagcccggc 180  
 caggcccccg tgctggtgat ctacgacgac aacaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg 240  
 10 ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccgag 300  
 gacgaggccg actactactg cgccagctgg accggcgtgg agcccgacta cgtgtttggc 360  
 15 ggcggaacaa agcttaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcggc cactctgttc 420  
 ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgac 480  
 ttctaccggy gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 540  
 20 gtggagacaa ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctatctg 600  
 agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660  
 25 gggagcaccg tggaaaagac agtggcccct acagaatgtt catag 705

30 <210> 147  
 <211> 714  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 147

35 atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggttgc 60  
 gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120  
 40 agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180  
 caccgccgga aggccccaa gctgatgate tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240  
 45 agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300  
 caggccgagg acgaggccga ctactactgc cagagctacg ccggcagcta cctgagcgag 360  
 gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 420  
 50 actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480  
 ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540  
 55 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcgccagc 600  
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgga aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660  
 60 acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714

65 <210> 148  
 <211> 714  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 614 328 T3

<400> 148

5	atgagtgtgc tcactcaggt cctggcgttg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc	60
	gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
	agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
10	caccccggca aggcccccaa gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
	agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat cagcggcctc	300
15	caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac	360
	gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc	420
20	actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
	ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggagatag cagccccgtc	540
25	aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	600
	agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	660
30	acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	714

<210> 149  
 <211> 714  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 149

40

45

50

55

60

65

ES 2 614 328 T3

	atgagtgtgc	tcactcaggt	cctggcgttg	ctgctgctgt	ggcttacagg	tacgcgttgc	60
	gacatcgccc	tgaccagcc	cgccagcgtg	agcggcagcc	ctggccagag	catcaccatc	120
5	agctgcaccg	gcaccagcag	cgacgtgggc	gacatcaacg	acgtgagctg	gtatcagcag	180
	caccccggca	aggcccccaa	gctgatgata	tacgacgtga	acaaccggcc	cagcggcgtg	240
10	agcaaccggt	tcagcggcag	caagagcggc	aacaccgcca	gcctgacat	cagcggcctc	300
	caggccgagg	acgaggccga	ctactactgc	agcagctacg	gcgagagcct	gaccagctac	360
15	gtgtttggcg	gcggaaccaa	gcttaccgtc	ctaggtcagc	ccaaggctgc	ccctcggtc	420
	actctgttcc	cgccctctc	tgaggagctt	caagccaaca	aggccacact	ggtgtgtctc	480
	ataagtgact	tctaccggg	agccgtgaca	gtggcctgga	aggcagatag	cagccccgtc	540
20	aaggcgggag	tggagacaac	cacaccctcc	aaacaaagca	acaacaagta	cgcgccagc	600
	agctatctga	gcctgacgcc	tgagcagtgg	aagtcccaca	gaagctacag	ctgccaggtc	660
25	acgcatgaag	ggagcacctg	ggaaaagaca	gtggccccta	cagaatgttc	atag	714
	<210> 150						
	<211> 714						
	<212> ADN						
30	<213> Homo sapiens						
	<400> 150						
35	atgagtgtgc	tcactcaggt	cctggcgttg	ctgctgctgt	ggcttacagg	tacgcgttgc	60
	gacatcgccc	tgaccagcc	cgccagcgtg	agcggcagcc	ctggccagag	catcaccatc	120
	agctgcaccg	gcaccagcag	cgacgtgggc	gacatcaacg	acgtgagctg	gtatcagcag	180
40	caccccggca	aggcccccaa	gctgatgata	tacgacgtga	acaaccggcc	cagcggcgtg	240
	agcaaccggt	tcagcggcag	caagagcggc	aacaccgcca	gcctgacat	cagcggcctc	300
45	caggccgagg	acgaggccga	ctactactgc	agcagctacg	gcgagagcct	gaccagctac	360
	gtgtttggcg	gcggaaccaa	gcttaccgtc	ctaggtcagc	ccaaggctgc	ccctcggtc	420
	actctgttcc	cgccctctc	tgaggagctt	caagccaaca	aggccacact	ggtgtgtctc	480
50	ataagtgact	tctaccggg	agccgtgaca	gtggcctgga	aggcagatag	cagccccgtc	540
	aaggcgggag	tggagacaac	cacaccctcc	aaacaaagca	acaacaagta	cgcgccagc	600
55	agctatctga	gcctgacgcc	tgagcagtgg	aagtcccaca	gaagctacag	ctgccaggtc	660
	acgcatgaag	ggagcacctg	ggaaaagaca	gtggccccta	cagaatgttc	atag	714
60	<210> 151						
	<211> 714						
	<212> ADN						
65	<213> Homo sapiens						

ES 2 614 328 T3

	<400> 151	
	atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc	60
5	gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
	agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
10	caccccggca aggcccccaa gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
	agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat cagcggcctc	300
15	caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac	360
	gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc	420
	actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
20	ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc	540
	aaggcgggag tgagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	600
25	agctatctga gcctgacgcc tgagcagtg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	660
	acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	714
30	<210> 152 <211> 714 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 152	
	atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc	60
40	gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
	agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
45	caccccggca aggcccccaa gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
	agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat cagcggcctc	300
	caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag	360
50	gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc	420
	actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
55	ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc	540
60		
65		

ES 2 614 328 T3

aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600  
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660  
 5 acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714  
  
 <210> 153  
 <211> 714  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 153  
 15 atgagtgtgc tactcaggt cctggcgttg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc 60  
 gacatcgcgc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120  
 20 agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180  
 caccgccgca aggcccccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240  
 25 agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300  
 caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag 360  
 gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc 420  
 30 actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480  
 ataagtgact tctaccgagg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540  
 35 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600  
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 660  
 40 acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 714  
  
 <210> 154  
 <211> 714  
 45 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 154  
  
 50  
  
 55  
  
 60  
  
 65

ES 2 614 328 T3

	atgagtgtgc tcactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcggtgc	60
	gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
5	agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
	cacccccgca aggcccccaa gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
10	agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc	300
	caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag	360
15	gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc	420
	actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
20	ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc	540
	aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	600
	agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgga aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	660
25	acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	714
30	<210> 155 <211> 213 <212> PRT <213> homo sapiens	
35	<400> 155	
40		
45		
50		
55		
60		
65		



ES 2 614 328 T3

<213> Homo sapiens  
 <400> 156

5 Ala Arg Leu Leu Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg  
 1 5 10

<210> 157  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 157

15 Arg Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His  
 1 5 10 15

20 <210> 158  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia de unión de proteínas

<400> 158

30 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5 10

35 <210> 159  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia de unión de proteínas

<400> 159

45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

50 Gly Gly Gly

<210> 160  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ARNsi

60 <400> 160  
 taaattatca taaagtccta a 21

65 <210> 161  
 <211> 21

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 5 <220>  
 <223> ARNsi  
  
 <900> 161  
 aggactttat gataatttat t 21  
  
 10 <210> 162  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> ARNsi  
  
 <400> 162  
 atagtggta aataactcca g 21  
 20  
 <210> 163  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> ARNsi  
  
 <900> 163  
 ggagttattt aaccactatt t 21  
 30  
 <210> 164  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> ARNsi  
  
 <900> 164  
 taaattctcg t gatgtgccca t 21  
 40  
 <210> 165  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> ARNsi  
  
 <400> 165  
 ggcacatcac gagaatttat t 21  
 50  
 <210> 166  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> ARNsi  
  
 <900> 166  
 tttcttatag cacagctggt t 21  
 60  
 <210> 167  
 65

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> ARNsi  
 <400> 167  
 ccagctgtgc tataagaaat t 21  
 10 <210> 168  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> ARNsi  
 <400> 168  
 tagaccttc catccagct g 21  
 20 <210> 169  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> ARNsi  
 30 <400> 169  
 gcgtgatgg aaaggtctat t 21  
 35 <210> 170  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> cebador RT-PCT  
 <900> 170  
 atgcagctcc cactggccct ggtcttgt 29  
 45 <210> 171  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> Cebador RT-PCR  
 <400> 171  
 aatcaggccg agctggagaa cgcctactag 30  
 55  
 60  
 65

**Reivindicaciones**

- 5  
1. Un anticuerpo aislado o porción de enlace a antígenos del mismo, **caracterizado porque** el anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo enlaza específicamente con polipéptidos de esclerostina y comprende:
- (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de la SEQ ID NO: 4;
- (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de la SEQ ID NO: 15;
- 10 (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de la SEQ ID NO: 26;
- (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de la SEQ ID NO: 37;
- (e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de la SEQ ID NO: 48; y
- 15 (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste de la SEQ ID NO: 59
- 20 2. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo enlaza con dicho polipéptido de esclerostina con un  $K_D$  menor de 10 nM, preferiblemente menor de 1 nM y más preferiblemente menor de 100 pM.
- 25 3. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo puede bloquear el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de señalización Wnt basado en células.
- 30 4. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo tiene un  $IC_{50}$  menor de 1  $\mu$ M, preferiblemente menor de 100 nM y más preferiblemente menor de 20 nM como se mide en un ensayo de señalización Wnt basado en células en líneas celulares HEK293 en presencia de esclerostina.
- 35 5. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo puede bloquear el efecto inhibitorio de la esclerostina en un ensayo de mineralización basado en células.
- 40 6. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo tiene un  $IC_{50}$  menor de 1  $\mu$ M, preferiblemente menor de 500 nM y más preferiblemente menor de 200 nM como se mide en un ensayo de mineralización inducido por BMP2 en células MC3T3 en presencia de esclerostina.
- 45 7. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que inhibe la interacción LRP6/esclerostina en un ensayo de inhibición de solución.
- 50 8. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene un  $IC_{50}$  menor de 1  $\mu$ M, preferiblemente menor de 100 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, más preferiblemente menor de 5 nM, más preferiblemente menor de 3 nM como se mide en ELISA LRP6/esclerostina.
- 55 9. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que puede bloquear el efecto inhibitorio de la esclerostina en la fosforilación de Smad1 inducida por BMP6 en un ensayo funcional basado en células.
- 60 10. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con la reivindicación 9, que tiene un  $IC_{50}$  menor de 1  $\mu$ M, preferiblemente menor de 500 nM y más preferiblemente menor de 200 nM como se mide en un ensayo de fosforilación Smad1 BMP6 en la línea celular MC3T3-E1 en presencia de esclerostina.
- 65 11. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende una secuencia de polipéptidos de VH que tiene al menos un 97 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 70.
12. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende una secuencia de polipéptidos de VL que tiene al menos un 97 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 81.
13. El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende una secuencia de polipéptidos de VL que tiene al menos un 97 por ciento de identidad de secuencia

con la SEQ ID NO: 81 y una secuencia de polipéptidos de VH que tiene al menos un 97 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 70.

- 5 **14.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa que tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 114.
- 10 **15.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa que tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 125.
- 15 **16.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa que tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 125 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa que tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 114.
- 20 **17.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15 que tiene bloqueo cruzado para enlazar con la esclerostina por al menos un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de la reivindicación 16.
- 25 **18.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la capacidad de bloquear de forma cruzada o ser bloqueado de forma cruzada se detecta por ensayo BIAcore o un ensayo ELISA.
- 30 **19.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo es un anticuerpo monoclonal, opcionalmente un anticuerpo monoclonal humano.
- 35 **20.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la porción de enlace a antígenos comprende un fragmento Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv o un scFV.
- 40 **21.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, para su uso como un medicamento.
- 45 **22.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, por ejemplo, una enfermedad relacionada con los huesos, como la osteoporosis.
- 50 **23.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, por ejemplo, una enfermedad relacionada con los huesos, como la osteoporosis.
- 55 **24.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 22, o el uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la enfermedad relacionada con los huesos se elige del grupo que comprende osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida ósea debida a otros trastornos como pérdida ósea asociada con infección por VIH, cáncer o artritis.
- 60 **25.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 65 **26.** La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.
- 27.** Una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica el anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 28.** Un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 27.
- 29.** Una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la

reivindicación 28.

- 5 **30.** Un proceso para la producción de un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 29 y aislar dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo.
- 10 **31.** Un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25 o la reivindicación 26, para su uso en el tratamiento o profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina.
- 15 **32.** El uso del anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina.
- 20 **33.** Un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 25 **34.** Un método in vitro para identificar una célula o tejido que expresa esclerostina, comprendiendo el método poner en contacto dicha célula o tejido con un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo comprende además una etiqueta detectable; opcionalmente en el que dicha etiqueta es radioactiva, fluorescente, magnética, paramagnética o quimioluminiscente.
- 30 **35.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos, para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina.
- 35 **36.** El uso de un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina.
- 40 **37.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, en el que dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo se usa en conjunción con (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos.
- 45 **38.** El uso de un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, en el que dicho anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo se usa en conjunción con (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos.
- 50 **39.** (i) Acido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, en el que el medicamento se usa en conjunción con un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 55 **40.** El uso de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, en el que el medicamento se usa en conjunción con un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 60 **41.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, en el que al paciente se le ha pre-administrado (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la
- 65

hormona paratiroide como calcilíticos.

- 5 **42.** El uso de un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, en el que al paciente se le ha pre-administrado (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos.
- 10 **43.** (i) Acido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, en el que al paciente se le ha pre-administrado un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 15 **44.** El uso de (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por la esclerostina o que está asociado con un nivel aumentado de esclerostina, en el que al paciente se le ha pre-administrado un anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 20 **45.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo o (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35, 37, 39, 41 ó 43, o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36, 38, 40, 42 ó 44, en el que el hPTH es hPTH(1-34).
- 25 **46.** El anticuerpo o porción de enlace a antígenos del mismo o (i) ácido zoledrónico, (ii) un anticuerpo anti-DKK1, (iii) alendronato, (iv) un anticuerpo anti-LRP4, (v) hPTH y/o (vi) agentes de liberación de la hormona paratiroide como calcilíticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35, 37, 39, 41 ó 43, o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36, 38, 40, 42 ó 44, en el que el trastorno relacionado con los huesos es al menos uno de osteoporosis primaria y secundaria, osteopenia, osteomalacia, osteogénesis imperfecta, necrosis avascular también conocida como osteonecrosis, fracturas y curación de implantes incluyendo implantes dentales e implantes de cadera, pérdida ósea debida a otros trastornos como pérdida ósea asociada con infección por VIH, cáncer o artritis.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig. 1

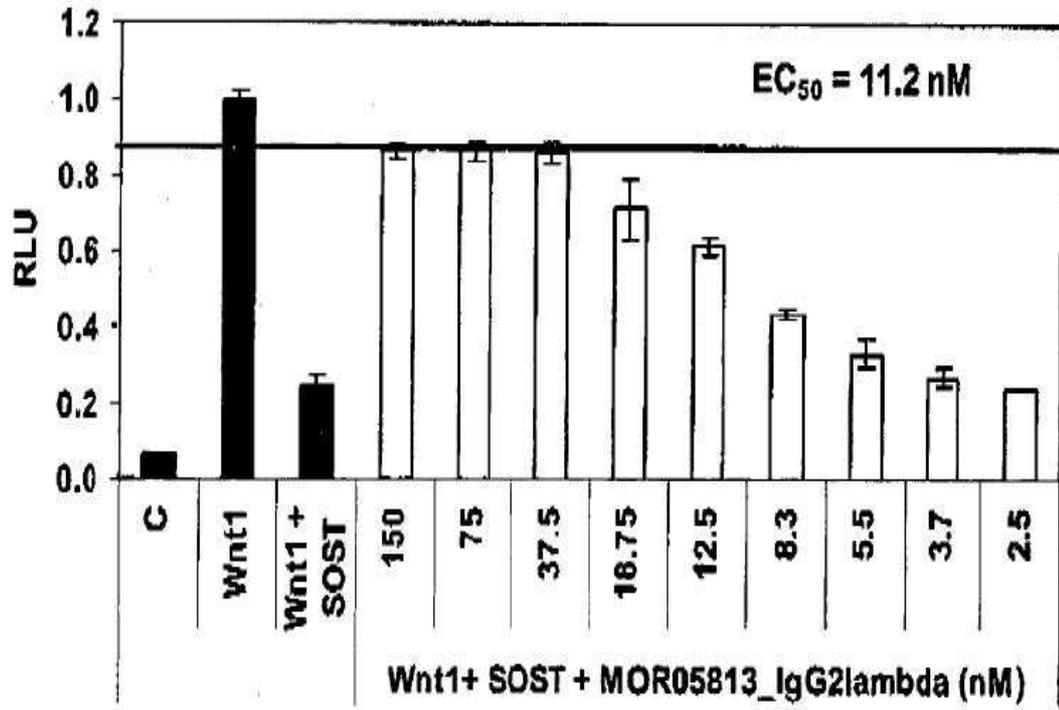


Fig. 2

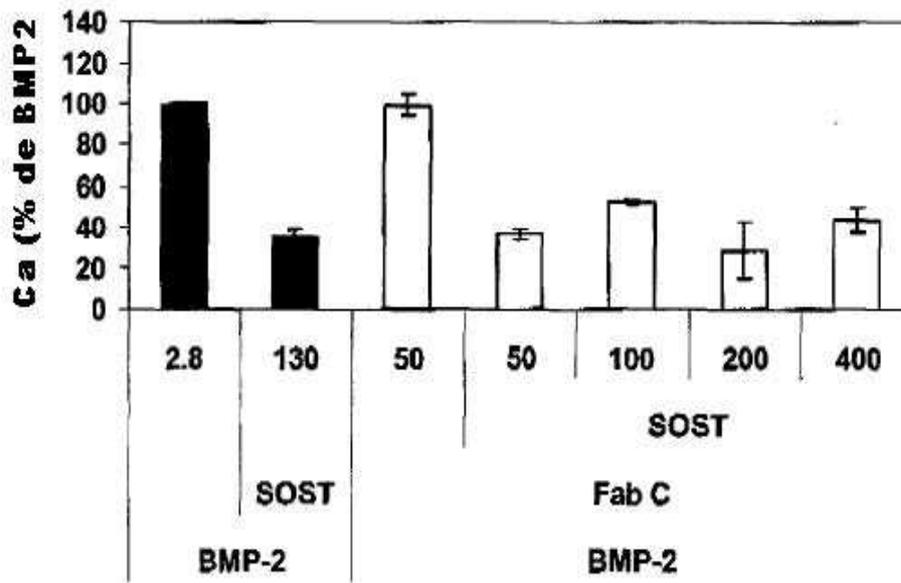
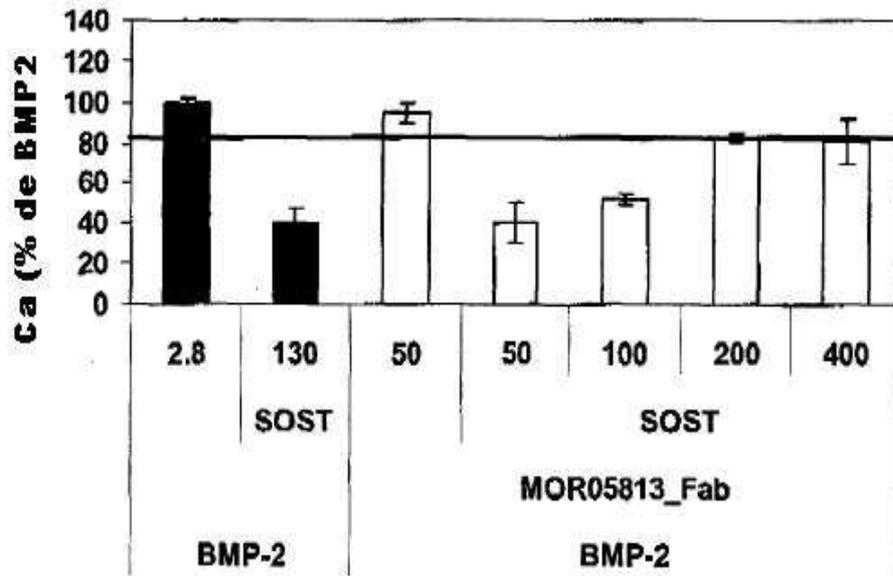


Fig. 3

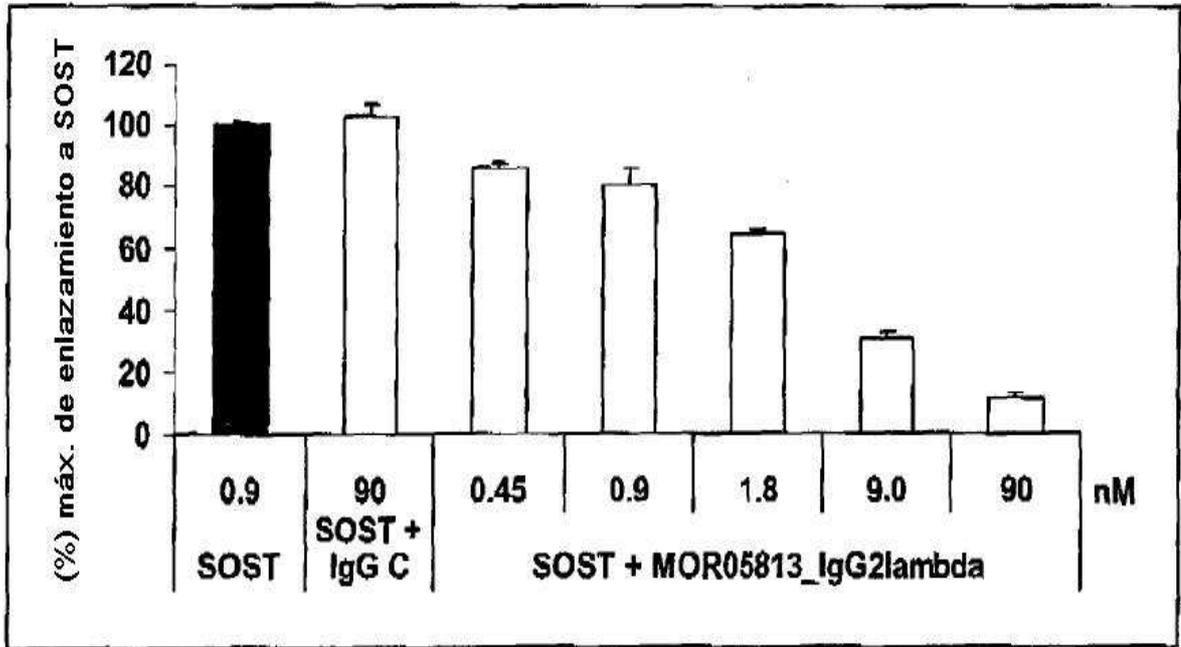


Fig. 4

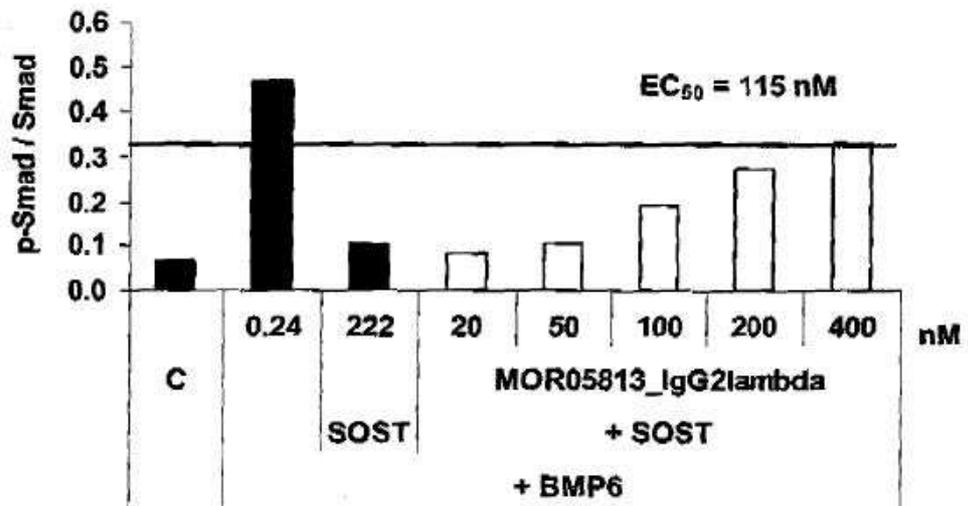
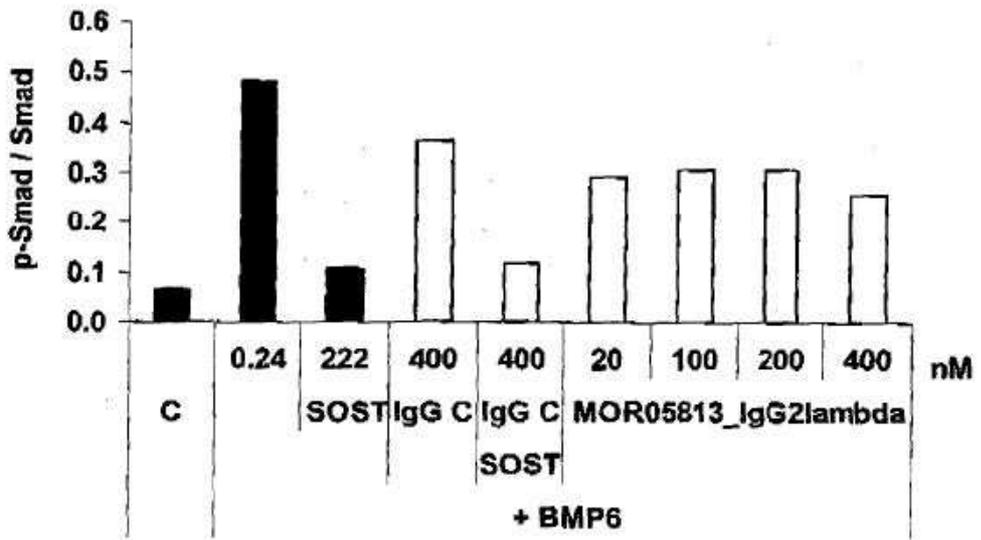
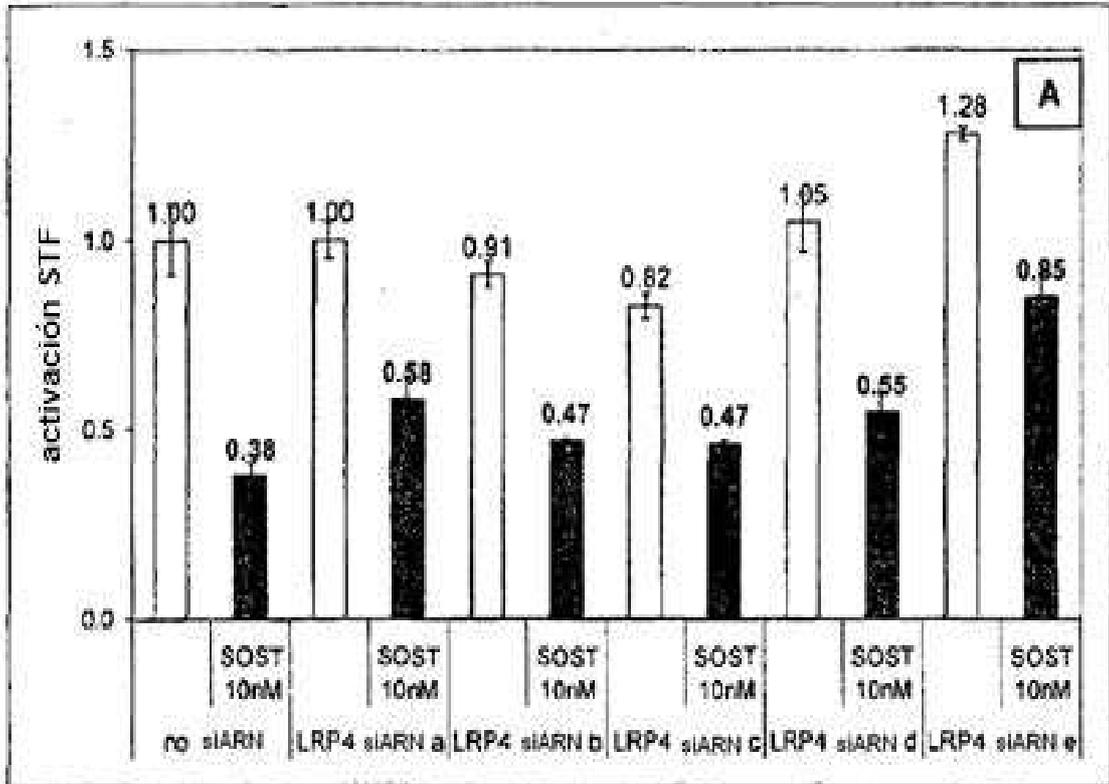


Fig. 5



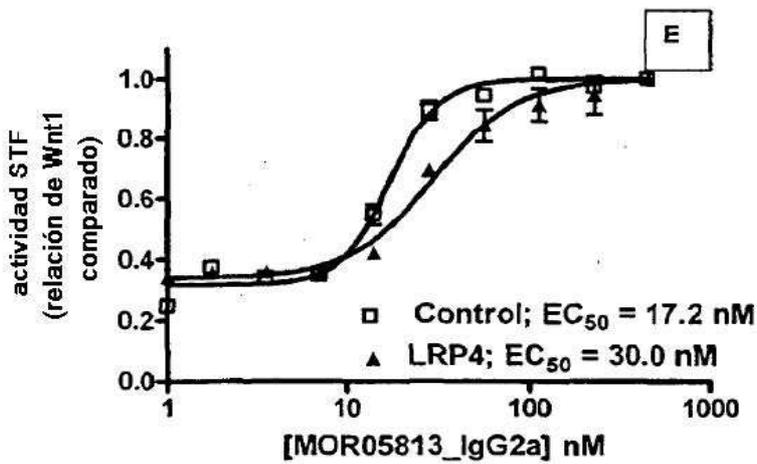
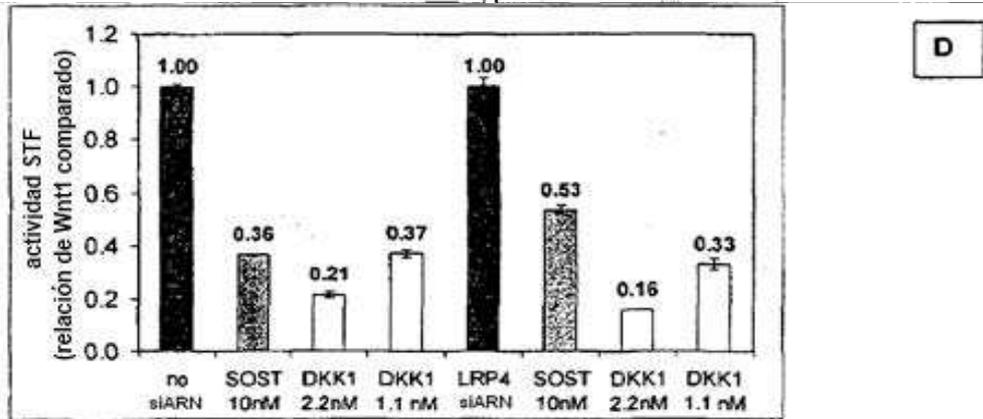
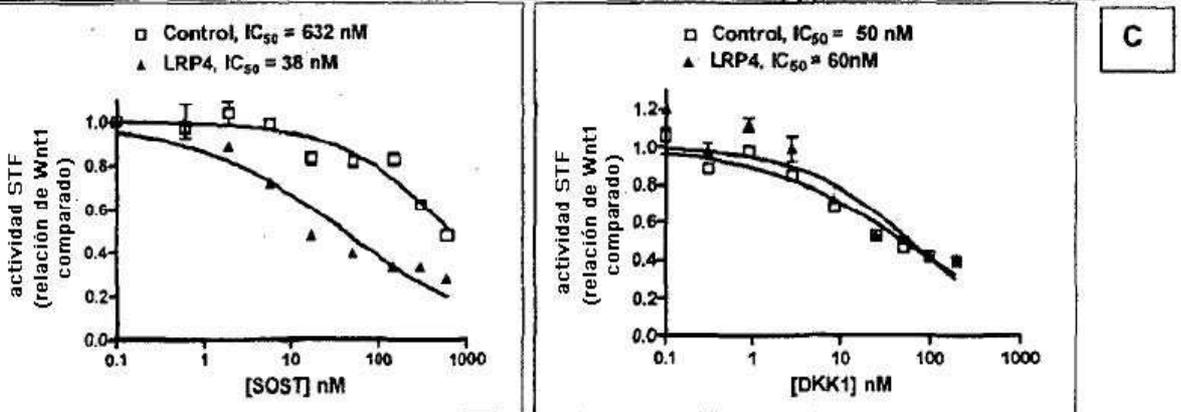
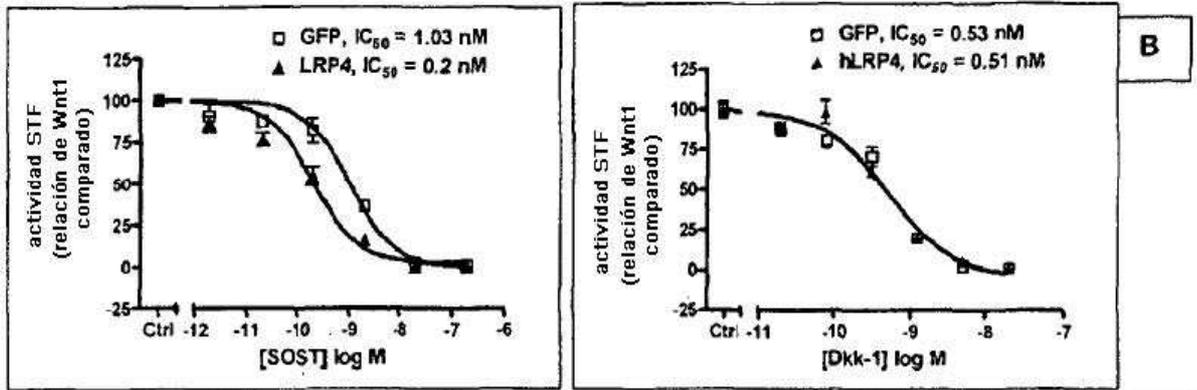


Fig. 6

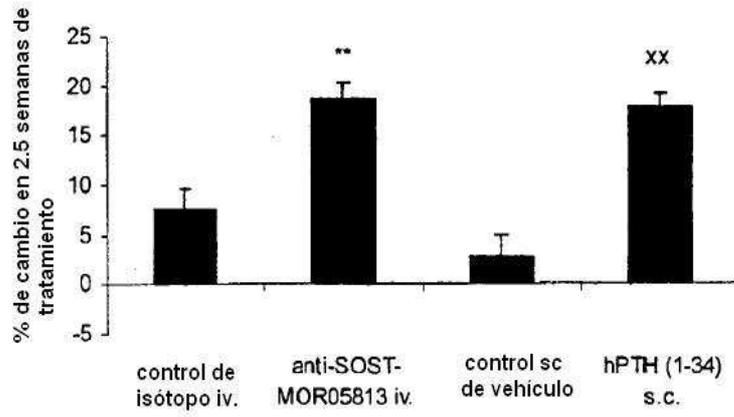


Fig. 7

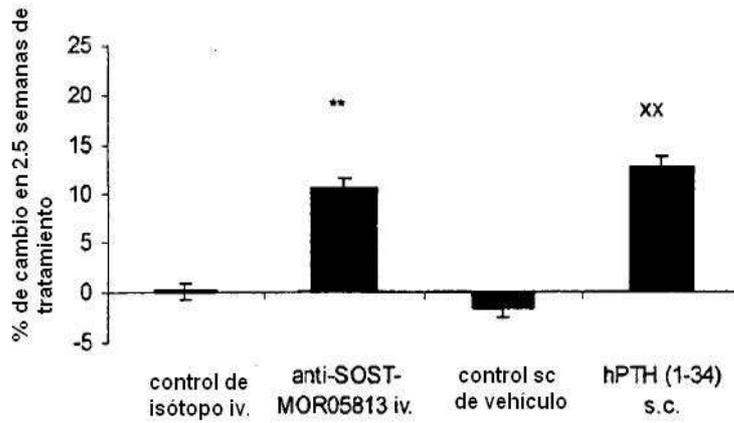
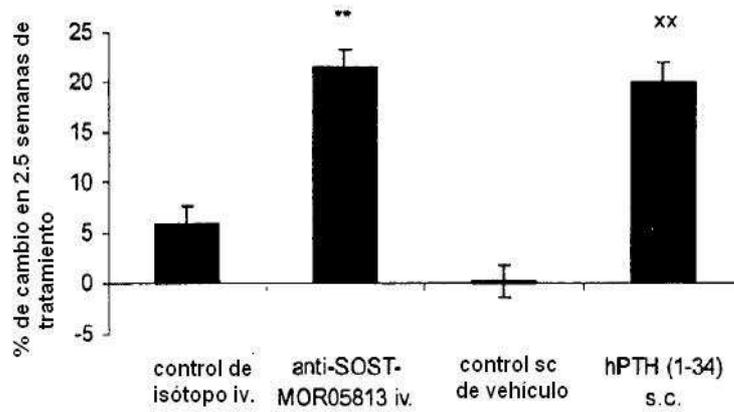
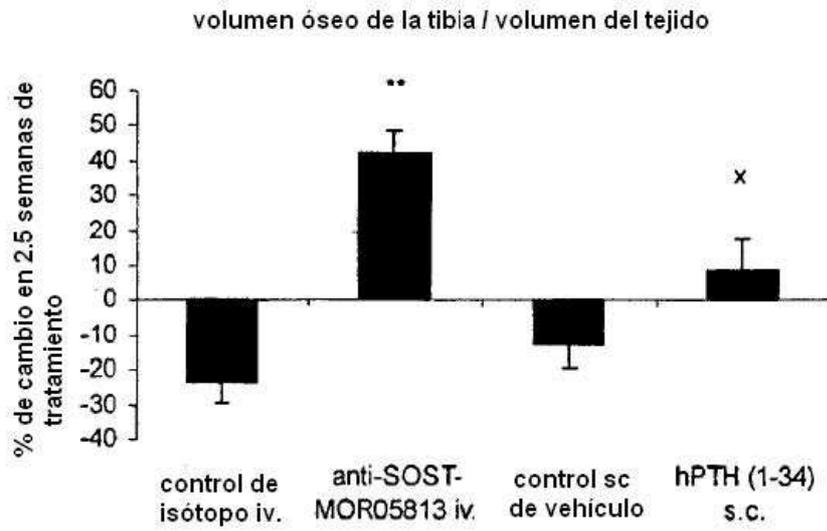


Fig. 8



**Fig. 9**



**Fig. 10**

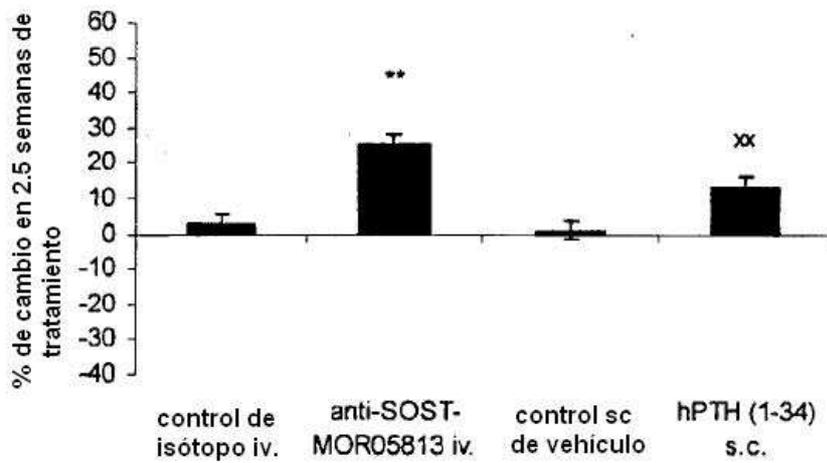


Fig. 11

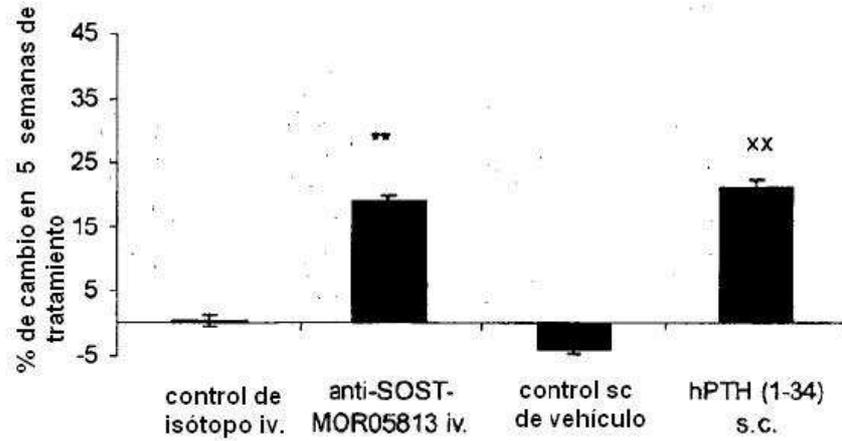


Fig. 12

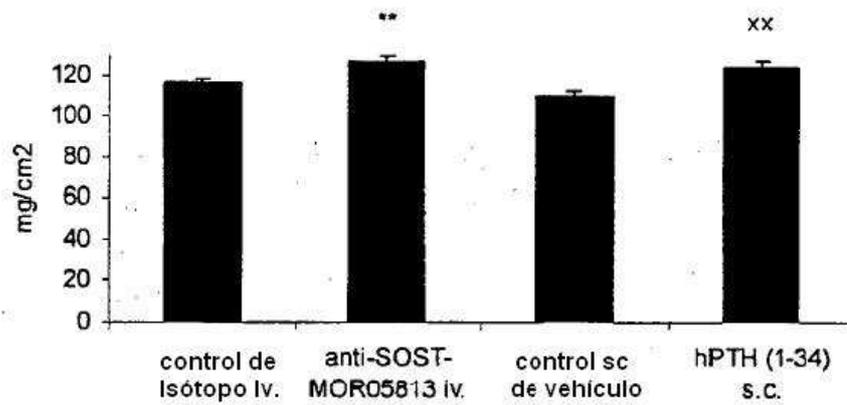


Fig. 13

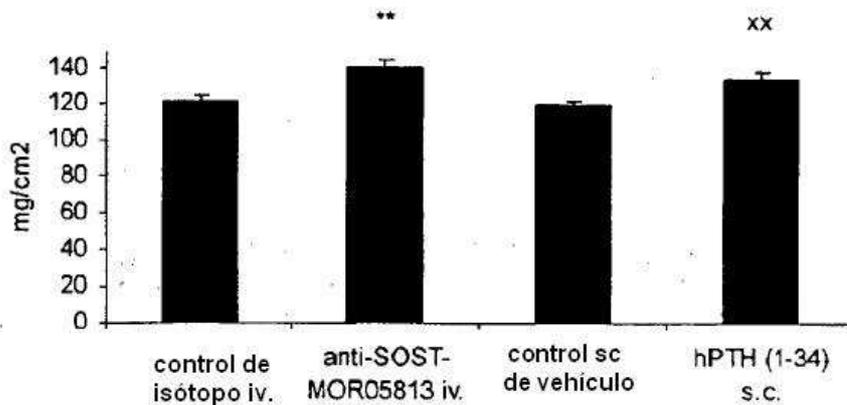


Fig. 14

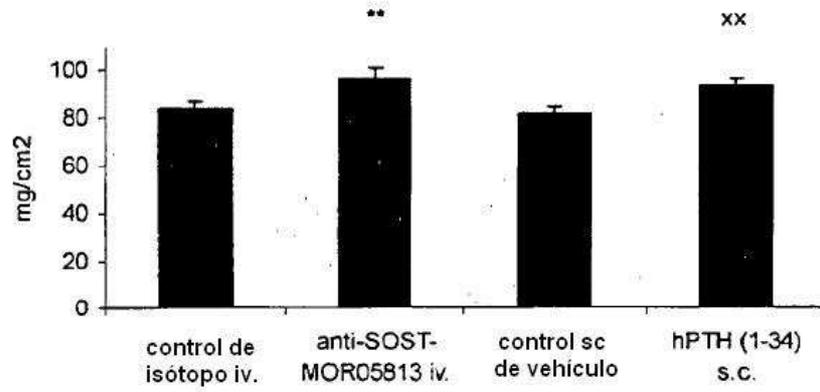


Fig. 15

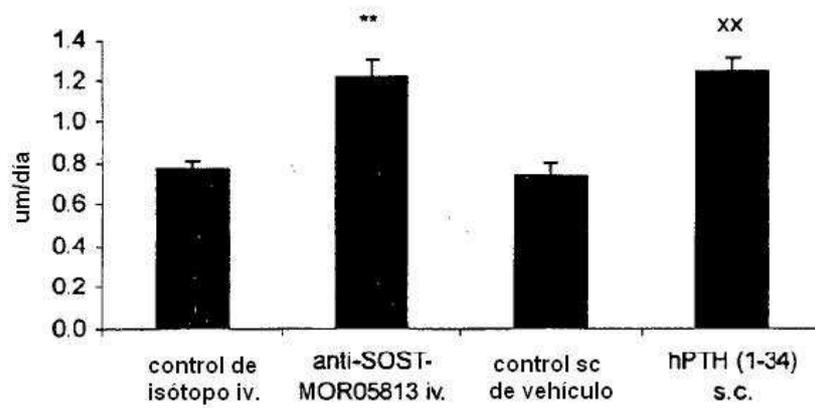


Fig. 16

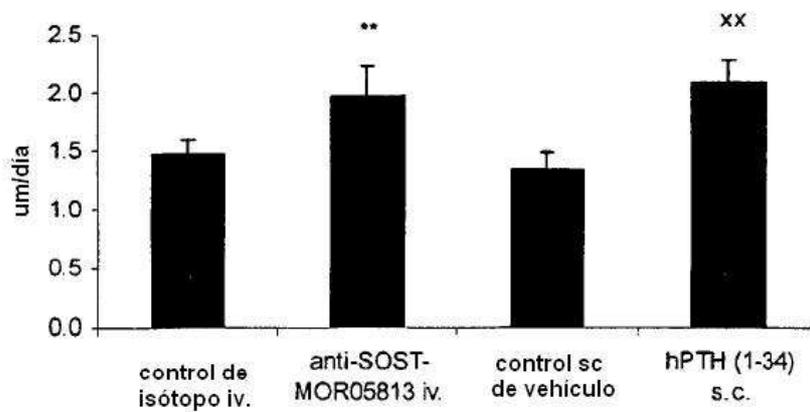


Fig. 17

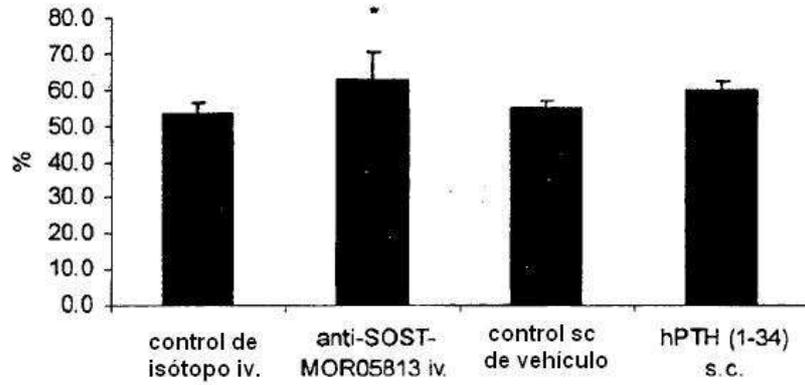


Fig. 18

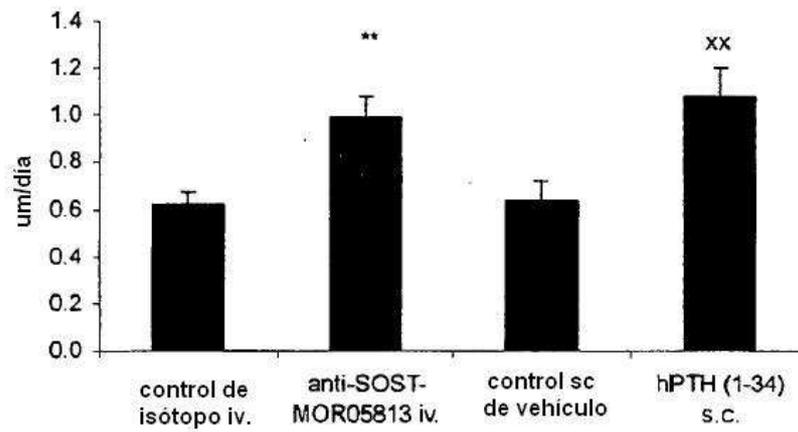


Fig. 19

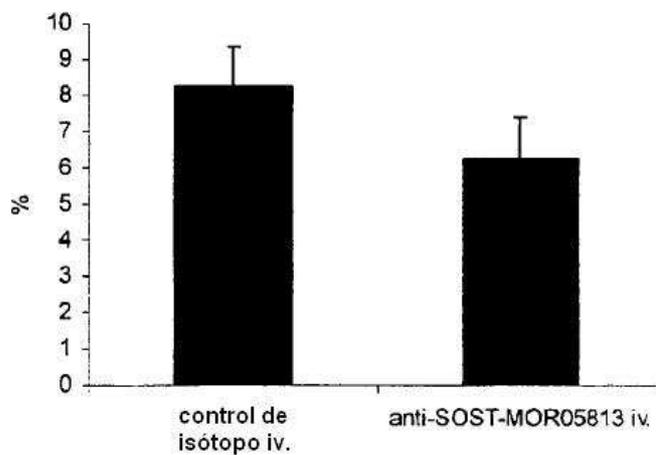


Fig.20

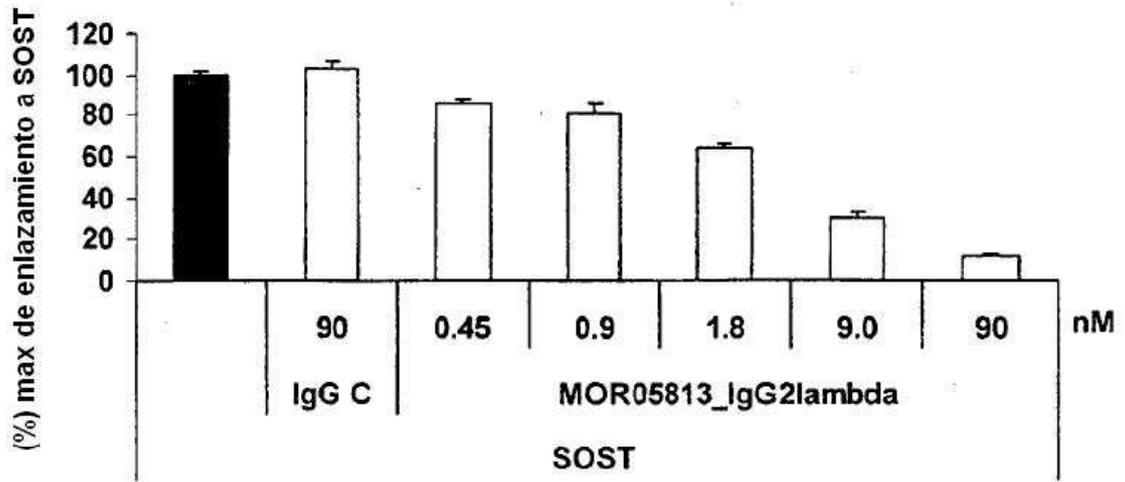


Fig. 21  
A

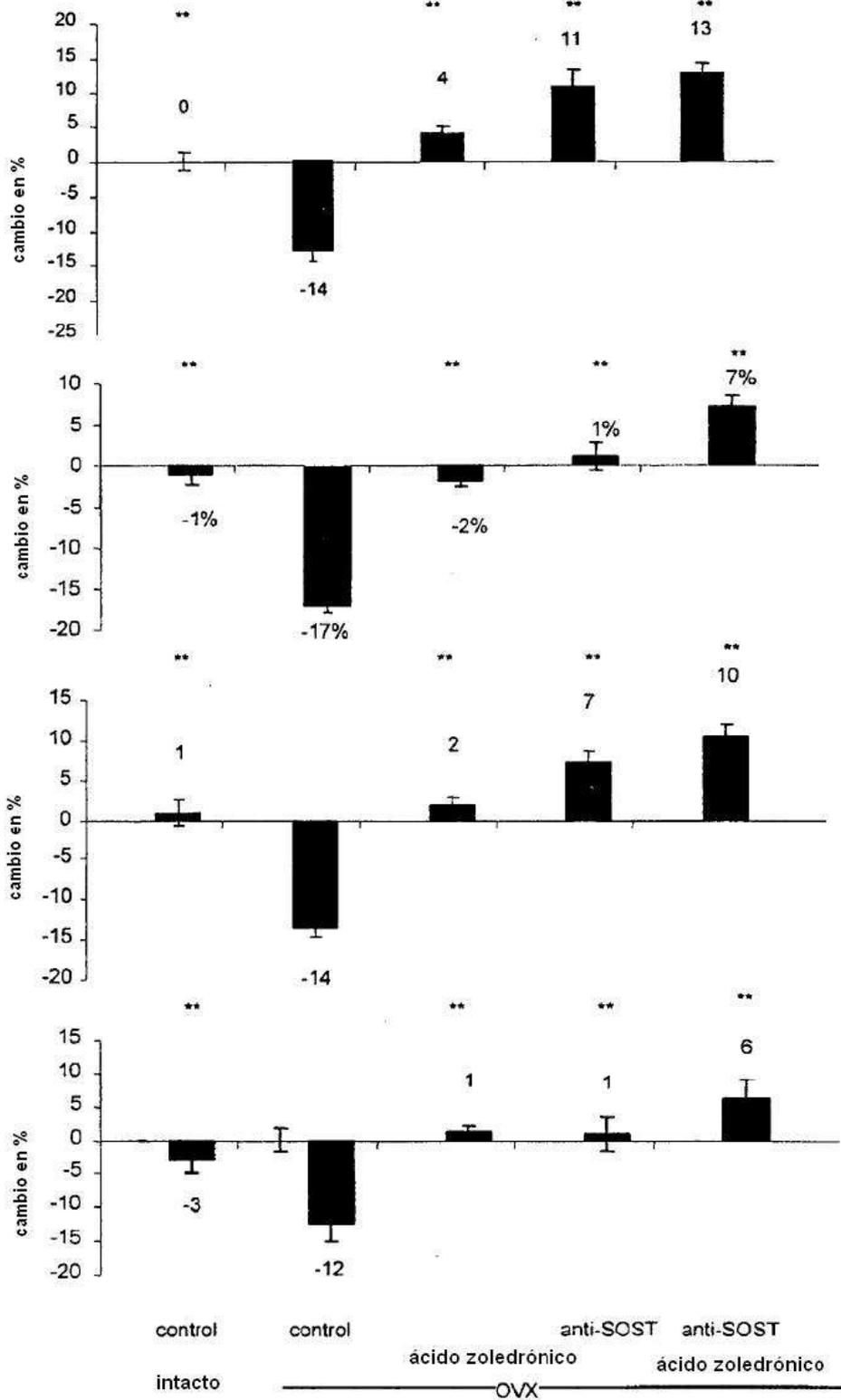


Fig. 22

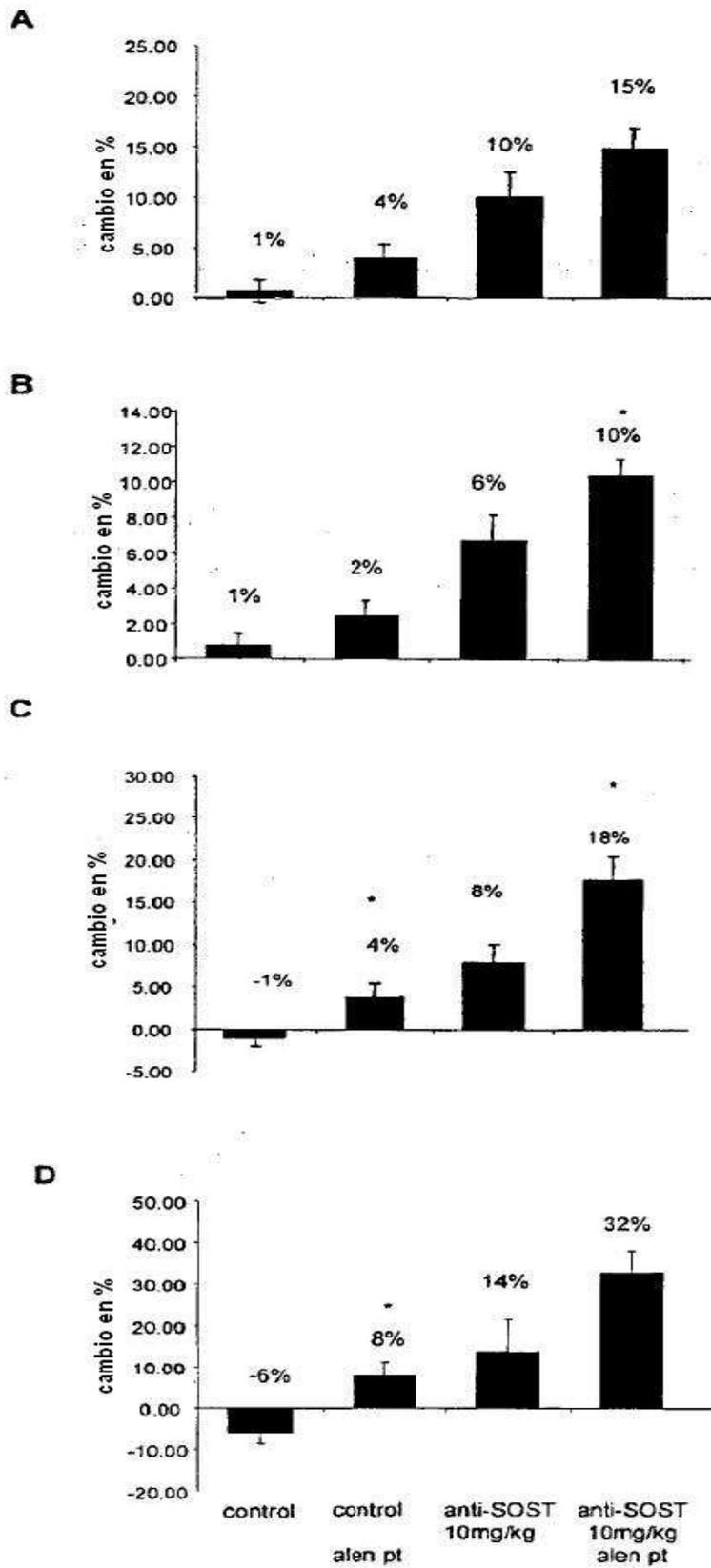


Fig. 23

