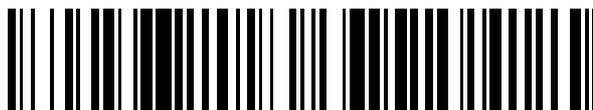


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 650**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 31/59** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61L 27/12** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2007 PCT/US2007/088542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2009 WO09131553**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07875255 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2144613**

54 Título: **Métodos para alterar el crecimiento óseo mediante la administración de antagonista o agonista de Sost o Wise**

30 Prioridad:

**29.12.2006 US 882642 P**

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

**07.05.2018**

73 Titular/es:

**OSTÉOQC INC. (100.0%)  
3400 De Maisonneuve Ouest, Suite 1050  
Montréal, QC H3Z 3B8, CA**

72 Inventor/es:

**ELLIES, DEBRA, L.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 666 650 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).

**Métodos para alterar el crecimiento óseo mediante la administración de antagonista o agonista de Sost o Wise****Descripción**

5

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a métodos para alterar el crecimiento óseo. En particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo Esclerostina (a partir de ahora algunas veces "Sost") para su uso en un método para promover el crecimiento óseo local administrando cantidades terapéuticas de un antagonista de Sost con un andamiaje osteoconductor a un mamífero. La presente divulgación se refiere a dispositivos médicos implantables que comprenden antagonistas o agonistas de Sost o Wise. En una realización diferente, la presente divulgación se refiere a promover hueso nuevo mediante administración sistémica de antagonista de Sost o Wise en combinación con un agente antirresortivo. En otra realización, la presente divulgación se refiere a métodos para reducir hueso sistémicamente y localmente administrando una cantidad terapéutica de un agonista de Sost o Wise a un mamífero. En otra realización más, la presente divulgación se refiere a un método para proteger un riñón de un mamífero de una lesión química o glomerulonefritis administrando un antagonista de Wise o Sost.

20

**Breve descripción de la técnica anterior**

25 Es bien conocido que la formación ósea está indicada para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos diversos en mamíferos incluyendo el simple envejecimiento, degeneración ósea y osteoporosis, curación de fracturas, fusión o artrodesis, osteogénesis imperfecta, etc., así como para la instalación exitosa de varios implantes médicos ortopédicos o periodontales como tornillos, barras, jaula de titanio para fusión espinal, articulaciones de cadera, articulaciones de rodilla, articulaciones de tobillo, articulaciones de hombro, placas y barras dentales, etc. Por el contrario, también se conoce que aparecen trastornos de manera más rara en mamíferos donde se sobreproduce hueso como: tratamiento de osificación heterotópica u osteosarcoma, para prevenir la progresión o reducir estenosis espinal de origen óseo como osteofito u osificación del ligamento longitudinal posterior, para prevenir la fusión espontánea u ortrodesis con artroplastia de articulación o disco, para prevenir o tratar fusión espinal espontánea como hiperostosis esquelética idiopática difusa y espondilitis anquilosante, prevenir osificación o calcificación de ligamentos, tendones o cápsulas de articulaciones, tratar formación ósea heterotópica, prevenir hiperostosis sistémica resultado de enfermedad ósea metabólica, y enfermedad de Paget. Para estas indicaciones y otras se desea reducir o inhibir tal sobreproducción cuando sea posible.

35

40 En el incremento de mineralización ósea para tratar condiciones caracterizadas al menos en parte por una mayor resorción ósea, como osteopenia, fracturas óseas, osteoporosis, artritis, metástasis tumorales, enfermedad de Paget y otros trastornos óseos metabólicos, se usan inhibidores de catepsina K y proteínas que se enlazan con TGF-beta, etc., que son bien conocidos como se muestra en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040235728 de Selwyn Aubrey Stoch, publicada el 25 de noviembre, 2004, y Mary E. Brunkow et al en la patente de Estados Unidos N° 6.489.445 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20040009535, publicada el 5 de enero, 2004. En las publicaciones de Brunkow '535 y '445, las proteínas que se enlazan con TGF-beta incluyen anticuerpos de polipéptido Sost (péptido de longitud completa y corto) que interfieren con la interacción entre la esclerostina de proteína que se enlaza con TGF-beta y un miembro de superfamilia de TGF-beta, particularmente una proteína morfogénica ósea. Todas las enfermedades nombradas anteriormente se deben a una pérdida sistémica de mineral óseo y, por lo tanto, la administración del anticuerpo terapéutico es para el aumento sistémico (todo el cuerpo) en la densidad mineral ósea.

45

50 En las patentes de Brunkow '445 y '535, las proteínas de enlace se enlazan preferentemente y específicamente con al menos una proteína morfogénica ósea humana (PMO) entre PMO-5 y PMO-6.

50

55 La patente de Estados Unidos 6.395.511 de Brunkow et al., muestra una familia nueva de proteínas humanas que se enlazan con TGF-beta y ácidos nucleicos que las codifican. La proteína se enlaza al menos con proteína morfogénica ósea humana-5 y proteína morfogénica ósea humana-6.

55

60 La esclerosteosis es una displasia ósea esclerosante progresiva. Esclerostina (el gen Sost) se identificó originalmente como el gen que causa esclerosteosis. La esclerostina se expresó intensamente en huesos en desarrollo de embriones de ratón. La expresión interrumpida de esclerostina se localizó sobre la superficie de huesos de cráneo que se forman intramembranosamente y huesos largos que se forman endocondralmente. El papel fisiológico de esclerostina queda por elucidar. Sin embargo, se conoce que la pérdida de mutaciones de fusión en Sost provoca una displasia ósea rara caracterizada por sobrecrecimiento esquelético.

60

65 En la aplicación de patente de Estados Unidos de Sam Kim N° 20060165799, publicada el 27 de julio, 2006, se muestra una composición para rellenar hueso para estimular la formación ósea y la consolidación ósea que

65

comprende sulfato de calcio biocompatible y biopolímeros viscosos. La composición se administrará fácilmente a la parte que falta de hueso lesionado sin dispersarse a los órganos circundantes.

5 En la patente de Estados Unidos de Ronald S. Sapiieszko 5939039, publicada en 1999 se muestran los procesos para producir minerales precursores únicos de fosfato de calcio que pueden formarse para formar un cemento o pasta que se fijan solos. Una vez colocados en el cuerpo, estos cementos de fosfato de calcio (CFC) se resorberán y remodelarán (convertirán) en hueso.

10 Por ejemplo, la partículas de fosfato de calcio preparadas de acuerdo con la patente '039 pueden usarse en cualquiera de los procedimientos ortopédicos o dentales conocidos para el uso de fosfato de calcio; los procedimientos de reparación de defecto con relleno de hueso, defecto de relleno oncológico, relleno y reconstrucción de vacío cráneo-maxilofacial, relleno de sitio de extracción dental.

15 La solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060198863 de Carl Alexander DePaula, publicada el 7 de septiembre, 2006, se refiere a una composición cerámica maleable para rellenar defectos óseos. La composición comprende partículas cerámicas de fosfato tricalcio beta que tienen un tamaño de partícula desde aproximadamente 40 micrones a 500 micrones mezcladas con un transportador de hidrogel que contiene tampón de ácido cítrico. La composición tiene un pH entre 7,0 y 7,8 y el componente de hidrogel del transportador se extiende desde aproximadamente 1,0 a 5,0% de la composición.

20 Se entiende que Wise y Sost son miembros de la familia muy relacionados (Ellies et al, JBMR 2006 Nov; 21 (11):1738-49). Aquellos expertos en la técnica son conscientes de que el ratón mutante con Wise nulo muestra un fenotipo óseo. Presentación inaugural en el encuentro de Investigación de Mineral Óseo de la Sociedad Americana de 2005 en Nashville, TN. Estado de las conferencias de arte, una fuente embrionaria de tejido esquelético. Patrón de Desarrollo Cráneo-facial; por Robb Krumlauf, Ph.D, Instituto Stowers para Investigación Médica, Kansas City, Missouri, Estados Unidos.

25 La solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005025604 de Vigenery publicada el 17 de noviembre, 2005, muestra una formación ósea inducido mecánicamente un incremento en actividad de osteoblasto y elevando la concentración sistémica de sangre de un agente anabólico óseo, incluyendo opcionalmente la elevación de concentración de sangre sistémica de un agente antirresortivo.

30 Finalmente, Yanagita, Modulador de actividad de proteína morfogénica ósea en la progresión de enfermedad del riñón, Kidney Int., Vol. 70, N° 6 (2006) 989-93 muestra que Usag-1 (también conocido como "Wise") protege el riñón de agravio de cisplatino debido a la inhibición de BMB. Véase también Yanagita, Sensibilización uterina-gen asociado-1 (USAG-1), un antagonista nuevo expresado en el riñón, acelera la lesión tubular, J. Clin. Invest., Vol. 116, N° ° (2005) 70-9, Yanagita, antagonistas BMP: sus papeles en el desarrollo e implicación en patofisiología, Cytokine Growth Factor Rev., Vol. 16, N° 3 (2005) 309-17 y Yanagita, USAG-1: un antagonista de proteína morfogénica ósea expresada abundantemente en el riñón, Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 316, N° 2 (2004) 490-500.

### Resumen de la invención

35 La presente invención proporciona un anticuerpo de Sost, para su uso en un método para promover el crecimiento óseo local para curación de fracturas, fusión (artrodesis), reconstrucción ortopédica o reparación periodontal, en un paciente mamífero, donde dicho método comprende la administración de dicho anticuerpo localmente a dicho paciente mamífero junto con una matriz o andamiaje biocompatible propicio para fijar el crecimiento de hueso nuevo, donde dicha matriz comprende un andamiaje que comprende un material seleccionado del grupo consistente en una sal de calcio, un sulfato de calcio, autoinjerto, hidroxiapatita, hueso desmineralizado, aloinjerto o fosfato tricalcio, donde dicho anticuerpo Sost comprende un anticuerpo o fragmento FAB que se enlaza específicamente con el péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 22.

40 Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un método para promover el crecimiento óseo local, que comprende las etapas de administrar localmente una cantidad terapéutica de un antagonista de Sost a un paciente mamífero que lo necesite.

45 Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un método para promover el crecimiento óseo local, que comprende las etapas de administrar localmente una cantidad terapéutica de un antagonista de Wise a un paciente mamífero que lo necesite.

50 Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un método para promover el crecimiento óseo local, que comprende las etapas de administrar localmente una cantidad terapéutica de un antagonista de Sost junto con un andamiaje de sal de calcio biocompatible osteoconductiva a un paciente mamífero que lo necesite.

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar un método para promover el crecimiento óseo local, que comprende las etapas de administrar localmente una cantidad terapéutica de un antagonista de Wise junto con un andamiaje de sal de calcio biocompatible osteoconductiva a un paciente mamífero que lo necesite.

5 Es un objeto más de la presente invención proporcionar un dispositivo médico ortopédico o periodontal, que comprende un soporte estructural, donde una parte implantable de dicho soporte estructural está adaptada para estar implantada permanentemente dentro del cuerpo de un mamífero, estando dicho soporte estructural implantado al menos parcialmente retenido en dicho cuerpo por crecimiento óseo local, teniendo dicho soporte estructural al menos una capa externa parcial de un antagonista de Sost con o sin un andamiaje biocompatible osteoconductivo.

10 Es un objeto más de la presente invención proporcionar un dispositivo médico ortopédico o periodontal, que comprende un soporte estructural, donde una parte implantable de dicho soporte estructural está adaptada para estar implantada permanentemente dentro del cuerpo de un mamífero, estando dicho soporte estructural implantado al menos parcialmente retenido en dicho cuerpo por crecimiento óseo local, teniendo dicho soporte estructural al menos una capa externa parcial de un antagonista de Wise con o sin un andamiaje biocompatible osteoconductivo.

15 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método para incrementar la densidad ósea tanto sistémicamente (el cuerpo entero) como localmente, que comprende las etapas de administrar a un paciente mamífero que lo necesite una cantidad terapéutica de un antagonista de Sost junto con un fármaco antirresortivo.

20 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método para incrementar la densidad ósea tanto sistémicamente (el cuerpo entero) como localmente, que comprende las etapas de administrar a un paciente mamífero que lo necesite una cantidad terapéutica de un antagonista de Wise junto con un fármaco antirresortivo.

25 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método para reducir la densidad ósea tanto localmente como sistémicamente (el cuerpo entero), que comprende las etapas de administrar una cantidad terapéutica de un antagonista de Sost a un paciente mamífero que lo necesite.

30 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método para reducir la densidad ósea tanto localmente como sistémicamente (el cuerpo entero), que comprende las etapas de administrar una cantidad terapéutica de un antagonista de Wise a un paciente mamífero que lo necesite.

35 Otro objeto más de la presente invención reside en un método para proteger a un riñón de un mamífero de lesión química que resulta de, por ejemplo, glomerulonefritis, que comprende la administración sistemáticamente o localmente, a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéutica de un antagonista de SOST o Wise.

40 Estos objetos y otros se proporcionan mediante los procesos nuevos que utilizan la administración de antagonistas o agonistas de Sost a pacientes mamíferos. En particular, los antagonistas o agonistas de Sost administrados localmente con o sin una matriz osteoconductiva o junto con un agente antirresortivo. Alternativamente, los antagonistas de anticuerpo Sost se administran sistemáticamente (el cuerpo entero) junto con un antirresortivo. Los antagonistas de Sost deseables funcionan a través de LRP5 o LRP6, o comprenden un anticuerpo o fragmento FAB que reconoce una cualquiera de las SEQ ID Nos: 1-23.

45 Las características y ventajas anteriores se proporcionan por la presente divulgación que utiliza un antagonista de Sost o Wise o un agonista de Sost o Wise para proporcionar crecimiento o disminución de huesos, respectivamente.

**Definiciones**

50 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la técnica a la que esta invención pertenece. Las siguientes referencias proporcionan a un experto en la técnica una definición general de muchos de los términos usados en esta invención. Singleton et al., Diccionario de microbiología y biología molecular (2ª ed., 1994); El diccionario de Cambridge de ciencia y tecnología (Walker ed., 1988); El glosario de Genética, 5ª ed., R. Rieger et al. (eds), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, El diccionario Harper Collins de biología (1991). Como aquí se usan, los siguientes términos tienen el significado atribuido a ellos a menos que se especifique de otra manera.

55 Como aquí se desvela, las proteínas, particularmente anticuerpos, muteínas, aptámeros de ácido nucleico y péptidos que antagonizan los enlaces específicos de SOST y WISE (Usag-1/ectodin/sostdc1) con sus receptores naturales pueden servir como “agentes de enlace” y “antagonistas o agonistas de SOST” o “antagonistas o agonistas de WISE”.

60 Aquellos expertos en la técnica son capaces de determinar la “cantidad terapéuticamente efectiva” apropiada para administrar tales agonistas o antagonistas, así como métodos y programas para tal administración.

65

La expresión “se enlaza específicamente (o selectivamente)” o cuando se hace referencia a una interacción de anticuerpo “específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con”, se refiere a una reacción de enlace entre dos moléculas que es al menos dos veces los antecedentes y más típicamente más de 10 a 100 veces las asociaciones moleculares antecedentes bajo condiciones fisiológicas. Cuando se usa uno o más agentes de enlace detectables, el enlace específico es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otras sustancias biológicas. Así, bajo condiciones designadas de inmunoensayo, los anticuerpos especificados se enlazan con una secuencia particular de proteína, identificando así su presencia.

El enlace específico con un anticuerpo bajo tales condiciones requiere un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, anticuerpos cultivados contra una proteína particular, variantes polimórficas, alelos, ortólogos, y variantes modificadas de manera conservadora, o variantes de unión, o partes de las mismas, pueden seleccionarse para obtener solamente aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con SOST, WISE o LRP, preferentemente una proteína LRP5 o LRP6 y no con otras proteínas. Esta selección puede conseguirse sustrayendo anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con otras moléculas. Puede usarse una variedad de formatos de inmunoensayos para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *Anticuerpos, Un manual de laboratorio* (1988) para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar inmunoreactividad específica). Los métodos para determinar si dos moléculas interactúan específicamente aquí se desvelan, y métodos para determinar la afinidad y especificidad de enlace son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Anticuerpos: un manual de laboratorio* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Friefelder, “Bioquímica física: Aplicaciones a bioquímica y biología molecular” (W. H. Freeman y Co. 1976)).

Además, Sost o Wise pueden interferir con el enlace específico de un receptor y su ligando mediante varios mecanismos, incluyendo, por ejemplo, el enlace con el sitio de enlace del ligando, interfiriendo así con el enlace del ligando; el enlace con un sitio diferente al sitio del enlace del ligando del receptor, pero interfiriendo estéricamente en el enlace del ligando con el receptor, enlazándose con el receptor y provocando un cambio conformacional u otro cambio en el receptor, lo que interfiere con el enlace del ligando; o mediante otros mecanismos. Similarmente, el agente puede enlazarse con o interactuar de otra manera con el ligando para interferir con sus especificidad interactuando con el receptor. Para los fines de los métodos aquí desvelados, una comprensión del mecanismo por el cual la interferencia ocurre no es necesaria y no se propone un mecanismo de acción. Un agente de enlace Wise o Sost, como un anticuerpo anti-Wise o anti-Sost, o un fragmento del mismo que se enlace con el antígeno, se caracteriza por tener actividad de enlace específica ( $K_a$ ) de al menos aproximadamente  $10^5 M^{-1}$ ,  $10^6 M^{-1}$  o mayor, preferentemente  $10^7 M^{-1}$  o mayor, más preferentemente  $10^8 M^{-1}$  o mayor, y más preferentemente  $10^9 M^{-1}$  o mayor. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la afinidad de enlace con un anticuerpo, por ejemplo, mediante análisis Scatchard (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-72, 1949).

El término “anticuerpo” como aquí se usa, engloba anticuerpos que ocurren de manera natural así como anticuerpos que no ocurren de manera natural, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, bifuncionales y humanizados, así como fragmentos de los mismos que se enlazan con el antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y rIgG). Véase, también, Catálogo y manual Pierce, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Véase también, por ejemplo, Kuby, *J. Immunología*, 3ª ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York (1998): Tales anticuerpos que ocurren de manera natural pueden construirse usando síntesis de péptido en fase sólida, y pueden producirse de manera recombinante o pueden obtenerse, por ejemplo, analizando bibliotecas combinatorias consistente en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables como describe Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989). Estos y otros métodos para hacer, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados con injerto de CDR, de cadena sencilla o bifuncionales son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica (Winter y Harris, *Immunol. Today* 14:243-246 (1993); Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989); Harlow y Lane, *supra*, 1988; Hilyard et al., *Ingeniería de proteínas: una técnica práctica* (IRL Press 1992); Borrabeck, *Ingeniería de anticuerpos*, 2ª ed. (Oxford University Press 1995)).

El término “anticuerpo” incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término también incluye formas genéticamente fabricadas como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). El término también se refiere a fragmentos de cadena sencilla Fv recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Las moléculas bivalentes y biespecíficas se describen en, por ejemplo, Kostelny et al. (1992) *J Immunol* 148:1547, Pack y Pluckthun (1992) *Biochemistry* 31: 1579, Hollinger et al. 1993, *supra*, Gruber et al. (1994) *J Immunol*: 5368, Zhu et al. (1997) *Protein Sci* 6:781, Hu et al. (1996) *Cancer Res.* 56:3055, Adams et al. (1993) *Cancer Res.* 53:4026, y McCartney et al. (1995) *Protein Eng.* 8:301.

Un “anticuerpo humanizado” es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como un ratón, rata o conejo

que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de estructura Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias estructurales. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, donde sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de un inmunoglobulina no human y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales (Fr) son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina. El anticuerpo de inmunoglobulina también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al. Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). La humanización puede realizarse esencialmente siguiente el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al. Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 329:1534-1536 (1988); sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, los anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N1 4.816.567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” aquí se usan intercambiamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácido donde uno o más residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido que ocurre de manera natural, así como polímeros de aminoácidos que ocurren de manera natural, aquellos que contiene residuos modificados y polímero de aminoácido que ocurre de manera no natural.

En cuanto a secuencias de aminoácido, un experto en la técnica reconocerá que las sustituciones, eliminaciones y adiciones individuales para un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína que alteren o eliminen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de manera conservadora” donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan una funcionalidad similar a los aminoácidos que ocurren de manera natural y a los aminoácidos que ocurren de manera no natural son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora son además, y sin excluir, variantes polimórfica, homólogos interespecies, y alelos de la invención. Las sustituciones típicamente conservadoras una para la otra: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arganina (R), Lisina (K), 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M); Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteínas (1984)).

“Homólogo”, en relación con dos o más péptidos, se refiere a dos o más secuencias o sub-secuencias que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido que son iguales (por ejemplo, aproximadamente 60% de identidad, preferentemente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o una identidad mayor sobre una región especificada, cuando se comparan o se alinean durante una correspondencia máxima en una ventana de comparación o una región designada) como se mide usando los algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con parámetros estándares descritos más abajo, o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, sitio web NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o similares). La definición también incluye secuencias que tienen eliminaciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones, así como variantes polimórficas o alélicas que ocurren de manera natural, y variantes hechas por el hombre. Como se describe más abajo, los algoritmos preferentes pueden considerar espacios y similares. Preferentemente, existe identidad sobre una región que tiene aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o más preferentemente sobre una región que tiene 50-100 aminoácidos de longitud.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia referencia, con la que se comparan las secuencias de la prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de prueba y referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de sub-secuencia y se designan, si es necesario, parámetros de programa de algoritmo de secuencias. Preferentemente, pueden usarse los parámetros estándares del programa, o alternativamente pueden designarse parámetros alternativos. Después, al algoritmo de comparación de secuencias calcula las identidades secuenciales porcentuales para las secuencias de prueba en relación con la secuencia referencia, en base a los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, como aquí se usa, incluye referencia a un segmento de uno del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo consistente típicamente en de 20 a 600, normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más normalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 donde una secuencia puede compararse con una secuencia referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen óptimamente. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante búsqueda de método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin

Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 suplemento)).

5 Los ejemplos preferentes de algoritmos que son adecuados para determinar la identidad secuencial porcentual y similitud secuencial incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1997) y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros aquí descritos, para determinar la identidad secuencial porcentual para los ácidos nucleicos y proteínas. El software para realizar los análisis BLAST está públicamente disponibles a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo incluye primero identificar pares de secuencias con alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen algunas de las puntuaciones T del umbral con valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., supra). Estos resultados de palabra inicial vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. Los resultados de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en tanto que pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulativo. Los resultados acumulativos se calculan usando, por ejemplo, secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación sanción para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados de palabra en cada dirección se paran cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo descendiendo por la cantidad X de su máximo valor conseguido; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el final de la secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como estándares una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas facetas. Para secuencias de aminoácido, el programa BLASTP usa como una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas facetas.

30 El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la mínima probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótido o aminoácido ocurrirá por casualidad. Por ejemplo, se considera que un péptido es similar a una secuencia referencia si la mínima probabilidad de suma en una comparación del péptido de prueba con el péptido de referencia es menos que aproximadamente 0,2, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01, y más preferentemente menos de aproximadamente 0,001. Los valores log pueden ser números muy negativos, por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 40, 70, 90, 110, 150, 170, etc.

#### 40 Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a un antagonista de Sost para su uso en métodos para promover el crecimiento óseo local en mamíferos usando materiales que antagonizan con proteínas de Sost. Los antagonistas adecuados pueden proporcionarse bloqueando anticuerpos. Los anticuerpos más preferibles son anticuerpos monoclonales y/o humanizados. El antagonista funciona a través de LRP5 o LRP6. El antagonista puede co-administrarse o administrarse en serie con un fármaco antirresortivo si se desea para incrementar o adelantar la formación ósea. Por ejemplo, el fármaco antirresortivo puede ser un bifosfonato (por ejemplo, fosamax, actonel), un PTH o análogo (por ejemplo, Forteo), calcitonina o análogo (por ejemplo, Miacalcic), Vitamina D o análogo, SERM o análogo (por ejemplo, Evista).

50 Estos anticuerpos bloqueadores que reconocen Sost pueden hacerse fácilmente por aquellos expertos en la técnica mediante técnicas convencionales. Preferentemente, estos anticuerpos serán fragmentos FAB o anticuerpos monoclonales, y más preferentemente los fragmentos FAB o los anticuerpos monoclonales se humanizarán. Los anticuerpos monoclonales humanizados se han creado por Amgen, por ejemplo. El Instituto Stowers también proporciona anticuerpos bloqueadores adecuados designados 4G10, 4B9 y 6E6. Otro anticuerpo bloqueador adecuado es 1A12 disponible comercialmente en Abcam.

60 La presente divulgación está dirigida a métodos para reducir huesos en mamíferos que usan materiales que agonizan proteínas de Sost o Wise, administrando a un mamífero un péptido que reconoce cualquiera de las SEQ ID Nos: 1-23. Los péptidos para tratar enfermedad de baja masa ósea sistémica (cuerpo entero) se muestran en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/508.701 y en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040023356.

65 La presente divulgación está dirigida a métodos para proteger riñones de mamíferos de cualquier lesión química que provoque daño renal, por ejemplo, glomerulonefritis, administrando a un mamífero un antagonista de Sost o Wise. Tal materia objeto se desvela en las solicitudes 11/508.701 y 11/613.658 y en la publicación 20040023356.

Otros aspectos de la presente divulgación están dirigidos hacia implantes médicos. Tales dispositivos e implantes médicos incluyen, por ejemplo, los dispositivos osteogénicos y métodos de uso de los mismos para reparar defectos de hueso endocondral y osteocondral mostrados en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Números 6190880, 20020169122, 20020187104, 20060252724, 20070172479, 5.344.654, 5.324.819, 5.468.845, 6.949.251, 6.426.332 y 5.656.593.

Estos dispositivos médicos generalmente proporcionan un soporte estructural que tiene una parte implantable preferentemente adaptada para acoplar mecánicamente hueso y/o cartílago como se muestra, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060178752 de Joseph Vaccarino II, et al., publicada el 10 de agosto, 2006. Estos implantes óseos comprenden deseablemente un agente activo sobre al menos una parte de los mismos. Como se muestra en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060188542 de John Dennis Boby, et al., publicada el 24 de agosto, 2006, el agente activo se formula preferentemente para administrarse localmente al implante próximo al hueso de una manera de liberación prolongada o en un programa de liberación en dos fases. En el último caso, una primera fase libera rápidamente una primera cantidad de agente activo, y la segunda fase o fases posteriores liberan una segunda cantidad de agente activo, por lo que se modula la formación ósea estimulada por el agente activo.

Los dispositivos médicos como los implantes óseos presentan partes implantables que tienen antagonistas de Sost que fomentan una formación de huesos más rápida y completa *in situ*. La parte implantable del dispositivo médico puede estar deseablemente al menos parcialmente o totalmente cubierta o impregnada con un antagonista de Sost. Se cree que ayuda producir la parte implantable del dispositivo médico a partir de un material matriz donde puede formarse el hueso, para incrementar su mantenimiento permanente en el mismo. Se cree que esto es deseable para materiales tales como dientes y secciones de injerto óseo artificial, y similares. Alternativamente, cuando las secciones implantables son de soporte y se forman, por ejemplo, con acero inoxidable, estas secciones implantables se forman deseablemente con un revestimiento de antagonista de Sost. En ese caso, es deseable también proporcionar un material conductivo separado de matriz para formar el crecimiento de hueso nuevo.

Las matrices adecuadas incluyen aquellas que comprenden biomateriales compuestos que tienen una estructura de tipo esponja como aquellas que contienen, por ejemplo, fosforina y/o colágeno como se muestra en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos de Takashi Saito N°20060188544, publicada el 24 de agosto, 2006. Tales revestimientos incluyen, por ejemplo, los revestimientos sencillos y multicapa mostrados en solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060204542 de Zongtao Zhang et al, publicada el 14 de septiembre, 2006, así como aquellos de las patentes de Estados Unidos Números 6.949.251, 5.298.852, 5.939.039, y 7.189.263 y pueden hacerse mediante medios convencionales que incluyen los métodos aquí mostrados.

Usag-1 (Wise) puede estar funcionando a través de la secuencia Wnt para su papel en protección renal. Por esta razón y otras, una cantidad terapéutica de un antagonista de Wise puede administrarse a un paciente mamífero que lo necesite para proteger un riñón de daño renal, por ejemplo glomerulonefritis. En particular, es especialmente preferente administrar tales anticuerpos bloqueadores de Wise o Sost para proteger un riñón de un mamífero de agravo externo engendrado de enfermedad o sustancias químicas, como toxinas o terapia con fármacos.

La presente divulgación también contempla agentes que antagonizan el enlace de SOST y/o WISE con sus receptores nativos ("antagonista de SOST"). El antagonista de SOST incluye un peptidomimético, que es una molécula orgánica que imita la estructura de un péptido; o un peptoide como un peptoide vinílico.

La presente divulgación también contempla agentes que agonizan el enlace de SOST y/o WISE con sus receptores nativos ("agonista de SOST"). El agonista de SOST o Wise incluye un peptidomimético, que es una molécula orgánica que imita la estructura de un péptido; o un peptoide como un peptoide vinílico.

La presente invención se refiere a antagonistas de SOST que son anticuerpos de SOST. Los anticuerpos de la invención son preferentemente quiméricos, más preferentemente anticuerpos humanizados, idealmente anticuerpos monoclonales cultivados contra proteínas murinas, más preferentemente SOST murino.

Los anticuerpos antagonistas SOST, WISE o LRP, que incluyen anticuerpos anti-SOST, pueden cultivarse usándose como un inmunógeno, como una proteína de longitud completa sustancialmente purificada, como SOST murino, pero también puede ser una proteína SOST, WISE o LRP de origen humano, de ratón o de otro mamífero. El inmunógeno puede prepararse a partir de fuentes naturales o producirse de manera recombinante, o una parte peptídica de una proteína, que pueden incluir una parte del dominio con nudo de cistina, por ejemplo, un péptido sintético. Un péptido no inmunogénico puede hacer inmunogénico uniendo el hapteno con una molécula transportadora como albúmina de suero bovino (ASB) o hemocianina de lapa californiana (HLC), o expresando la parte peptídica como una proteína de fusión. Varias otras moléculas transportadoras y métodos para unir un hapteno con una molécula transportadora son bien conocidos en la técnica y los describen, por ejemplo, Harlow y Lane (supra, 1988):

Los anticuerpos particularmente útiles para realizar los métodos de la divulgación son los anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente con moléculas LRP, WISE o, más preferentemente, SOST. Los antagonistas de SOST de la invención son particularmente útiles donde se enlazan con SOST con al menos un orden de afinidad de magnitud mayor que con la que se enlazan con otra proteína. Los métodos para crear anticuerpos quiméricos, incluyendo anticuerpos humanizados, se analiza con más detalle más abajo.

#### 1. Producción de anticuerpo recombinante

Los métodos para producir tanto anticuerpos monoclonales como policlonales a partir de proteínas o péptidos identificados son bien conocidos en la técnica. Con el fin de preparar anticuerpos recombinantes quiméricos y humanizados que puedan funcionar como antagonistas de SOST de la presente invención, primero deben aislarse los anticuerpos no humanos que codifican ácido nucleico. Esto se hace típicamente inmunizando un animal, por ejemplo un ratón, con Sost o Wise preparado o un péptido antigénico derivado de los mismos. Típicamente los ratones se inmunizan dos veces intraperitonealmente con aproximadamente 50 microgramos de anticuerpo de proteína por ratón. El suero de los ratones inmunizados puede analizarse para actividad de anticuerpo mediante inmunohistología o inmunocitología en cualquier sistema huésped que exprese tal polipéptido y mediante ELISA con el polipéptido expresado. Para inmunohistología, los anticuerpos activos de la presente invención pueden identificarse usando una inmunoglobulina biotina conjugada anti-ratón seguida de avidina-peroxidasa y un sustrato de peroxidasa cromogénica. Las preparaciones de tales reactivos están comercialmente disponibles; por ejemplo, de Zymad Corp., San Francisco, Calif. Los ratones cuyo suero contiene anticuerpos activos detectables de acuerdo con la invención pueden sacrificarse tres días después y sus bazos se retiran para fusión y producción de hibridoma. Los sobrenadantes positivos de tales hibridomas pueden identificarse usando los ensayos comunes para aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, análisis de electrotransferencia.

Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpo deseadas pueden después aislarse, por ejemplo, usando mRNA de hibridoma y mRNA esplénico como una plantilla para amplificación PCR de los genes de cadena pesada y ligera [Huse, et al., *Science* 246:1276 (1989)]. Los ácidos nucleicos para producir tanto anticuerpos como intracuerpos pueden derivarse de hibridomas monoclonales murinos usando esta técnica [Richardson J. H., et al., *Proc. Natl Acad Sci USA* 92:3137-3141 (1995); Biocca S., et al., *Biochem and Biophys Res Comm*, 197:422-427 (1993) Mhashikar, A. M., et al., *EMBO J* 14:1542-1551 (1995)]. Estos hibridomas proporcionan una fuente fiable de reactivos bien caracterizados para la construcción de anticuerpos y son particularmente útiles una vez que su reactividad de epítipo y afinidad se han caracterizado. El aislamiento de ácidos nucleicos de células aisladas se ha analizado con más detalle en Clackson, T., et al., *Nature* 352:624-628 (1991) (bazo) y Portolano, S., et al., *supra*; Barbas, C. F., et al., *supra*; Marks, J. D., et al., *supra*; Barbas, C. F., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7978-7982 (1991) (linfocitos de sangre periférica humana). Los anticuerpos humanizados óptimamente incluyen al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Se han descrito un número de métodos para producir anticuerpos recombinantes, tanto quiméricos como humanizados. También puede utilizarse la reorganización controlada de dominios de anticuerpo unidos a través de enlaces de disulfuro de proteína para formar anticuerpos quiméricos (Konieczny et al., *Haematologia*, 14(1):95-99, 1981). La tecnología de ADN recombinante también puede utilizarse para construir fusiones de genes entre secuencias de ADN que codifican dominios de cadena ligera y pesada variables de anticuerpo de ratón y dominios de cadena ligera y pesada constantes de anticuerpo humano (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(21):6851-6855, 1984):

Las secuencias de ADN que codifican las partes de enlace de antígeno o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos monoclonales murinos pueden injertarse mediante medios moleculares en secuencias de ADN que codifican las estructuras de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo humano (Jones et al., *Nature*, 321 (6069): 522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332 (6162):323-327, 1988). Los productos recombinantes expresados se llaman anticuerpos "remodelados" o humanizados, y comprenden la estructura de una cadena ligera o pesada de anticuerpo y las partes de reconocimiento de antígeno, CDR, de un anticuerpo monoclonal murino.

Otros métodos para producir anticuerpos humanizados se describen en las patentes de Estados Unidos Números 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; 5.639.641; 5.565.332; 5.733.743; 5.750.078; 502.167; 5.705.154; 5.770.403; 5.698.417; 5.693.493; 5.558.864; 4.935.496; 4.816.567; y 5.530.101.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos humanizados de cadena sencilla para Sost o Wise.

#### 2. Purificación de anticuerpo recombinante

La purificación por afinidad de un grupo de anticuerpos o suero proporciona a un profesional un reactivo más uniforme. Los métodos para enriquecer los inhibidores de granulación de anticuerpo usando matrices de

afinidad de anticuerpos para formar una columna de afinidad son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado (AntibodyShop, c/o Statens Serum Institut, Artillerivej 5, Edificio P2, DK-2300 Copenhagen S). En resumen, una matriz de afinidad de anticuerpo se une a un soporte de afinidad (véase, por ejemplo, Sefarosa CNBR (R) Pharmacia Biotech). Una mezcla que comprende anticuerpos pasa después sobre la matriz de afinidad, a la que se enlazan los anticuerpos. Los anticuerpos enlazados se libean mediante técnicas comunes para aquellos familiarizados con la técnica, produciendo un grupo de anticuerpos concentrados. El grupo de anticuerpos enriquecidos puede después usarse para más estudios inmunológicos, algunos de los cuales aquí se describen a modo de ejemplo.

Otra técnica usa bacteriófago recombinante para producir bibliotecas grandes. Usando el "método fago" (Scott and Smith, Science 249:386-390, 1990; Cwirla, et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:6378-6382, 1990; Devlin et al., Science, 49:404-406, 1990), pueden construirse bibliotecas muy grandes (106 -108 entidades químicas). Una segunda técnica usa principalmente métodos químicos, de los cuales el método Geysen (Geysen et al., Molecular Immunology 23:709-715, 1986; Geysen et al. J. Immunologic Method 102:259-274, 1987; y el método de Fodor et al. (Science 251:767-773, 1991) son ejemplos. Furka et al. (14° Congreso Internacional de Bioquímica, Volume #5, Abstract FR:013, 1988; Furka, Int. J. Peptide Protein Res. 37:487-493, 1991), Houghton (Patente de Estados Unidos N° 4.631.21, presentada en diciembre, 1986) y Rutter et al. (Patente de Estados Unidos N° 5.010.175, presentada el 23 de abril, 1991) describen métodos para producir una mezcla de péptidos que pueden probarse como agonistas o antagonistas.

### 3. Identificación de Antagonistas de Sost

La presente divulgación proporciona métodos para identificar antagonistas de SOST diagnósticos y terapéuticos. Aquí se describen varios métodos ejemplares para identificar tales antagonistas, incluyendo técnicas basadas en células e in vitro. Un método general para identificar antagonistas de SOST incluye la evaluación de los efectos de candidatos antagonistas sobre la deposición ósea bajo condiciones controladas. Preferentemente la deposición ósea se determina usando técnicas micro-CT en animales vivos. Los animales preferentes incluyen roedores, más preferentes son los primates. El fémur y los huesos de las vértebras son particularmente útiles para tal estudio.

En resumen, el animal de la prueba es tratado con una dosis predeterminada de un candidato antagonista de SOST. Un animal control se trata con una solución control, preferentemente una solución tampón u otro transportador.

También se ha descubierto que la implantación exitosa de los factores osteogénicos para formación ósea endocondral requiere la asociación de proteínas con un material transportador adecuado capaz de mantener las proteínas en un sitio in vivo de la aplicación. El transportador debería ser biocompatible, biodegradable in vivo y lo suficientemente poroso como para permitir la infiltración celular.

Las proteínas de esta divulgación, incluyendo fragmentos de las mismas, también pueden usarse para cultivar anticuerpos monoclonales o policlonales capaces de enlazarse específicamente con un epítopo de Sost, Wise o LRP. Estos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, en protocolos de purificación de antagonistas y agonistas de Sost y Wise.

Los antagonistas y agonistas de Sost y Wise son útiles en aplicaciones clínicas junto con un sistema de entrega adecuado o un sistema de soporte (matriz). Como aquí se desvela, la matriz puede combinarse con antagonistas o agonistas para inducir formación ósea endocondral de manera fiable y reproducible en un cuerpo mamífero. La matriz está hecha de partículas de materiales porosos. Los poros pueden tener una dimensión para permitir la migración celular progenitora a la matriz y la posterior diferenciación y proliferación. El tamaño de partícula deberá estar en el rango de 70um-850um, preferentemente 70um-420um, más preferentemente 150um-420um. Puede fabricarse empaquetando y cerrando el material particulado en una forma que abarque el defecto óseo, o de otra manera estructurando como se desee un material que sea biocompatible, y preferentemente biodegradable in vivo para que sirva como un "andamiaje temporal" y sustrato para reclutamiento de células progenitoras migratorias, como una base para su posterior fijación y proliferación. Los materiales matrices útiles comprenden, por ejemplo, colágeno; homopolímeros y copolímeros de ácido glicólico, ácido láctico y ácido butírico, incluyendo derivados de los mismos; y cerámicas, como hidroxiapatita, fosfato tricalcio y otros fosfatos de calcio. Las combinaciones de estos materiales matrices también pueden ser útiles.

Cuando el candidato antagonista de SOST se entrega a un transportador, la solución control es idealmente el transportador ausente del candidato antagonista de SOST. Pueden aplicarse múltiples dosis del candidato antagonista de SOST al animal en prueba, preferentemente después de un programa predeterminado de dosis. El programa de dosis puede ser durante un periodo de días, más preferentemente durante un periodo de semanas.

Una vez que el programa de dosis se ha completado, tanto los animales en prueba como los controles se examinan para determinar el nivel de deposición ósea presente. Esto puede realizarse mediante cualquiera método adecuado, pero se realiza preferentemente en animales vivos usando equipos de rayos X. Los métodos para

examinación miro-CT de hueso en animales son bien conocidos en la técnica. Un candidato antagonista de SOST adecuado para su uso como un antagonista de SOST se identifica anotando la deposición ósea significativa en el animal en prueba cuando se compara con el animal control. Idealmente, la deposición ósea en los huesos en prueba del animal en prueba debería ser al menos 10%, más preferentemente 20%, más preferentemente 30% o 40%, o más deposición ósea que la que está presente en los mismos huesos del animal control. Donde sea necesario, los niveles de deposición ósea pueden calcularse determinando el volumen de deposición ósea presente en cada animal. Los cálculos pueden realizarse construyendo una imagen tridimensional de la deposición ósea y calculando el volumen de la imagen con la ayuda de, por ejemplo, histomorfometría.

En una realización ejemplar, la inyección localizada in situ de un candidato antagonista de SOST, por ejemplo un anticuerpo monoclonal como aquí se describe, puede hacerse en un animal en prueba, con un animal control recibiendo un volumen igual de solución control sin el candidato antagonista de SOST. Deberían administrarse idénticas dosis en una base semanal durante cuatro semanas. La dosis adecuada dependerá de la naturaleza del candidato antagonista particular de SOST que se está probando. A modo de ejemplo, en la dosificación debería anotarse que puede usarse la inyección sistémica, bien intravenosamente, subcutáneamente o intramuscularmente. Para la inyección sistémica de un candidato antagonista de SOST o un antagonista de SOST, la dosis debería ser aproximadamente 5 mg/kg, más preferentemente aproximadamente 15 mg/kg, ventajosamente aproximadamente 50 mg/kg, más ventajosamente aproximadamente 100 mg/kg, aceptablemente aproximadamente 200 mg/kg. La dosificación realizada mediante inhalación nebulizada, gotas de ojos o ingestión oral debería ser en una cantidad suficiente como para producir niveles en sangre del candidato antagonista de SOST similares a los alcanzados usando inyección sistémica. La cantidad de candidato antagonista de SOST que debe administrarse mediante inhalación nebulizada, gotas de ojos o ingestión oral para conseguir esos niveles depende de la naturaleza del sed inhibidor y puede determinarse mediante experimentación rutinaria. Se espera que, para inyección sistémica de los candidatos antagonistas de SOST de anticuerpo monoclonal aquí descritos, los niveles terapéuticos del anticuerpo pueden detectarse en la sangre una semana después de la administración de una dosis de 15 mg/kg.

Los antagonistas de SOST también pueden identificarse usando un proceso conocido como modelado por ordenador o modelado molecular que permite la visualización de la estructura atómica tridimensional de una molécula seleccionada y el diseño racional de nuevos compuestos que interactuarán con la molécula. La construcción tridimensional depende típicamente de datos de análisis cristalográficos con rayos X o representación de imágenes NMR de la molécula seleccionada. La dinámica molecular requiere datos del campo de fuerza. Los sistemas gráficos del ordenador permiten la predicción de cómo un nuevo compuesto se unirá a la molécula diana y permitirá la manipulación experimental de las estructuras del compuesto y molécula diana para especificidad de enlace perfecto. La predicción de qué interacción molécula-compuesto habrá cuando se hagan pequeños cambios en uno o ambos requiere software de mecánica molecular y ordenadores computacionalmente intensivos, normalmente acoplados a interfaces fáciles para el usuario y conducidas por menús entre el programa de diseño molecular y el usuario.

Un ejemplo del sistema de modelado molecular descrito de manera general más arriba consiste en los programas CHARMM y QUANTA, Polygen Corporation, Waltham, Mass. CHARMM realiza las funciones de minimización de energía y dinámica molecular. QUANTA realiza la construcción, el modelado gráfico y el análisis de estructura molecular. QUANTA permite la construcción interactiva, modificación, visualización y análisis del comportamiento de moléculas entre sí.

Un número de artículos revisan el modelado por ordenador de fármacos interactivos con proteínas específicas, como Rotivinen, et. al., *Acta Pharmaceutica Fennica* 97, 159-166 (1988); Ripka, *New Scientist* 54-57 (Jun. 16, 1988); McKinaly y Rossmann, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 111-122 (1989); Perry and Davies, *OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design* pp. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis and Dean, *Proc. R. Soc. Lond.* 236, 25-140 and 141-162 (1989); y, con respecto a un receptor modelo para componentes de ácido nucleico, Askew, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111, 1082-1090 (1989). Askew et al. construyó una nueva forma molecular que permitió que en enlace de hidrógeno y las fuerzas amontonadas aromáticas actuaran simultáneamente. Askew et al. usó triácido de Kemp's (Kemp et al., *J. Org. Chem.* 46:5140-5143 (1981)) donde existe una relación en forma de U (di axial) entre cualquiera de dos funciones de carboxilo. La conversión del triácido a cloruro ácido imida dio un agente acilante que podía unirse por medio de uniones de amida o éster con prácticamente cualquier superficie aromática. La estructura resultante presentó un plano aromático que podría ser aproximadamente paralelo al de los átomos en la función imida; en enlace de hidrógeno y las fuerzas amontonadas convergieron desde direcciones perpendiculares para proporcionar un microambiente complementario con derivados de adenina.

Otros programas de ordenador que investigan y muestra gráficamente sustancias químicas están disponibles en empresas tales como BioDesign, Inc., Pasadena, Calif., Allelix, Inc., Mississauga, Ontario, Canadá, e Hypercube, Inc., Cambridge, Ontario. Aunque estos están diseñados principalmente para aplicaciones a fármacos específicos para proteínas particulares, pueden adaptarse para diseñar fármacos específicos para regiones de ARN, una vez que la región se ha identificado.

4. Investigación de bibliotecas de compuestos

Ya se identifiquen de antagonistas de SOST existentes o de técnicas de modelado molecular, los antagonistas de SOST generalmente deben modificarse más para mejorar su utilidad terapéutica. Esto se hace típicamente creando grandes bibliotecas de compuestos relacionados con el antagonista de SOST, o compuestos sintetizados arbitrariamente, basados alrededor de una estructura núcleo. Con el fin de investigar grandes y/o diversas bibliotecas de candidatos antagonistas de SOST de manera eficiente, es necesario un método de investigación de alto rendimiento para al menos reducir el número de compuestos candidatos que se investigarán usando los ensayos descritos anteriormente. Los métodos de investigación de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca química o peptídica combinatoria que contenga un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (modulador potencial o compuestos de ligando). Tales "bibliotecas químicas combinatorias" o "bibliotecas candidatas" después se investigan en uno o más ensayos, como se describe más abajo, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que sean capaces de promover la deposición ósea. Los compuestos después identificados pueden servir como "compuestos principales" convencionales" o ellos mismos pueden usarse como terapéuticos potenciales o reales.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para investigación de alto rendimiento de candidatos antagonistas de SOST. Las etapas iniciales de estos métodos permiten la identificación eficiente y rápida de miembros de bibliotecas combinatorias que tiene una alta probabilidad de ser antagonistas de SOST. Estas etapas iniciales toman ventaja de la observación de que los antagonistas de SOST también son agentes que se enlazan con LRP o SOST. Cualquier método que determine la habilidad de un miembro de la biblioteca, denominado un candidato de enlace, para enlazarse específicamente con una proteína de SOST, WISE o LRP es adecuado para esta investigación inicial de alto rendimiento. Por ejemplo, pueden utilizarse ensayos de tipo ELISA competitivos y no competitivos conocidos por un experto en la técnica.

Los candidatos de enlace encontrados que se enlazan con una proteína de SOST, WISE o LRP con especificidad aceptable, por ejemplo, con un  $K_a$  para proteína de SOST, WISE o LRP de al menos aproximadamente  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1}$  o mayor, preferentemente  $10^7 \text{ M}^{-1}$  o mayor, más preferentemente  $10^8 \text{ M}^{-1}$  o mayor, y más preferentemente  $10^9 \text{ M}^{-1}$  o mayor, son candidatos antagonistas de SOST y se investigan más, como se ha descrito anteriormente, para determinar su habilidad para promover deposición ósea.

#### 5. Aplicaciones terapéuticas

Los individuos que se tratan usando antagonistas de Sost de la presente invención pueden ser cualquier mamífero. Por ejemplo, el incremento local en huesos puede usarse para curación de fracturas, fusión (artrodesis), reconstrucción ortopédica y reparación periodontal. El incremento sistémico será para el tratamiento de baja masa ósea, esto es, osteoporosis. La reducción ósea se usará para tratar formación ósea heterotópica no deseada, osificación de ligamento longitudinal, osificación durante estenosis cervical u osteosarcoma. Tales individuos incluyen un perro, gato, caballo, vaca o cabra, particularmente un animal comercialmente importante o un animal domesticado, más particularmente un humano.

En uso terapéutico, los antagonistas de SOST generalmente tendrán la forma de una composición farmacéutica que contiene el antagonista y un transportador farmacéuticamente aceptable. Los transportadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones acuosas como solución salina amortiguada fisiológicamente u otros tampones o disolventes o vehículos tales como glicoles, glicerol, aceites como aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables. La selección de un transportador farmacéuticamente aceptable dependerá, en parte, de la naturaleza química del antagonista de SOST, por ejemplo, si el antagonista de SOST es un anticuerpo, un péptido o un no-péptido. Un transportador farmacéuticamente aceptable puede incluir compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar el antagonista de SOST o aumentar su absorción, u otros excipientes que se deseen. Los compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizadores o excipientes. Un experto en la técnica sabrá que la elección de un transportador farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la ruta de administración del antagonista de SOST y de sus características fisio-químicas particulares.

En general, tales transportadores deberían ser no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. Normalmente, la preparación de tales composiciones conlleva la combinación del agente terapéutico con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, maltosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes como EDTA, glutatión y otros estabilizadores y excipientes. La solución salina amortiguada neutral o solución salina mezclada con albúmina de suero no específico son diluyentes apropiados ejemplares.

Los antagonistas de Sost de la presente invención pueden prepararse como una composición farmacéutica para administración mediante una variedad de diferentes rutas. En general, el tipo de transportador seleccionado se basa en el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier manera

apropiada de administración, incluyendo, por ejemplo, administración típica, oral, nasal, intratecal, rectal, vaginal, sublingual o parenteral, incluyendo inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intrametálica o intrauretral. Una composición farmacéutica (por ejemplo, para administración oral o administración mediante inyección) puede tener la forma de un líquido (por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión). Una composición farmacéutica líquida puede incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: diluyentes estériles como agua para inyección, solución salina, solución salina preferentemente fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijados que pueden servir como el medio disolvente o de suspensión, glicoles de polietileno, glicol de propileno u otros disolventes; agentes antibacterianos; antioxidantes; agentes quelantes; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales con múltiples dosis hechos de cristal o plástico. El uso de una solución salina fisiológica es preferente, y una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

El antagonista de la presente invención puede usarse en método que incluyen aplicaciones de antagonistas de SOST en cócteles que incluyen otros medicamentos, por ejemplo, antibióticos, fungicidas y agentes antiinflamatorios. Alternativamente, los métodos pueden comprender dosificación secuencial de un individuo afligido con un antagonista de SOST y uno o más medicamentos adicionales para optimizar el régimen de tratamiento. En tales regímenes optimizados, los medicamentos, incluyendo el inhibidor de granulación, pueden aplicarse en cualquier secuencia y en cualquier combinación.

Los antagonistas de SOST de la presente invención también pueden incluirse en formulaciones de liberación lenta para tratamiento prolongado después de una primera dosis. En una realización, pueden prepararse en forma de microesferas. Las microesferas pueden prepararse como una matriz homogénea de un antagonista de SOST con un material biodegradable de liberación controlada, con medicamentos adicionales opcionales cuando el tratamiento lo requiera. Las microesferas se preparan preferentemente en tamaños adecuados para infiltración y/o inyección, y se inyectan sistémicamente, o directamente en el sitio del tratamiento.

Las formulaciones también son adecuadas para administración en todos los espacios/cavidades del cuerpo, incluyendo aunque sin limitar a, pleura, peritoneo, cráneo, mediastino, pericardio, bursa o bursal, epidural, intratecal, intraocular, intra-articular, intra-discal, intra-medular, periespinal, etc.

Algunas realizaciones de liberación lenta incluyen sustancias poliméricas que son biodegradables y/o se disuelven lentamente. Tales sustancias poliméricas incluyen polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa de bajo y medio peso molecular, carboximetilcelulosa de sodio de enlace cruzado, almidón de carboximetilo, copolímero metacrilato-divinilbenceno de potasio, alcoholes de polivinilo, almidones, derivados de almidón, celulosa microcristalina, etilcelulosa, metilcelulosa y derivados de celulosa,  $\beta$ -ciclodextrina, poli(metil vinil éteres/anhídrido maleico), glucanos, escleroglucanos, mananos, xantanos, ácido alcinico y derivados de los mismos, derivados de dextrina, monoestearato de glicerilo, glicéridos semi-sintéticos, palmitoestearato de glicerilo, behenato de glicerilo, polivinilpirrolidona, gelatina, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearato de sodio, talco, benzoato de sodio, ácido bórico y sílice coloidal.

Los agentes de liberación lenta también pueden incluir adyuvantes tales como almidón, almidón pre-solidificado, manitol de fosfato de calcio, lactosa, sacarosa, glucosa, sorbitol, celulosa microcristalina, gelatina, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, solución de almidón, etilcelulosa, goma arábiga, goma tragacanto, estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice coloidal, monoestearato de glicerilo, aceite de ricino hidrogenado, ceras y glicéridos mono-, bi- y tri-sustituidos. Los agentes de liberación lenta también pueden prepararse como se describe de manera general en WO94/06416.

La cantidad de antagonistas o agonistas de SOST, Wise o LRP administrados a un individuo dependerá, en parte, de la enfermedad y/o extensión de la lesión. Los métodos para determinar una cantidad efectiva de un agente que se administrará para un procedimiento diagnóstico o terapéutico también son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos clínicos de fase I, fase II y fase III. Generalmente, un agente antagonista se administra en una dosis de aproximadamente 0,01 a 200 mg/kg peso del cuerpo cuando se administra sistémicamente, y en una concentración de aproximadamente 0,1-100  $\mu$ M cuando se administra directamente al sitio de la herida. La cantidad total de antagonistas o agonistas de SOST puede administrarse a un sujeto como una dosis única, bien como un bolo o mediante infusión durante un periodo de tiempo relativamente corto, o puede administrarse usando un protocolo de tratamiento fraccionado, donde se administran múltiples dosis durante un periodo de tiempo más prolongado. Un experto en la técnica sabrá que la concentración de un antagonista particular de SOST necesaria para proporcionar una cantidad efectiva a una región o regiones de lesión depende de muchos factores incluyendo la edad y la salud general del sujeto así como la ruta de administración, el número de tratamientos que se administrarán, y la naturaleza del antagonista de SOST, incluyendo si el antagonista de SOST es un anticuerpo, un péptido o una molécula no-péptido. A la vista de estos factores, el experto en la técnica ajustará la dosis particular para obtener una cantidad efectiva para promover de manera efectiva la deposición ósea para fines terapéuticos.

65

**LISTADO SECUENCIAL**

<110> Ellies, Debra L

5 <120> Métodos para promover crecimiento óseo mediante la administración de antagonista de Sost

<130> 3458.100

<160> 23

10

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 11

15

<212> PRT

<213> Humano

<400> 1

20

Asp Thr Gl<sub>y</sub> Thr Asp Arg Ile Gl<sub>u</sub> Val Thr Arg  
1 5 10

25

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Humano

30

<400> 2

35

Gl<sub>u</sub> Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Gl<sub>u</sub> Asn Gl<sub>y</sub> Gl<sub>y</sub> Arg  
1 5 10

40

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Humano

<400> 3

45

His Pro Phe Gl<sub>u</sub> Thr Lys Asp Val Ser Gl<sub>u</sub> Tyr Ser Cys Arg Gl<sub>u</sub> Leu  
1 5 10 15

50

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Humano

55

<400> 4

60

Arg Gl<sub>u</sub> Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser  
1 5 10 15

Ala

65

ES 2 666 650 T3

<210> 5  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Humano  
5  
<400> 5

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

Leu

15  
<210> 6  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Canino  
20  
<400> 6

25 Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg  
1 5 10

30  
<210> 7  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Canino  
<400> 7

35 His Pro Phe Glu Thr Lys Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu Leu  
1 5 10

40  
<210> 8  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Canino  
<400> 8

45 Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser  
1 5 10 15

50 Ala

55  
<210> 9  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Canino  
<400> 9

60 Arg Val Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ala Arg Lys  
1 5 10 15

65 Val

ES 2 666 650 T3

<210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Chimpancé  
 5 <400> 10

10 Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Chimpancé  
 15 <400> 11

20 His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys Arg Glu Leu  
 1 5 10 15

25 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Chimpancé  
 30 <400> 12

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

40 <210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Chimpancé  
 45 <400> 13

50 Leu Cys Pro Gly Gly Ala Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg Leu  
 1 5 10 15

<210> 14  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Humano  
 55 <400> 14

60 Ser Ser Asn Ser Thr Leu Asn Gln Ala Arg Asn Gly Gly Arg  
 1 5 10

65

ES 2 666 650 T3

<210> 15  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Humano  
 <400> 15  
 10 Thr Gly Leu Asp Arg Asn Ser Arg Val Gln Val Gly Cys Arg Glu Leu  
 1 5 10 15  
 <210> 16  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Murino  
 <400> 16  
 20 Thr Gly Leu Asp Arg Asn Thr Arg Val Gln Val Gly Cys Arg Glu Leu  
 1 5 10 15  
 25 <210> 17  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Humano  
 30 <400> 17  
 35 Arg Glu Leu Arg Ser Thr Lys Tyr Ile Ser Asp Gly Gln Cys Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Ile  
 40 <210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Humano  
 45 <400> 18  
 50 Gln Leu Gln Cys Gln Asp Gly Ser Thr Arg Thr Tyr Lys Ile Thr Val  
 1 5 10 15  
 <210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 55 <213> Humano  
 <400> 19  
 60 Pro Leu Lys Glu Leu Val Cys Ala Gly Glu Cys Leu Pro Leu Pro  
 1 5 10 15  
 65

ES 2 666 650 T3

<210> 20  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Humano  
 5  
 <400> 20  
 Gly Thr Lys Tyr Trp Ser Arg Arg Ser Ser Gln Glu Trp Arg  
 1 5 10  
 <210> 21  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Humano  
 15  
 <400> 21  
 Cys Lys Cys Lys Arg Tyr Thr Arg Gln His Asn Glu Ser Ser  
 1 5 10  
 <210> 22  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Humano  
 25  
 <400> 22  
 Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr  
 1 5 10  
 Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp  
 20 25 30  
 Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro  
 35 40 45  
 Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg  
 50 55 60  
 Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser  
 85 90 95  
 Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala  
 100 105 110  
 Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser  
 115 120 125  
 Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val  
 130 135 140  
 Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln  
 165 170 175  
 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly  
 180 185 190  
 Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu  
 195 200 205  
 Leu Glu Asn Ala Tyr  
 210

ES 2 666 650 T3

<210> 23  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Humano  
5  
<400> 23

10

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

**REIVINDICACIONES**

- 5       **1.** Un anticuerpo de Sost, para uso en un método para promover el crecimiento óseo local para curación de fracturas, fusión (artrodesis), reconstrucción ortopédica o reparación periodontal, en un paciente mamífero, donde dicho método comprende la administración de dicho anticuerpo localmente a dicho paciente mamífero junto con una matriz biocompatible o andamiaje conductivo para fijar el crecimiento de hueso nuevo, donde dicha matriz biocompatible comprende un andamiaje que comprende un material seleccionado del grupo consistente en sal de calcio, sulfato de calcio, autoinjerto, hidroxiapatita, hueso desmineralizado, aloinjerto o fosfato tricaclo, donde dicho anticuerpo de Sost es un antagonista que funciona a través de LRP5 o LRP6; y donde dicho anticuerpo de Sost comprende un anticuerpo o fragmento de FAB que se enlaza específicamente con el péptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 22.
- 10
- 15       **2.** El anticuerpo de Sost para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo de Sost comprende un anticuerpo o fragmento de FAB que se enlaza específicamente con un péptido de acuerdo con una de las SEQ ID Nos: 2-13 y 23.
- 20       **3.** El anticuerpo de Sost para uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo de Sost comprende un anticuerpo o fragmento de FAB que se enlaza específicamente con la proteína Sost humana.
- 25       **4.** El anticuerpo de Sost para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, donde dicho anticuerpo o fragmento de FAB es un anticuerpo monoclonal.
- 30       **5.** El anticuerpo de Sost para uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado o fragmento de FAB.
- 35       **6.** El anticuerpo de Sost para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho método comprende además administrar en serie un fármaco antirresortivo seleccionado del grupo consistente en un biofosfonato, un PTH o análogo, calcitonina o análogo, denosumab, un antagonista de Rank, Vitamina D o análogo, y SERM o análogo.