

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 554**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2012 PCT/US2012/049331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13019954**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012 E 12746235 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2739311**

54 Título: **Método para el tratamiento de los defectos de espacio óseo**

30 Prioridad:

04.08.2011 US 201161515191 P

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

11.05.2018

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
Patent Operations M/S 28-2-C One Amgen Center
Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**LI, XIAODONG y
KE, HUA ZHU**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 667 554 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento de los defectos de espacio óseo

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere en general a métodos para utilizar inhibidores de la esclerostina para potenciar la curación de los defectos de espacio óseo.

10 **Antecedentes de la invención**

El tejido óseo de los mamíferos tiene una notable capacidad de regeneración y, por lo tanto, de reparación de lesiones y otros defectos. Por ejemplo, el crecimiento óseo en general es suficiente para provocar la recuperación total de las fracturas más simples y de pequeñas fisuras. Sin embargo, desgraciadamente, hay muchas lesiones, defectos o afecciones donde el crecimiento óseo es inadecuado para alcanzar un resultado aceptable. Por ejemplo, la regeneración ósea generalmente no ocurre en grandes huecos o espacios. Por lo tanto, las fracturas no pueden curarse, a menos que las piezas estén muy próximas. Si se ha perdido una cantidad considerable de tejido óseo como resultado de la lesión, el proceso de curación puede ser incompleto, dando como resultado consecuencias cosméticas y/o mecánicas no deseadas. A menudo esto es lo que sucede con las fracturas no consolidadas o con lesiones óseas que resultan de traumatismos masivos. El crecimiento del tejido también es generalmente inadecuado en los huecos y espacios segmentarios en los huesos, provocado, por ejemplo, por extirpación quirúrgica de tumores o quistes. En otros casos, puede ser deseable estimular el crecimiento óseo donde normalmente no hay hueso, es decir, ectópicamente. La fusión vertebral para aliviar la lumbalgia, donde se induce la fusión de dos o más vértebras, es un ejemplo de formación ósea ectópica deseada.

El documento WO 2009/079471 describe un método para mejorar la curación de fracturas óseas que implica la administración de un inhibidor de la esclerostina. Ominsky et al., describe que la inhibición de la esclerostina por un anticuerpo monoclonal aumenta la cicatrización ósea y mejora la densidad ósea y la resistencia de los huesos no fracturados (Journal Of Bone And Mineral Research, 2011, vol. 26, no. 5, 1012 - 1021). El documento WO 2009/047356 se refiere a anticuerpos contra la esclerostina y a composiciones y métodos de uso de dichos anticuerpos para tratar enfermedades relacionadas con anomalías óseas tales como la osteoporosis. Zhou et al., describen la reparación exitosa de un defecto óseo de tamaño crítico en el fémur de rata con un fijador externo (Tohoku J. Exp. Med., 2009, 219 (2), 115-120).

35 **Sumario de la invención**

En un aspecto, la invención proporciona una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-esclerostina para su uso en un método para tratar un defecto de espacio óseo en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar el anticuerpo al sujeto, opcionalmente a una dosis semanal de 1 mg/kg a 50 mg/kg por semana, en el que el anticuerpo anti-esclerostina se administra durante un período de tratamiento que dura al menos 20 semanas, y en el que el defecto de espacio óseo comprende un espacio entre dos segmentos de hueso de al menos 5 mm. En una realización, el anticuerpo se administra una vez a la semana durante el período de tratamiento. En otra realización, el anticuerpo se administra una vez cada dos semanas durante el período de tratamiento. Como alternativa, el anticuerpo se administra dos veces por semana.

El período de tratamiento puede ser de al menos aproximadamente 5 meses, 21 semanas, 22 semanas, 23 semanas, 24 semanas, 6 meses, 25 semanas, 26 semanas, 27 semanas, 28 semanas, 7 meses, 29 semanas, 30 semanas, 31 semanas o más (p.ej., 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 15 meses, 18 meses o más). En algunas realizaciones, el período de tratamiento es de aproximadamente 20-32 semanas, o aproximadamente 5-8 meses. En algunas realizaciones, el período de tratamiento no es más de aproximadamente 28 semanas. En algunas realizaciones, el período de tratamiento es de aproximadamente 1 año. En algunos casos, el período de tratamiento no es más de aproximadamente 18 meses.

El defecto de espacio óseo para el tratamiento mediante los métodos descritos en la presente memoria incluye cualquier fractura que comprende un espacio entre dos segmentos de hueso (por ejemplo, un espacio que es de al menos 5 mm, al menos aproximadamente 6 mm, al menos aproximadamente 7 mm, al menos aproximadamente 8 mm, al menos aproximadamente 9 mm, o al menos aproximadamente 1 cm o más. Por ejemplo, el espacio es de 5 mm a 1 cm.

Los ejemplos de defectos de espacio óseo incluyen, sin limitarse a, una fractura conminuta, una fractura no consolidada, un defecto esquelético segmentario, defectos óseos creados quirúrgicamente, defectos óseos tratados quirúrgicamente y defectos óseos creados a partir de lesión traumática al hueso o enfermedad (que incluye, sin limitarse a, artritis, extirpación tumoral (resección) o extirpación de la infección). En algunas o en cualquiera de las realizaciones, el defecto de espacio óseo se produce por la extirpación de secciones infectadas de hueso o la extirpación del cáncer del hueso debido a cánceres óseos que incluyen, sin limitarse a, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma y cordoma. En algunas o en cualquiera de las

realizaciones, el defecto de espacio óseo es una deformación del desarrollo, por ejemplo, debido a un defecto genético.

5 En algunas o en cualquiera de las realizaciones, el defecto de espacio óseo se produce por la extirpación de secciones de hueso que contienen un tumor benigno. Los ejemplos de tumores óseos benignos incluyen, sin limitarse a, osteoma, osteoma osteoide, osteoblastoma, osteocondroma, encondroma, fibroma condromixoide, quiste óseo aneurismático, quiste óseo unicameral, displasia fibrosa de hueso y tumor de células gigantes del hueso.

10 El sujeto al que se le administra el anticuerpo anti-esclerostina padece opcionalmente un trastorno relacionado con los huesos que se selecciona del grupo que consiste en acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatómico, síndrome de Marfan, exostosis múltiple hereditaria, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, pseudoartrosis, osteomielitis piogénica, enfermedad periodontal, pérdida ósea inducida por fármaco anti-epiléptico, hiperparatiroidismo primario y secundario, síndromes de hiperparatiroidismo familiar, pérdida ósea inducida por ingravidez, osteoporosis en hombres, pérdida ósea posmenopáusica, osteoartritis, osteodistrofia renal, trastornos infiltrativos del hueso, pérdida ósea oral, osteonecrosis de la mandíbula, enfermedad de Paget juvenil, melorreostosis, enfermedades óseas metabólicas, mastocitosis, anemia/enfermedad de células falciformes, pérdida ósea relacionada con trasplante de órganos, pérdida ósea relacionada con trasplante de riñón, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, epilepsia, artritis juvenil, talasemia, mucopolisacaridosis, enfermedad de Fabry, síndrome de Turner, síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, lepra, enfermedad de Perthe, escoliosis idiopática del adolescente, enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio en la infancia, síndrome de Winchester, enfermedad de Menkes, enfermedad de Wilson, enfermedad ósea isquémica (tal como, enfermedad de Legg-Calve-Perthes y osteoporosis regional migratoria), estados anémicos, afecciones causadas por esteroides, pérdida ósea inducida por glucocorticoides, pérdida ósea inducida por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, desnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis, osteopenia, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, estado posmenopáusico, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, colitis inflamatoria, enfermedad de Crohn, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, trastornos de la glándula tiroides, trastornos de la glándula paratiroides, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional, osteomalacia, pérdida ósea asociada al reemplazo de articulaciones, pérdida ósea asociada al VIH, pérdida ósea asociada a la pérdida de la hormona del crecimiento, pérdida ósea asociada a la fibrosis quística, pérdida ósea asociada a la quimioterapia, pérdida ósea inducida por tumor, pérdida ósea relacionada con el cáncer, pérdida ósea ablativa hormonal, mieloma múltiple, pérdida ósea inducida por fármaco, anorexia nerviosa, pérdida ósea facial asociada a la enfermedad, pérdida ósea craneal asociada a la enfermedad, pérdida ósea de la mandíbula asociada a la enfermedad, pérdida ósea del cráneo asociada a la enfermedad, pérdida ósea asociada al envejecimiento, pérdida ósea facial asociada al envejecimiento, pérdida ósea craneal asociada al envejecimiento, pérdida ósea de la mandíbula asociada al envejecimiento, pérdida ósea del cráneo asociada al envejecimiento y pérdida ósea asociada a los viajes espaciales. En una realización, el sujeto se ha sometido a cirugía oral o maxilofacial.

40 También se divulga la administración del anticuerpo anti-esclerostina en combinación con el uso de materiales que promueven nuevo crecimiento óseo, tales como injerto óseo, polvo óseo, fragmentos óseos, matriz ósea desmineralizada, andamios óseos, prótesis, estabilizadores metálicos o sustancias de andamios óseos que comprende uno o más de polímeros, materiales cerámicos, cemento y sustitutos de injertos óseos a base de fosfatos de calcio. Se conocen muchas variaciones de tales materiales en la técnica.

45 En algunas o en cualquiera de las realizaciones, el anticuerpo anti-esclerostina se administra junto con un segundo agente terapéutico fortalecedor de los huesos para el tratamiento de la disminución de la densidad mineral ósea o la fractura ósea. Muchos agentes terapéuticos de este tipo son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el agente terapéutico fortalecedor de los huesos se selecciona del grupo que consiste en un fármaco antirresortivo, un agente formador de hueso, un antagonista del receptor de estrógenos (que incluye, pero no se limita a, raloxifeno, bazedoxifeno y lasofoxifeno) y un fármaco que tiene un efecto inhibitorio sobre los osteoclastos. En algunas realizaciones, el fármaco antirresortivo incluye, pero no se limita a, la hormona paratiroidea, un bisfosfonato (que incluye, pero no se limita a, alendronato, risedronato, ibandronato y zoledronato), un estrógeno o análogo de estrógeno, un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM) y una fuente de calcio, tibolona, calcitonina, un calcitriol y terapia de reemplazo hormonal. En algunas realizaciones, el agente fortalecedor óseo incluye, pero no se limita a, la hormona paratiroidea (PTH) o un fragmento peptídico de la misma, proteína relacionada con PTH (PTHrp), proteína morfogenética ósea, osteogenina, NaF, un agonista de PGE₂, una estatina, un anticuerpo o inhibidor anti-DKK1, un anticuerpo anti-ligando RANK (RANKL) o inhibidor de RANKL, ranelato de estroncio, vitamina D o un derivado de vitamina D o imitación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente fortalecedor de los huesos es Forteo® (teriparatida, u hormona paratiroidea humana recombinante 1-34) o Preatact® (hormona paratiroidea). En algunas o en cualquiera de las realizaciones, el agente fortalecedor de los huesos es Protelos®.

50 El uso de anticuerpos anti-esclerostina divulgado en la Publicación de patente de los Estados Unidos N.º 20070110747, por ejemplo, en cualquiera de los métodos divulgados en la presente memoria o para la preparación de medicamentos para la administración de acuerdo con cualquiera de los métodos divulgados en la presente memoria, se contempla específicamente. Una o más dosis del anticuerpo se administran en una cantidad y por un

tiempo efectivo para favorecer la curación del defecto del espacio en el sitio de la fractura. Una o más dosis de anticuerpo pueden comprender entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 miligramos (por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 miligramos), o aproximadamente 1 a aproximadamente 100 miligramos, de anticuerpo por kilogramo de peso corporal (mg/kg). Por ejemplo, la dosis puede variar de al menos

5 aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 26 mg/kg, aproximadamente 27 mg/kg, aproximadamente 28 mg/kg, aproximadamente 29 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 31 mg/kg, aproximadamente 32 mg/kg, aproximadamente 33 mg/kg,

10 aproximadamente 34 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 36 mg/kg, aproximadamente 37 mg/kg, aproximadamente 38 mg/kg, aproximadamente 39 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 41 mg/kg, aproximadamente 42 mg/kg, aproximadamente 43 mg/kg, aproximadamente 44 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 46 mg/kg, aproximadamente 47 mg/kg, aproximadamente 48 mg/kg, aproximadamente 49 mg/kg, o aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, o hasta aproximadamente 100 mg/kg. También se contemplan los intervalos entre cualquiera y todos estos puntos finales, p.ej., aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 a

20 aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/kg, o aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/kg. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra poco después de la fractura (por ejemplo, a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas o 24 horas después de la fractura). En otras realizaciones, el anticuerpo se administra 1 día después de la fractura, en los 3 días siguientes a la fractura, en los 5 días siguientes a la fractura, en los 7 días siguientes a la fractura, en las dos semanas siguientes a la fractura, en el que el anticuerpo se administra durante un período de tiempo que es al menos 11 semanas después de la fractura (p.ej., 11 semanas, 12 semanas, 13 semanas, 14 semanas, 15 semanas, 16 semanas, 17 semanas, 18 semanas, 19 semanas, 20 semanas, 21 semanas, 22 semanas, 23 semanas, 24 semanas, 25 semanas, 26 semanas, 27 semanas, 28 semanas, 29 semanas, 30 semanas, 31 semanas o más (p.ej., 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 18 meses o más)).

También se describe en la presente memoria el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-esclerostina para tratar un defecto de espacio óseo en un sujeto, por ejemplo, en cualquiera de las cantidades descritas anteriormente, tal como de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, en el que una o más administraciones del agente de unión a esclerostina se lleva a cabo durante un período de tratamiento que dura al menos 11 semanas (por ejemplo, cualquiera de los periodos de tiempo descritos anteriormente, tales como 12 semanas, 3 meses, 13 semanas, 14 semanas, 15 semanas, 16 semanas, 4 meses, 17 semanas, 18 semanas, 19 semanas, 20 semanas, 5 meses, 21 semanas, 22 semanas, 23 semanas, 24 semanas, 6 meses, 25 semanas, 26 semanas, 27 semanas, 28 semanas, 7 meses, 29 semanas, 30 semanas, 31 semanas o más (p.ej., 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 15 meses, 18 meses o más)).

El anticuerpo anti-esclerostina también puede usarse en la preparación de un medicamento para la administración a un sujeto con un defecto de espacio óseo usando cualquiera de los regímenes de dosificación y/o posológicos descritos en la presente memoria. Opcionalmente, el anticuerpo se presenta en un recipiente, tal como un vial de una sola dosis o un vial multidosis. La descripción incluye un recipiente que comprende un anticuerpo anti-esclerostina o un fragmento del mismo y las instrucciones para administrar el anticuerpo o fragmento del mismo para tratar un defecto de espacio óseo según cualquiera de los regímenes de dosificación y/o posológicos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-esclerostina para uso en los métodos descritos en la presente memoria se une a esclerostina de SEQ ID NO: 1, con una afinidad (K_d) menor o igual a 1×10^{-7} M (o menor o igual a 1×10^{-8} M, o menor o igual a 1×10^{-9} M, o menor o igual a 1×10^{-10} M, o menor o igual a 1×10^{-11} M, o menor o igual a 1×10^{-12} M).

En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-esclerostina se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 y se une a la secuencia de SEQ ID NO: 6 (CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC; correspondiente a los aminoácidos 86-111 de SEQ ID NO: 1). De manera alternativa o adicional, el anticuerpo anti-esclerostina se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1 y se une a la secuencia de al menos una de SEQ ID NO: 2 (DVSEYSCRELHFTR; correspondiente a los aminoácidos 51 -64 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 3 (SAKPVTELVCSGQCGPAR; correspondiente a los aminoácidos 73-90 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 4 (WWRPSGPDFRCIPDRYR; correspondiente a los aminoácidos 101-117 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 5 (LVASCKCKRLTR; correspondiente a los aminoácidos 138-149 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 70 (SAKPVTELVCSGQC; correspondiente a los aminoácidos 73-86 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 71 (LVASCKC, que corresponde a los aminoácidos 138-144 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 72 (CRELHFTR, que corresponde a los aminoácidos 57-64 de SEQ ID NO: 1) o SEQ ID NO: 73 (CIPDRYR, que corresponde a los aminoácidos 111-117 de SEQ ID NO: 1) dentro de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo anti-esclerostina se une a una

subregión de esclerostina de SEQ ID NO: 1 que comprende SEQ ID NOs: 2-5 (y/o SEQ ID NOs: 70-73), opcionalmente en su conformación tridimensional nativa. Opcionalmente, el anticuerpo anti-esclerostina se une a un péptido que consiste en una o más de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, o SEQ ID NO: 73 (por ejemplo, un péptido que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5 o un péptido que consiste en SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, y SEQ ID NO: 73).

En varios aspectos, el anticuerpo anti-esclerostina es capaz de neutralizar la esclerostina humana en un ensayo de mineralización basado en células MC3T3 cuando hay un exceso de menos de 6 veces de moles de sitios de unión a esclerostina por pocillo en comparación con el número de moles de esclerostina por pocillo.

El anticuerpo anti-esclerostina tiene opcionalmente una CI_{50} de 100 nM o menos, o 75 nM o menos, o 50 nM o menos, o 25 nM o menos para neutralizar la esclerostina humana en un ensayo basado en células, tal como un ensayo de fosfatasa alcalina específica de hueso. De manera alternativa o adicional, el anticuerpo anti-esclerostina tiene una CI_{50} de 100 nM o menos (por ejemplo, 75 nM o menos, o 50 nM o menos) para neutralizar la esclerostina humana en un ensayo de señalización Wnt basado en células en líneas celulares HEK293, como el ensayo Wnt que implica la inducción de gen informador STF mediada por Wnt1. De manera alternativa o adicional, el anticuerpo anti-esclerostina tiene una CI_{50} de 500 nM o menos (por ejemplo, 250 nM o menos, 150 nM o menos, 100 nM o menos, o 50 nM o menos) para neutralizar la esclerostina humana en un ensayo de mineralización inducido por BMP2 en células MC3T3.

En una realización, el anticuerpo anti-esclerostina presenta un efecto de bloqueo cruzado de la unión de al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23, y Ab-24 a la esclerostina y/o sufre un bloqueo cruzado de la unión a esclerostina por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23, y Ab-24. Las secuencias de cadena pesada y ligera de estos anticuerpos se identifican en la Figura 1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-esclerostina comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 245, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 246, una CDR-H3 de SEQ ID NO: 247, una CDR-L1 de SEQ ID NO: 78, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 79 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 80.

En una realización, el anticuerpo anti-esclerostina comprende cadenas pesadas que comprenden la SEQ ID NO: 378 y cadenas ligeras que comprenden la SEQ ID NO: 376. En otra realización, el anticuerpo anti-esclerostina tiene cadenas pesadas de SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 392 y cadenas ligeras de SEQ ID NO: 141.

En otra realización, el anticuerpo anti-esclerostina comprende CDR de SEQ ID NOs: 20-25 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/115732 (SEQ ID NOs: 416-421), CDR de SEQ ID NOs: 26-31 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/115732 (SEQ ID NOs: 422-427), CDR de SEQ ID NOs: 32-37 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/115732 (SEQ ID NOs: 428-433) o CDR de SEQ ID NOs: 4, 15, 26, 37, 48 y 59 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2009/047356 (SEQ ID NOs: 443, 454, 465, 476, 487 y 498, respectivamente). En otra realización más, el anticuerpo anti-esclerostina comprende una secuencia de aminoácidos de al menos una de las SEQ ID NOs: 135-143, 153-161 o 171-179 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2010/130830 (SEQ ID NOs: 745-753, 763-771, 781-789, respectivamente).

El resumen anterior no pretende definir cada aspecto de la invención, y los aspectos adicionales se describen en otras secciones, tales como la Descripción detallada. Se pretende que todo el documento se relacione como una divulgación unificada, y se debe entender que se contemplan todas las combinaciones de las características descritas en la presente memoria, incluso si la combinación de características no se encuentran juntas en la misma oración, párrafo o sección de este documento. Con respecto a los aspectos de la invención descritos o reivindicados con “un” o “una”, debe entenderse que estos términos significan “uno o más” a menos que el contexto requiera inequívocamente un significado más restringido. Debe entenderse que el término “o” abarca elementos alternativos o en conjunto, a menos que el contexto requiera lo contrario de otra manera. Si los aspectos de la invención se describen como “que comprenden” una característica, las realizaciones también se contemplan “que consisten en” o “que consisten esencialmente en” la característica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un cuadro que enumera las secuencias de aminoácidos y los identificadores de secuencias para las secuencias de aminoácidos de varios anticuerpos anti-esclerostina descritos en la presente memoria. Los identificadores de secuencia se refieren a las secuencias de aminoácidos proporcionadas en el Listado de secuencias presentado junto a la presente. Las secuencias de aminoácidos también se establecen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2007/0110747 o en la Publicación de Patente Internacional números WO 2008/115732, WO 2009/047356 o WO 2010/130830.

Las Figuras 2A y 2B proporcionan gráficos que ilustran que la administración del anticuerpo anti-esclerostina dio como resultado un aumento del área cortical y del espesor cortical en la diáfisis femoral de monos cinomolgos sanos después de 28 semanas de tratamiento, en comparación con los animales que no recibieron el tratamiento con anticuerpos.

Las Figuras 3A y 3B proporcionan gráficos que ilustran que la administración del anticuerpo anti-esclerostina dio como resultado un aumento del índice de formación de huesos periósticos y endocorticales en la diáfisis femoral de monos cinomolgos sanos después de 28 semanas de tratamiento, en comparación con los animales que no recibieron el tratamiento con anticuerpos.

La Figura 4 proporciona un gráfico que ilustra que la administración del anticuerpo anti-esclerostina no aumentó considerablemente la porosidad cortical en la diáfisis femoral de monos cinomolgos después de 28 semanas de tratamiento, en comparación con los animales que no recibieron el tratamiento con anticuerpos.

15 Descripción detallada de la invención

La invención se basa, al menos parcialmente, en el descubrimiento de que los inhibidores de la esclerostina potencian la curación de los defectos de espacio óseo. En este sentido, la invención proporciona un método para tratar un defecto esquelético segmentario o una fractura no consolidada. El tratamiento comprende la administración a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) de una o más dosis de un anticuerpo anti-esclerostina durante un período de tratamiento de al menos 20 semanas. Los materiales y métodos de la invención son superiores a las terapias existentes cuya eficacia terapéutica es limitada y requieren un mayor tiempo de recuperación.

Las expresiones “defecto de espacio óseo” y “defecto esquelético segmentario” se usan en la presente memoria como sinónimos y se refieren a un espacio entre dos segmentos del hueso de al menos 5 mm.

La administración del anticuerpo anti-esclerostina potencia o acelera la curación del defecto de espacio óseo, “tratando” así el defecto de espacio óseo. “Potenciar” la curación del hueso significa mediar un nivel de curación del hueso más allá (es decir, superior) del nivel de curación del hueso experimentado por los sujetos (por ejemplo, mamíferos, tales como humanos) a quienes no se les administró el anticuerpo (es decir, sujetos de control). La curación del hueso se pone de manifiesto, por ejemplo, mediante unión de puente, mayor volumen óseo, mayor contenido mineral óseo y densidad dentro del espacio de la fractura (es decir, formación del hueso que forma un puente), callo óseo maduro, mayor resistencia de los huesos (acompañada opcionalmente por un nivel aceptable en términos médicos de rigidez de los huesos) o mejora del uso por parte del paciente del área afectada. “Mejora” significa un aumento o disminución (según se desee) en el parámetro medido. El aumento puede ser el retorno, total o parcial, del parámetro medido al nivel de referencia (por ejemplo, el nivel anterior al defecto de espacio óseo), a los valores proporcionados en las bases de datos normativas utilizadas en la técnica, o al nivel funcional contralateral (por ejemplo, retorno, total o parcial, a las capacidades funcionales de, por ejemplo, el miembro contralateral). En algunos casos, el aumento puede ser una mejora más allá del nivel de referencia. Si se desea, los parámetros medidos en los pacientes a los que se les administró una o más dosis del anticuerpo anti-esclerostina se pueden comparar con los mismos parámetros en pacientes con fractura (opcionalmente con coincidencia de edad y género) a los que no se les administra el anticuerpo anti-esclerostina para analizar además la eficacia de los métodos descritos en la presente memoria.

La formación del hueso puenteado, contenido mineral óseo y densidad ósea y/o callo óseo maduro en el sitio del defecto óseo se puede medir mediante radiografía (por ejemplo, densitometría radiográfica), densitometría de rayos X de energía única y/o dual, tomografía computarizada cuantitativa (QCT), ultrasonografía, radiografía (por ejemplo, densitometría radiográfica) y resonancia magnética. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-esclerostina se puede administrar a una dosis y durante un período de tiempo eficaz para aumentar la formación de puenteo de huesos, formación de callo óseo o densidad (o volumen) ósea en el sitio del defecto de al menos aproximadamente 5 % (aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, o aproximadamente 9 %). En algunas realizaciones, la formación de puenteo de huesos, formación de callo óseo o densidad ósea en el sitio del defecto aumenta en al menos aproximadamente 10 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 12 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 18 %, al menos aproximadamente 20 %, o al menos aproximadamente 22 %). En otras realizaciones, la formación de puenteo de huesos, formación de callo óseo o densidad ósea en el sitio del defecto aumenta mediante el anticuerpo en al menos aproximadamente 25 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 26 % o al menos aproximadamente 28 %). En otras realizaciones más, la formación de puenteo de huesos, formación de callo óseo o densidad ósea en el sitio del defecto aumenta en al menos aproximadamente 30 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 32 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 38 %, o al menos aproximadamente 40 %), o al menos aproximadamente 50 %, (por ejemplo, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, o aproximadamente 100 %). El aumento o restablecimiento de la formación de puenteo óseo se puede determinar 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas después de la administración inicial del anticuerpo. De manera alternativa, el nivel de densidad ósea se puede determinar después de que termina el período de tratamiento (por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas

o 4 semanas después de finalizar el período de tratamiento). En un aspecto, el método reduce la cantidad de tiempo requerida para establecer un nivel deseado de formación ósea, volumen óseo, callo óseo o densidad ósea (por ejemplo, cualquier aumento de porcentaje de la formación ósea, densidad mineral ósea, callo óseo o volumen óseo descritos en la presente memoria), en comparación con los pacientes con coincidencia de edad y género que no reciben el anticuerpo, reduciendo así el tiempo de recuperación para un sujeto. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo reduce la cantidad de tiempo requerida para aumentar la densidad o el volumen óseo en el sitio del defecto en al menos aproximadamente 10 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 % o al menos aproximadamente 50 %).

Los parámetros funcionales de calidad de vida que indican la curación del hueso incluyen, sin limitarse a, recuperación de la fuerza y capacidad de soporte de carga, disminución del dolor y uso de medicación para el dolor y mejora del estado ocupacional. La administración de una o más dosis del anticuerpo, como se describe en la presente memoria, acelera la mejora de los parámetros funcionales de calidad de vida asociados con las fracturas de manera estadísticamente significativa en la población de pacientes analizada. En determinados aspectos, el método reduce el tiempo de recuperación en el paciente al que se le administra una o más dosis de anticuerpo en al menos 10 % (por ejemplo, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, o al menos 65 %), en comparación con el tiempo de recuperación de los pacientes que no reciben el anticuerpo. La "recuperación" se puede estimar usando cualquiera de varias mediciones de resultados de rehabilitación, tal como la puntuación motora del instrumento de FIM para las fracturas de cadera (Munin et al., Arch. Phys. Med. Rehabil., 86:367-372 (2005)), la escala de tobillo de Olerud-Molander (OMAS) y el cuestionario SF-12 para la fractura de tobillo (Shah et al., Injury, 38 (11):1308-1312 (2003)) y la escala de la Knee Society para la artroplastia de rodilla (Insall et al., Clinical Orthopaedics, 248:13-14 10 (1989)).

En algunas realizaciones, una o más dosis de un anticuerpo anti-esclerostina se administran a un ser humano durante un periodo de tratamiento que comprende 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31 semanas, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 18 meses o más. Un "período de tratamiento" comienza tras la administración de una primera dosis de anticuerpo anti-esclerostina y finaliza después de la administración de una dosis final del anticuerpo. Se puede administrar una dosis de anticuerpo varias veces a la semana, si se desea. En algunas realizaciones, el periodo de tratamiento dura 28 semanas. En otras realizaciones, el período de tratamiento dura 1 año. De manera alternativa o adicional, el período de tratamiento no dura más de 18 meses. De hecho, una o más administraciones de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo se pueden llevar a cabo durante un período terapéutico o de tratamiento que dura hasta 18 meses, menos de 1 año, hasta 8 meses o hasta 28 semanas. En una realización, el período de tratamiento es de aproximadamente 28 semanas y proporciona una mejora significativa en los parámetros de curación, tales como (sin limitarse a) formación del hueso, resistencia del hueso (por ejemplo, capacidad máxima de soporte de carga antes de experimentar dolor), volumen óseo, sin aumento considerable de la porosidad cortical, función de puenteo de miembros y/o tiempo de recuperación, en comparación con las fracturas no tratadas. Además, en un aspecto, el período de tratamiento comienza justo después de haberse detectado un defecto del espacio óseo, por ejemplo, a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas o 24 horas a partir de la detección del defecto. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra 1 día después, en los 3 días siguientes del defecto óseo, en los 5 días siguientes del defecto óseo, en los 7 días siguientes del defecto óseo o en las dos semanas siguientes del defecto óseo, en el que el agente de unión a esclerostina se administra durante un período de tiempo que es de al menos 11 semanas a partir de la detección del defecto óseo (por ejemplo, 11 semanas, 12 semanas, 13 semanas, 14 semanas, 15 semanas, 16 semanas, 17 semanas, 18 semanas, 19 semanas, 20 semanas, 21 semanas, 22 semanas, 23 semanas, 24 semanas, 25 semanas, 26 semanas, 27 semanas, 28 semanas, 29 semanas, 30 semanas, 31 semanas o más (por ejemplo, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 18 meses o más)).

El anticuerpo anti-esclerostina se administra en una cantidad que promueve, potencia o acelera la curación del defecto de espacio óseo. La dosis del agente de unión a esclerostina que se administra a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano) puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Por ejemplo, la dosis de anticuerpo puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 26 mg/kg, aproximadamente 27 mg/kg, aproximadamente 28 mg/kg, aproximadamente 29 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 31 mg/kg, aproximadamente 32 mg/kg, aproximadamente 33 mg/kg, aproximadamente 34 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 36 mg/kg, aproximadamente 37 mg/kg, aproximadamente 38 mg/kg, aproximadamente 39 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 41 mg/kg, aproximadamente 42 mg/kg, aproximadamente 43 mg/kg, aproximadamente 44 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 46 mg/kg, aproximadamente 47 mg/kg, aproximadamente 48 mg/kg, aproximadamente 49 mg/kg, o aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, o aproximadamente 95 mg/kg, hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Además, puede ser ventajoso administrar múltiples dosis del anticuerpo o espaciar la administración de las dosis, dependiendo del régimen terapéutico que se selecciona para un paciente particular. Por ejemplo, se puede administrar una dosis de anticuerpo cada dos semanas, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a

la semana o más, dependiendo de la gravedad del defecto, la edad y la salud física del paciente, y similares.

En algunas realizaciones, el sujeto con el defecto de espacio padece opcionalmente un trastorno relacionado con los huesos que se selecciona del grupo que consiste en acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, síndrome de Marfan, exostosis múltiple hereditaria, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, pseudoartrosis, osteomielitis piogénica, enfermedad periodontal, pérdida ósea inducida por fármaco anti-epiléptico, hiperparatiroidismo primario y secundario, síndromes de hiperparatiroidismo familiar, pérdida ósea inducida por ingravidez, osteoporosis en hombres, pérdida ósea posmenopáusica, osteoartritis, osteodistrofia renal, trastornos infiltrativos de hueso, pérdida ósea oral, osteonecrosis de la mandíbula, enfermedad de Paget juvenil, melorreostosis, enfermedades óseas metabólicas, mastocitosis, anemia/enfermedad de células falciformes, pérdida ósea relacionada con trasplante de órganos, pérdida ósea relacionada con trasplante de riñón, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, epilepsia, artritis juvenil, talasemia, mucopolisacaridosis, enfermedad de Fabry, síndrome de Turner, síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, lepra, enfermedad de Perthe, escoliosis idiopática del adolescente, enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio en la infancia, síndrome de Winchester, enfermedad de Menkes, enfermedad de Wilson, enfermedad ósea isquémica (tal como, enfermedad de Legg- Calve-Perthes y osteoporosis regional migratoria), estados anémicos, afecciones causadas por esteroides, pérdida ósea inducida por glucocorticoides, pérdida ósea inducida por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, desnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis, osteopenia, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, estado posmenopáusico, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, colitis inflamatoria, enfermedad de Crohn, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, trastornos de la glándula tiroides, trastornos de la glándula paratiroides, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional, osteomalacia, pérdida ósea asociada al reemplazo de articulaciones, pérdida ósea asociada al VIH, pérdida ósea asociada a la pérdida de la hormona del crecimiento, pérdida ósea asociada a la fibrosis quística, pérdida ósea asociada a la quimioterapia, pérdida ósea inducida por tumor, pérdida ósea relacionada con el cáncer, pérdida ósea ablativa hormonal, mieloma múltiple, pérdida ósea inducida por fármaco, anorexia nerviosa, pérdida ósea facial asociada a la enfermedad, pérdida ósea craneal asociada a la enfermedad, pérdida ósea de la mandíbula asociada a la enfermedad, pérdida ósea del cráneo asociada a la enfermedad, pérdida ósea asociada al envejecimiento, pérdida ósea facial asociada al envejecimiento, pérdida ósea craneal asociada al envejecimiento, pérdida ósea de la mandíbula asociada al envejecimiento, pérdida ósea del cráneo asociada al envejecimiento y pérdida ósea asociada a los viajes espaciales.

En algunas realizaciones, el sujeto padece opcionalmente (o ha padecido) un cáncer. El término “cáncer” se refiere a un trastorno proliferativo asociado a la proliferación celular descontrolada, el crecimiento celular descontrolado y la disminución de la muerte celular/apoptosis. El cáncer incluye, sin limitarse a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de tiroides, melanoma, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, y tumores dependientes de hormonas, que incluyen, sin limitarse a, cáncer de colon, tumores cardíacos, cáncer pancreático, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer intestinal, cáncer testicular, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, condrosarcoma, adenoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario, leucemia (que incluye leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, que incluye mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), síndrome mielodisplásico policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no de Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de cadena pesada y tumores sólidos que incluyen, sin limitarse a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de las células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello de útero, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma y menangioma. El término “metástasis” y la expresión “metástasis de cáncer” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a la capacidad de una célula cancerosa de extenderse a otros tejidos. Por ejemplo, “metástasis en el hueso” se refiere a la capacidad de determinados tipos de cáncer que incluyen, sin limitarse a, mama, próstata, pulmón, riñón, tiroides y melanoma, de metastatizar en el hueso.

En algunas realizaciones, el sujeto padece opcionalmente un trastorno osteolítico. La expresión “trastorno osteolítico”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier afección provocada por un aumento en la actividad de los osteoclastos, que son células responsables de la resorción ósea. El término “osteólisis” y la expresión “pérdida de masa ósea osteolítica” se usan indistintamente para referirse a la resorción ósea mediada por osteoclastos o pérdida de masa ósea asociada a un trastorno osteolítico. Los trastornos osteolíticos ocurren en sujetos con una predisposición a desarrollar un trastorno osteolítico, u ocurren en sujetos con una enfermedad que conlleva o contribuye a un trastorno osteolítico al estimular la actividad de los osteoclastos. En algunas

realizaciones, el trastorno osteolítico es la pérdida de masa ósea osteolítica. En otras realizaciones, el trastorno osteolítico es la pérdida de masa ósea osteolítica inducida por metástasis de cáncer. En realizaciones adicionales, el trastorno óseo osteolítico es una enfermedad ósea metabólica, que incluye, sin limitarse a, endocrinopatías (por ejemplo, hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario e hipertiroidismo); deficiencia dietaria, que incluye, sin limitarse a, raquitismo, osteomalacia, escorbuto y desnutrición; osteoporosis; uso de fármacos, que incluyen glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina y alcohol; enfermedad crónica, que incluyen síndromes de malabsorción; insuficiencia renal crónica, que incluye osteodistrofia renal; enfermedad hepática crónica, que incluye osteodistrofia hepática; enfermedad heredada, que incluye osteogénesis imperfecta y homocistinuria; e inflamación ósea asociada a la artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, displasia fibrosa, enfermedad periodontal y enfermedad de Paget.

Las expresiones “pérdida de masa ósea osteolítica inducida por metástasis” y “pérdida de masa ósea osteolítica inducida por metástasis de cáncer” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a osteólisis o pérdida de masa ósea osteolítica provocadas por metástasis de células cancerosas en los huesos. La expresión “activación de osteoclastos inducida por metástasis de cáncer” se usa en la presente memoria para referirse a la capacidad de las células cancerosas que hicieron metástasis en el hueso de inducir la activación de los osteoclastos.

El anticuerpo anti-esclerostina se administra preferiblemente a un sujeto en una composición fisiológicamente aceptable (por ejemplo, farmacéutica), que puede incluir vehículos, excipientes o diluyentes. Cabe destacar que el anticuerpo anti-esclerostina descrito en la presente memoria se puede usar en la preparación de un medicamento para la administración usando cualquiera de los regímenes de dosificación y posológicos divulgados en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento se divulgan en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20050106683. “Fisiológicamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano. Además, la composición administrada a un sujeto puede contener más de un inhibidor de esclerostina (por ejemplo, dos anticuerpos anti-esclerostina, o un anticuerpo anti-esclerostina y un inhibidor de esclerostina químico sintético) o un anticuerpo anti-esclerostina junto con uno o más agentes terapéuticos con distintos mecanismos de acción.

El desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones particulares descritas en la presente memoria en una variedad de regímenes de tratamiento, que incluyen, por ejemplo, administración y formulación subcutánea, oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular son bien conocidos en la técnica y se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747. Por ejemplo, en determinadas circunstancias, sería deseable administrar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-esclerostina por vía subcutánea, parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal. Dichos enfoques son bien conocidos por el experto, algunos de los cuales se describen con más detalle, por ejemplo, en las patentes US-5.543.158, US-5.641.515 y US-5.399.363. Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para el uso inyectable incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles (por ejemplo, véase la patente US-5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida para poder cargarla en una jeringa fácilmente.

En una realización, para la administración parenteral en una solución acuosa, la solución debería estar adecuadamente tamponada si fuera necesario y en primer lugar, el diluyente líquido debería hacerse isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Por ejemplo, se puede disolver una dosificación en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se puede añadir a 1000 ml de fluido de hipodermoclisia o se puede inyectar en el sitio propuesto de la infusión (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª ed., Mack Pub. Co., Easton, PA, pp. 1035-1038 y 1570-1580). Puede producirse alguna variación de la dosificación y la frecuencia de la administración dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando, de la edad, altura, peso y salud general del paciente, y de la existencia de algún efecto secundario. Además, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-esclerostina se puede incluir en envases (por ejemplo, viales), junto con el material de envasado que proporciona instrucciones con respecto al uso de dichas composiciones farmacéuticas. En general, dichas instrucciones incluirán una expresión tangible que describe la concentración de reactivo, así como en determinadas realizaciones, cantidades relativas de ingredientes o diluyentes excipientes (por ejemplo, agua, solución salina o PBS) que pueden ser necesarios para reconstituir la composición farmacéutica.

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar una cantidad de un anticuerpo anti-esclerostina. El anticuerpo inhibe la actividad biológica de la esclerostina en los huesos, según se mide por los cambios en la mineralización de los huesos, densidad ósea, efecto sobre los osteoblastos y/u osteoclastos, marcadores de la formación del hueso, marcadores de la reabsorción ósea, marcadores de la actividad de los osteoblastos y/o marcadores de la actividad de los osteoclastos.

El anticuerpo anti-esclerostina se une específicamente a la esclerostina o a partes de la misma para bloquear o impedir la unión de la esclerostina humana a uno o más ligandos. La esclerostina, el producto del gen SOST, está ausente en la esclerosteosis, una enfermedad esquelética caracterizada por crecimiento excesivo de los huesos y huesos densos fuertes (Brunkow et al., Am. J. Hum. Genet., (58:577-589 (2001); Balemans et al., Hum. Mol. Genet.,

10:537-543 (2001)). La secuencia de aminoácidos de la esclerostina humana ha sido descrita por Brunkow et al., y se divulga en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 como SEQ ID NO: 1. La esclerostina humana recombinante/SOST está comercializada por R&D Systems (Minneapolis, Minn., EE.UU.; 2006, N.º Catálogo 1406-ST- 025). Adicionalmente, la esclerostina de ratón recombinante/SOST está comercializada por R&D Systems (Minneapolis, Minn., EE.UU.; 2006 N.º Catálogo 1589-ST- 025). Los anticuerpos monoclonales de unión a esclerostina de grado de investigación están comercializados por R&D Systems (Minneapolis, Minn., EE.UU.; monoclonal de ratón: 2006 N.º Catálogo MAB1406; monoclonal de rata: 2006 N.º Catálogo MAB1589). Las patentes US-6.395.511 y US-6.803.453, y las Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos N.º 20040009535 y 20050106683 se refieren en general a anticuerpos anti-esclerostina. También se describen ejemplos de anticuerpos anti- esclerostina adecuados para utilizar en el contexto de la invención en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 y 20070072797. Se puede encontrar información adicional con respecto a los materiales y métodos para generar anticuerpos anti-esclerostina en la Publicación de Patente los Estados Unidos N.º 20040158045.

15 El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto, o a un fragmento de unión de este. Un anticuerpo puede comprender una molécula de anticuerpo completo (inmunoglobulina) (que incluye las versiones policlonal, monoclonal, quimérica, humanizada y/o humana con cadenas pesada y/o ligera de longitud completa) o puede comprender un fragmento de unión al antígeno de este. Los fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fab', Fv, Fc y Fd, y se pueden incorporar en anticuerpos de dominio simple (por ejemplo, nanocuerpos), anticuerpos de cadena simple, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology, 23(9):1126-1136 (2005)). Los polipéptidos de anticuerpo, que incluyen monocuerpos de polipéptidos de fibronectina, también se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N.º 6.703.199. Otros polipéptidos de anticuerpo se divulgan en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20050238646. Las patentes US-6.395.511 y US-6.803.453, y las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos N.º 20040009535 y 20050106683 se refieren en general a anticuerpos anti- esclerostina. La secuencia de aminoácidos de la esclerostina humana se establece en la SEQ ID N.º: 1 del listado de secuencias y se proporciona como SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747. La esclerostina también se describe en Brunkow et al., Am. J. Hum. Genet., (68:577-589 (2001); y en Baemans et al., Hum. Mol. Genet., 10:537-543 (2001). Se puede encontrar información adicional con respecto a los materiales y métodos para generar anticuerpos anti-esclerostina en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20040158045.

Un fragmento de anticuerpo puede ser cualquier proteína sintética o modificada genéticamente. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados que consisten en la región variable de la cadena ligera, fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, y moléculas de polipéptido de cadena simple recombinante donde las regiones variables pesadas y ligeras están conectadas mediante un enlazador de péptido (proteínas scFv).

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo. Las CDR (también denominadas "unidades mínimas de reconocimiento" o "región hipervariable") se pueden obtener construyendo polinucleótidos que codifican la CDR de interés. Dichos polinucleótidos se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable usando ARNm de las células que producen anticuerpos como molde (véase, por ejemplo, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," en Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al., (eds.), página 166, Cambridge University Press (1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al., (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc. (1995)).

Los anticuerpos anti-esclerostina pueden unirse a esclerostina de la SEQ ID NO: 1, o una variante de origen natural de la misma, con una afinidad (Kd) de menos de o igual a 1×10^{-7} M, menos de o igual a 1×10^{-8} M, menos de o igual a 1×10^{-9} M, menos de o igual a 1×10^{-10} M, menos de o igual a 1×10^{-11} M o menos de o igual a 1×10^{-12} M. La afinidad se determina usando una variedad de técnicas, un ejemplo de las cuales es un ensayo ELISA de afinidad. En varias realizaciones, la afinidad se determina mediante un ensayo BIAcore. En varias realizaciones, la afinidad se determina mediante un método cinético. En varias realizaciones, la afinidad se determina mediante un método de equilibrio/solución. La Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 contiene una descripción adicional de los ensayos de afinidad adecuados para determinar la afinidad (Kd) de un anticuerpo por la esclerostina.

Los anticuerpos anti-esclerostina para su uso en los métodos descritos en la presente memoria modulan preferiblemente la función de la esclerostina en el ensayo basado en células descrito en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 y/o en el ensayo *in vivo* descrito en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 y/o se unen a uno o más epítopos descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 y/o bloquean de forma cruzada la unión de uno de los anticuerpos descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 y/o son bloqueados de manera cruzada en su unión a esclerostina por uno de los anticuerpos descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º

20070110747.

En algunas o en cualquiera de las realizaciones, el anticuerpo anti-esclerostina se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1 y se une a la secuencia de SEQ ID NO: 6 (CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRC; que corresponde a los aminoácidos 86-111 de SEQ ID NO: 1). De manera alternativa o adicional, el anticuerpo anti-esclerostina se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1 y se une a la secuencia de al menos una de SEQ ID NO: 2 (DVSEYSCRELHFTR; que corresponde a los aminoácidos 51-64 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 3 (SAKPVTELVCSGQCGPAR; que corresponde a los aminoácidos 73-90 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 4 (WWRPSGPDFRCIPDRYR; que corresponde a los aminoácidos 101-117 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 5 (LVASCKCKRLTR; que corresponde a los aminoácidos 138-149 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 70 (SAKPVTELVCSGQC; que corresponde a los aminoácidos 73-86 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 71 (LVASCKC, que corresponde a los aminoácidos 138-144 de SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 72 (C1RELHFTR, que corresponde a los aminoácidos 57-64 de SEQ ID NO: 1), o SEQ ID NO: 73 (CIPDRYR, que corresponde a los aminoácidos 111-117 de SEQ ID NO: 1) dentro de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo anti-esclerostina se une a una subregión de esclerostina de SEQ ID NO: 1 que comprende las SEQ ID NOs: 2-5 (y/o SEQ ID NOs: 70-73), opcionalmente en su conformación tridimensional nativa. Opcionalmente, el anticuerpo anti-esclerostina se une a un péptido que consiste en una o más de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, o SEQ ID NO: 73 (por ejemplo, un péptido que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5 o un péptido que consiste en SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, y SEQ ID NO: 73).

En algunas o en cualquiera de las realizaciones, el anticuerpo anti-esclerostina se une a un polipéptido de esclerostina que tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, en las que SEQ ID NO: 2 y 4 están unidas por un enlace disulfuro en las posiciones de aminoácidos 57 y 111 con referencia a la SEQ ID NO: 1, y las SEQ ID NO: 3 y 5 están unidas por al menos uno de (a) un enlace disulfuro en las posiciones de aminoácidos 82 y 142 con referencia a la SEQ ID NO: 1, y (b) un enlace disulfuro en las posiciones de aminoácidos 86 y 144 con referencia a la SEQ ID NO: 1; el polipéptido puede retener la estructura terciaria de la región polipeptídica correspondiente de la esclerostina humana de la SEQ ID NO: 1. De manera alternativa o adicional, el agente de unión a esclerostina (por ejemplo, anticuerpo anti-esclerostina) se une a un polipéptido que tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73, en las que las SEQ ID NO: 72 y 73 están unidas por un enlace disulfuro en las posiciones de aminoácidos 57 y 111 con referencia a la SEQ ID NO: 1, y las SEQ ID NO: 70 y 71 están unidas por al menos uno de (a) un enlace disulfuro en las posiciones de aminoácidos 82 y 142 con referencia a la SEQ ID NO: 1, y (b) un enlace disulfuro en las posiciones de aminoácidos 86 y 144 con referencia a la SEQ ID NO: 1.

En varios aspectos, el anticuerpo anti-esclerostina es capaz de neutralizar la esclerostina humana en un ensayo de mineralización basado en células MC3T3 cuando hay menos de un exceso molar de 6 veces de sitios de unión a la esclerostina por pocillo en comparación con la cantidad de moles de esclerostina por pocillo. La mineralización mediante células del linaje de osteoblastos en el cultivo, ya sea de células primarias o líneas celulares, se utiliza como un modelo *in vitro* de formación ósea. Un ejemplo de ensayo de mineralización basado en células se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 en, por ejemplo, el Ejemplo 8. Las células MC3T3-E1 (Sudo et al., J. Cell Biol., 96:191-198 (1983)) y los subclones de la línea celular original pueden formar minerales en los cultivos al crecer en la presencia de agentes de diferenciación. Tales subclones incluyen MC3T3-E1-BF (Smith et al., J. Biol. Chem., 215:1992-2001 (2000)). La esclerostina puede inhibir una o más de las secuencias de eventos que llevan a, e incluyen, una deposición mineral (es decir, la esclerostina inhibe la mineralización), tanto para el subclón MC3T3-E1-BF como para las células MC3T3-E1 originales. Los anticuerpos anti-esclerostina que son capaces de neutralizar la actividad inhibitoria de la esclerostina permiten la mineralización del cultivo en la presencia de la esclerostina de modo que haya un aumento estadísticamente significativo en, por ejemplo, el depósito de fosfato de calcio (medido como calcio) en comparación con la cantidad de calcio medido en el grupo de tratamiento solo de esclerostina (es decir, sin anticuerpo).

Cuando se lleva a cabo el ensayo con el propósito de determinar si un anticuerpo anti-esclerostina particular puede neutralizar la esclerostina, la cantidad de esclerostina utilizada en el ensayo es deseablemente la cantidad mínima de esclerostina que causa al menos una reducción de un 70 %, estadísticamente significativa, en el depósito de fosfato de calcio (medido como calcio) en el grupo de solo esclerostina, en comparación con la cantidad de calcio medido en el grupo sin esclerostina. Un anticuerpo neutralizante anti-esclerostina se define como aquel que provoca un aumento estadísticamente significativo en el depósito de fosfato de calcio (medido como calcio) en comparación con la cantidad de calcio medido en el grupo de tratamiento de solo esclerostina (es decir, sin anticuerpo). Para determinar si un anticuerpo anti-esclerostina es neutralizante o no, la cantidad de anticuerpo anti-esclerostina utilizada en el ensayo necesita ser tal que haya un exceso molar de sitio de unión de esclerostina por pocillo en comparación con el número de moles de esclerostina por pocillo. Dependiendo de la potencia del anticuerpo, el exceso que se puede necesitar puede ser de 24, 18, 12, 6, 3, o 1,5 veces, y un experto en la materia está familiarizado con la práctica de rutina de probar más de una concentración del agente de unión (anticuerpo). Por ejemplo, un anticuerpo neutralizante anti-esclerostina muy potente neutralizará la esclerostina cuando haya menos de un exceso molar de 6 veces de sitios de unión a la esclerostina por pocillo en comparación con el número de

moles de esclerostina por pocillo. Un anticuerpo neutralizante anti-esclerostina menos potente neutralizará la esclerostina solo en un exceso de 12, 18 o 24 veces.

El anticuerpo anti-esclerostina tiene opcionalmente una CI_{50} de 100 nM o menos, o 75 nM o menos, o 50 nM o menos, o 25 nM o menos para neutralizar la esclerostina humana en un ensayo basado en células, tal como un ensayo de fosfatasa alcalina específica de hueso, por ejemplo, el ensayo de la fosfatasa alcalina específica de hueso descrito en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/115732 y la patente US-7.744.874. El ensayo de la fosfatasa alcalina específica de hueso se basa en la capacidad de la esclerostina para disminuir los niveles de fosfatasa alcalina estimulado por BMP-4 y Wnt3a en la línea celular murina multipotencial, C2C12. De acuerdo con el documento WO 2008/115732, un anticuerpo neutralizante anti-esclerostina media un aumento dependiente de la dosis de la actividad de la fosfatasa alcalina en este ensayo. Se proporcionan ejemplos de protocolos de los ensayos basados en células en el Ejemplo 1.

De manera alternativa o adicional, el anticuerpo anti-esclerostina tiene una CI_{50} de 100 nM o menos (por ejemplo, 75 nM o menos, o 50 nM o menos) para neutralizar la esclerostina humana en un ensayo de señalización de Wnt basado en células en líneas celulares HEK293, tal como el ensayo Wnt que implica una inducción mediada por Wnt1 del gen indicador STF descrito en, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2009/047356. De manera alternativa o adicional, el anticuerpo anti-esclerostina tiene una CI_{50} de 500 nM o menos (por ejemplo, 250 nM o menos, 150 nM o menos, 100 nM o menos, o 50 nM o menos) para neutralizar la esclerostina humana en un ensayo de mineralización inducida por BMP2 en células MC3T3, tal como el ensayo de mineralización descrito en, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2009/047356. Se proporciona un protocolo de ejemplo en el Ejemplo 1.

Se describen ejemplos de anticuerpos anti-esclerostina adecuados para uso en el contexto de la invención en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747 y 20070072797. En una realización de la invención, el anticuerpo anti-esclerostina bloquea de forma cruzada la unión de al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23, y Ab-24 (todos los cuales están descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 20070110747) a la esclerostina. De manera alternativa o adicional, el anticuerpo anti-esclerostina es bloqueado de forma cruzada en su unión a esclerostina por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 y Ab-24 (todos los cuales están descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747). Los términos "bloqueo cruzado" y "bloqueo de forma cruzada" se usan indistintamente en la presente memoria para indicar la capacidad de un anticuerpo de interferir con la unión de otros anticuerpos a la esclerostina. Se puede determinar el punto hasta el cual un anticuerpo es capaz de interferir con la unión de otro a la esclerostina y por lo tanto, si se puede decir que bloquea de forma cruzada, utilizando ensayos de unión competitiva. En algunos aspectos de la invención, un anticuerpo o fragmento del mismo que bloquea de forma cruzada reduce la unión de la esclerostina de un anticuerpo de referencia entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 100 %, tal como aproximadamente 60 % y aproximadamente 100 %, específicamente entre 70 % y 100 %, y más específicamente entre 80 % y 100 %. Un ensayo cuantitativo particularmente adecuado para detectar usos del bloqueo de forma cruzada utiliza una máquina Biacore que mide el alcance de las interacciones que usan tecnología de resonancia de plasmones superficiales. Otro ensayo de bloqueo cuantitativo adecuado utiliza un enfoque basado en ELISA para medir la competitividad entre anticuerpos en términos de su unión a la esclerostina.

Los ejemplos de anticuerpos anti-esclerostina adecuados y fragmentos de los mismo incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que tienen uno o más de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 específicamente descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747. Al menos una de las regiones de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 puede tener al menos una sustitución de aminoácido, siempre y cuando el anticuerpo retenga la especificidad de unión de la CDR no sustituida. Preferiblemente, el anticuerpo anti-esclerostina es Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23, o Ab-24 de la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747.

Además, el anticuerpo anti-esclerostina puede comprender al menos una secuencia de CDR que tiene al menos un 75 % de identidad (por ejemplo, 100 % de identidad) con una CDR seleccionada de las SEQ ID NOs: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 78, 79, 80, 81, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 351, 352, 353, 358, 359, y 360 proporcionadas en el Listado de Secuencias y divulgadas en la No. 20070110747. Preferiblemente, el anticuerpo anti-esclerostina comprende al menos una secuencia de CDR que tiene al menos un 75 % de identidad con una CDR seleccionada de SEQ ID NOs: 245, 246, 247, 78, 79, 80, 269, 270, 271, 239, 240, y 241, todas las cuales se proporcionan en el Listado de Secuencias y se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747. Como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747, el anticuerpo anti-esclerostina puede comprender:

a) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 54, 55 y 56 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 51, 52 y 53; b) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 60, 61 y 62 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 57, 58 y 59; c) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 48, 49 y 50 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 45, 46 y 47; d) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 42, 43 y 44 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 39, 40 y 41; e) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 275, 276 y 277 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 287, 288 y 289; f) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 278, 279 y 280 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 290, 291 y 292; g) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 78, 79 y 80 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 245, 246 y 247; h) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 81, 99 y 100 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 248, 249 y 250; i) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 101, 102 y 103 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 251, 252 y 253; j) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 104, 105 y 106 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 254, 255 y 256; k) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 107, 108 y 109 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 257, 258 y 259; l) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 110, 111 y 112 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 260, 261 y 262; m) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 281, 282 y 283 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 293, 294 y 295; n) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 113, 114 y 115 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 263, 264 y 265; o) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 284, 285 y 286 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 296, 297 y 298; p) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 116, 237 y 238 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 266, 267 y 268; q) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 239, 240 y 241 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 269, 270 y 271; r) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 242, 243 y 244 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 272, 273 y 274; o s) secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 351, 352 y 353 y secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 358, 359 y 360.

El anticuerpo anti-esclerostina también puede comprender al menos una secuencia de CDR que tiene al menos un 75 % de identidad (por ejemplo, 100 % idéntica) a una CDR seleccionada de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 en la que CDR-H1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 245, CDR-H2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 246, CDR-H3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 247, CDR-L1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 78, CDR-L2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 79 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 80, todas las cuales se proporcionan en el Listado de Secuencias y se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747. El anticuerpo anti-esclerostina, en varios aspectos, comprende dos de las CDR o seis de las CDR. Opcionalmente, el anticuerpo anti-esclerostina comprende cadenas pesadas que comprenden SEQ ID NO: 378 y cadenas ligeras que comprenden SEQ ID NO 376.

El anticuerpo anti-esclerostina también puede comprender al menos una secuencia de CDR que tiene al menos un 75 % de identidad (por ejemplo, 100 % idéntica) a una CDR seleccionada de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 en la que CDR-H1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 269, CDR-H2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 270, CDR-H3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 271, CDR-L1 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 239, CDR-L2 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 240 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en SEQ ID NO 241, todas las cuales se proporcionan en el Listado de Secuencias y se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747. El anticuerpo anti-esclerostina, en diversos aspectos, comprende al menos dos de las CDR o seis de las CDR.

De manera alternativa, el anticuerpo anti-esclerostina puede tener una cadena pesada que comprende H1, H2 y H3 de la CDR y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 137 o una variante de la misma en la que dichas CDR son al menos idénticas en un 75 % (p.ej., 100 % idénticas) a las SEQ ID N.º: 245, 246 y 247, respectivamente, y una cadena ligera que comprende L1, L2 y L3 de la CDR y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 133 o una variante de la misma en la cual dichas CDR son al menos 75 % idénticas (por ejemplo, 100 % idénticas) a la SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente (como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747).

El anticuerpo anti-esclerostina puede tener una cadena pesada que comprende H1, H2 y H3 de la CDR y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 145 o 392 o una variante de la misma en la que dichas CDR son al menos 75 % idénticas (por ej., 100 % idénticas) a la SEQ ID N.º: 245, 246 y 247, respectivamente, y una cadena ligera que comprende L1, L2 y L3 de la CRD y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 141 o una variante de la misma en la que dichas CDR son al menos un 75 % idénticas (por ejemplo, 100 % idénticas) a la SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente (como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747).

El anticuerpo anti-esclerostina puede tener una cadena pesada que comprende H1, H2 y H3 de la CDR y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 335, 331, 345 o 396 o una variante de cualquiera de los anteriores en la que dichas CDR son al menos 75 % (por ejemplo, 100 % idénticas) idénticas a la SEQ ID NO: 269, 270 y 271, respectivamente, y una cadena ligera que comprende L1, L2 y L3 de CRD y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia provista en SEQ ID NO: 334 o 341 o una variante de cualquiera de las anteriores en las que dichas CDR son al menos un 75 % idénticas (por ejemplo, 100 % idénticas) a la SEQ ID NO: 239, 240 y 241, respectivamente (como se describe la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2007011074). Se contemplan todas las combinaciones de las secuencias de cadena pesada y ligera (por ejemplo, cadenas pesadas que comprenden la SEQ ID NO: 335 y cadenas ligeras que comprenden la SEQ ID NO: 334; cadenas pesadas que comprenden la SEQ ID NO: 331 y cadenas ligeras que comprenden la SEQ ID NO: 334 o 341; y cadenas pesadas que comprenden la SEQ ID NO: 345 o 396 y cadenas ligeras que comprenden la SEQ ID

NO: 341).

De manera alternativa, el anticuerpo anti-esclerostina tiene una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 137, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 133; una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 145 o 392, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 141; una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 335, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 334; una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 331, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 341; o una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 345 o 396, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 341 (como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2007011074).

Los ejemplos de anticuerpos anti-esclerostina también incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos anti-esclerostina divulgados en las Publicaciones de Patente Internacional números WO 2008/092894, WO 2008/115732, WO 2009/056634, WO 2009/047356, WO 2010/100200, WO 2010/100179, WO 2010/115932 y WO 2010/130830, tales como un anticuerpo anti-esclerostina que comprende las CDR de SEQ ID NOs: 20-25 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/115732 (SEQ ID NOs: 416-421 en la presente memoria), un anticuerpo anti-esclerostina que comprende las CDR de SEQ ID NOs: 26-31 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/115732 (SEQ ID NOs: 422-427 en la presente memoria), un anticuerpo anti-esclerostina que comprende las CDR de SEQ ID NOs: 32-37 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/115732 (SEQ ID NOs: 428-433 en la presente memoria), un anticuerpo anti-esclerostina que comprende las CDR de SEQ ID NOs: 4, 15, 26, 37, 48 y 59 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2009/047356 (SEQ ID NOs: 443, 454, 465, 476, 487 y 498, respectivamente, en la presente memoria), o un anticuerpo anti-esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos de al menos una de las SEQ ID NOs: 135-143, 153-161, o 171-179 de la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2010/130830 (SEQ ID NOs: 745-753, 763-771, 781-789, respectivamente, en la presente memoria).

La actividad de un anticuerpo anti-esclerostina para su uso en los métodos descritos en la presente memoria se puede medir de varias maneras, incluyendo los métodos descritos anteriormente para detectar aumentos en el contenido mineral óseo o densidad ósea. La capacidad de un anticuerpo anti-esclerostina para modular la masa ósea se puede calcular a partir de pesos corporales o utilizando otros métodos (ver Guinness-Hey, *Metab. Bone Dis. Relat. Res.*, 5:177-181 (1984)). Se utilizan animales y modelos de animales particulares en la técnica para evaluar el efecto de las composiciones farmacéuticas y métodos para, por ejemplo, los parámetros de pérdida ósea, reabsorción ósea, formación ósea, resistencia ósea o mineralización ósea. Ejemplos de tales modelos incluyen el modelo de rata ovariectomizada (Kalu, *Bone and Mineral*, 15:175-192 (1991); Frost y Jee, *Bone and Mineral*, 18:227-236 (1992); y Jee y Yao, *J. Musculoskel. Neuron. Interact.*, 1:193-207 (2001)).

De manera alternativa, un anticuerpo anti-esclerostina se puede seleccionar basándose en su capacidad de modular los niveles de marcador óseo. Los marcadores óseos son productos creados durante el proceso de remodelación ósea y son liberados por los huesos, osteoblastos y/u osteoclastos. Las fluctuaciones en la reabsorción ósea y/o los niveles de "marcadores" de la formación ósea implican cambios en la remodelación/modelación ósea. La Fundación Internacional de la Osteoporosis (IOF) recomienda utilizar marcadores óseos para controlar las terapias de densidad ósea (ver, por ejemplo, Delmas et al., *Osteoporos Int.*, Suppl. 6:S2-17 (2000)). Los marcadores indicativos de la reabsorción ósea (o actividad de los osteoclastos) incluyen, por ejemplo, C-telopéptido (por ejemplo, telopéptido del extremo C terminal del colágeno de tipo 1 (CTX) o C-telopéptido unido a suero), N-telopéptido (telopéptido del extremo N terminal del colágeno de tipo 1 (NTX)), desoxipiridinolina (DPD), piridinolina, hidroxiprolina urinaria, galactosil hidroxilisina y fosfatasa ácida resistente al tartrato (por ejemplo, fosfatasa ácida sérica resistente al tartrato, isoforma 5b). Los marcadores de la formación/mineralización ósea incluyen, sin limitarse a, fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP), péptidos de extensión del procolágeno de tipo I liberados del extremo N y C (PINP, PICP), y osteocalcina (OstCa). Están comercializados varios kits para detectar y cuantificar marcadores en muestras clínicas, tales como orina y sangre.

Se conocen en la técnica varias vías de administración de un anticuerpo anti-esclerostina a un sujeto, y se describen, por ejemplo, en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 20070110747. Por ejemplo, en varias realizaciones, es deseable administrar una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-esclerostina por vía subcutánea, parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal. Dichos enfoques son conocidos por el experto, algunos de los cuales se describen más detalladamente, por ejemplo, en las patentes US-5.543.158, US-5.641.515 y US-5.399.363. Las formas fisiológicamente ilustrativas aceptables (por ejemplo, farmacéuticas) para su uso incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles (por ejemplo, véase la patente US-5.466.468). La forma debe ser estéril y es deseablemente fluida de modo que pueda ser incluida en una jeringa fácilmente (es decir, que no sea excesivamente viscosa como para impedir el paso a través de una jeringa). Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-esclerostina se puede incluir en envases (por ejemplo,

viales o jeringas), junto con el material de envasado que proporciona instrucciones con respecto al uso de dichas composiciones farmacéuticas. En general, dichas instrucciones incluirán una expresión tangible que describe la concentración de reactivo, así como en determinadas realizaciones, cantidades relativas de ingredientes excipientes o diluyentes (por ejemplo, agua, solución salina o PBS) que pueden ser necesarios para reconstituir la composición farmacéutica.

El tratamiento de una patología mediante la combinación de dos o más agentes que se dirigen al mismo patógeno o vía bioquímica a veces tiene como resultado una mayor eficacia y menos efectos secundarios con respecto al uso de la dosis terapéuticamente relevante de cada agente por separado. En algunos casos, la eficacia de la combinación de fármacos es aditiva (la eficacia de la combinación es aproximadamente igual a la suma de los efectos de cada fármaco por separado), pero en otros casos el efecto puede ser sinérgico (la eficacia de la combinación es mayor que la suma de los efectos de cada fármaco administrado por separado). Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "terapia de combinación" significa que los dos componentes se pueden administrar de forma simultánea, por ejemplo, de forma concurrente o en el que uno de los compuestos se administra primero, seguido por el segundo agente, por ejemplo, secuencialmente. El resultado deseado puede ser ya sea un alivio subjetivo de uno o más síntomas o una mejora identificable de forma objetiva en el receptor de la dosificación.

De acuerdo con esta divulgación, el anticuerpo anti-esclerostina se administra en combinación con el uso de materiales que promueven el nuevo crecimiento óseo, tal como injerto óseo, polvo óseo, fragmentos óseos, matriz ósea desmineralizada, andamios óseos, prótesis, estabilizadores metálicos o sustancias de andamios óseos que comprenden uno o más polímeros, materiales cerámicos, cemento y sustitutos de injerto a base de fosfatos de calcio. En la técnica se conocen muchas variaciones de dichos materiales.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-esclerostina se administra junto con un segundo agente terapéutico reforzante óseo, útil para el tratamiento de la disminución de la densidad mineral ósea o defecto óseo. En algunas realizaciones, el agente terapéutico fortalecedor óseo se selecciona del grupo que consiste en un fármaco antirresortivo, un agente formador de huesos, un antagonista receptor de estrógeno (incluyendo, sin limitarse a, raloxifeno, bazedoxifeno y lasofoxifeno) y un fármaco que tiene un efecto inhibidor en los osteoclastos. En algunas realizaciones, el fármaco antirresortivo incluye, sin limitarse a, un bisfosfonato (que incluye, sin limitarse a, alendronato, risedronato, ibandronato y zoledronato), un estrógeno o análogo de estrógeno, un anticuerpo anti-ligando RANK (RANKL) o inhibidor de RANKL, vitamina D o un derivado de la vitamina D o imitador de esta, un modulador del receptor de estrógenos selectivo (SERM) y una fuente de calcio, tibolona, calcitonina, un calcitriol y terapia de reemplazo hormonal. En algunas realizaciones, el agente fortalecedor óseo incluye, sin limitarse a, la hormona paratiroidea (PTH) o un fragmento de péptido de esta, proteína relacionada con la PTH (PTHrp), proteína morfogénica ósea, osteogenina, NaF, un agonista PGE₂, una estatina, ranelato de estroncio, un anticuerpo o inhibidor anti-DKK1. En algunas realizaciones, el agente fortalecedor óseo es Forteo® (teriparatida), Preotact®, o Protelos®.

La invención también se describe en los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna forma.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este Ejemplo describe varios ensayos de neutralización basados en células que son útiles para caracterizar la actividad de neutralización de un anticuerpo anti-esclerostina.

Ensayo de mineralización basado en las células MC3T3 - Se utiliza ácido ascórbico y B-glicerofosfato para inducir la diferenciación de las células MC3T3-E1-BF que conduce a la deposición mineral. Un ejemplo de protocolo de detección, en un formato de 96 pocillos, implica sembrar células en el día 1, seguido de siete cambios de medios durante un período de 12 días, teniendo lugar la mayoría de la deposición mineral en las últimas dieciocho horas. El momento y alcance específico de la deposición mineral puede variar dependiendo, en parte, en el número de lote de suero particular que se utiliza. Los experimentos de control permitirán tener en cuenta tales variables, como es sabido en la técnica de experimentación de cultivo celular generalmente. Para los análisis estadísticos (utilizando MS Excel y JMP) se puede utilizar un ANOVA de 1 vía seguido por la comparación de Dunnett para determinar las diferencias entre los grupos. Las medias del grupo para cada conjunto de datos se consideran significativamente diferentes cuando el valor P es menor que 0,05 ($P < 0,05$).

El cultivo celular para la expansión de las células MC3T3-E1-BF se realiza de la siguiente manera. El cultivo celular se realiza a 37 °C y con CO₂ al 5 %. Se puede generar un banco de células para la búsqueda de la existencia de anticuerpos neutralizantes de esclerostina. Un vial de células MC3T3-E1-BF congeladas se descongeló mediante agitación en un baño de agua a 37 °C. Las células descongeladas se colocan en 10 ml de medio de expansión (Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu) en un tubo de 50 ml y se centrifugan suavemente durante 5 minutos. Las células se vuelven a suspender en 4 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número

de células utilizando azul tripán y un hemacitómetro, se siembran 1×10^6 células en 50 ml de medio Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu en un matraz T175.

5 Cuando este pasaje es confluyente (a los 7 días aproximadamente), las células se tripsinizan con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05 %; EDTA 0,53 mM), se centrifuga suavemente durante 5 minutos y luego se vuelve a suspender en 5 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células utilizando azul tripán y un hemacitómetro, se siembran 1×10^6 células en 50 ml de medio Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu por cada matraz T175. El número de matraces T175 utilizados para la siembra en este punto depende del número total de células disponibles y del número deseado de matraces que se deben llevar al siguiente pasaje.

10 Cuando este pasaje es confluyente (aproximadamente 3-4 días), las células se tripsinizan con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05 %; EDTA 0,53 mM), se centrifugan suavemente durante 5 minutos y luego se vuelve a suspender en 5 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células utilizando azul tripán y un hemacitómetro, se siembran 1×10^6 células en 50 ml de medio de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu por cada matraz T175. El número de matraces T175 utilizados para la siembra en este punto depende del número total de células disponibles y del número deseado de matraces que se deben llevar al siguiente pasaje.

15 Cuando este pasaje es confluyente (aproximadamente 3-4 días), las células se tripsinizan con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05 %; EDTA 0,53 mM), se centrifuga suavemente durante 5 minutos y luego se vuelve a suspender en 5 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células utilizando azul tripán y un hemacitómetro, se siembran 1×10^6 células en 50 ml de medio de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu por cada matraz T175. El número de matraces T175 utilizados para la siembra en este punto depende del número total de células disponibles y del número deseado de matraces que se llevaron al siguiente pasaje. Se congelan células extras a razón de $1-2 \times 10^6$ células vivas/ml en FBS al 90 %/DMSO al 10 %.

20 Cuando este pasaje es confluyente (aproximadamente 3-4 días), las células se tripsinizan con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05 %; EDTA 0,53 mM), se centrifugan suavemente durante 5 minutos y luego se vuelven a suspender en 5 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células utilizando azul tripán y un hemacitómetro, las células se congelan a razón de $1-2 \times 10^6$ células vivas/ml en FBS al 90 %/DMSO al 10 %. Este "pasaje final" de células congeladas es el pasaje utilizado para el ensayo de detección.

25 El cultivo celular para la mineralización de las células MC3T3-E1-BF se realiza de la siguiente manera. El cultivo celular se realiza a 37 °C y con CO₂ al 5 %. Es deseable minimizar la temperatura y el % de fluctuaciones de CO₂ durante el procedimiento de mineralización del cultivo celular. Un número apropiado de viales de "pasaje final" preparados tal como se describe anteriormente se descongelan mediante agitación en un baño de agua a 37 °C. Las células descongeladas se colocan en 10 ml de medio de expansión (Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu) en un tubo de 50 ml y se centrifugan suavemente durante 5 minutos. Las células se vuelven a suspender en 4 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células mediante azul tripán y un hemacitómetro, se siembran 2500 células en 200 microlitros de medio de expansión por pocillo en placas de 96 pocillos cubiertas con colágeno I (Becton Dickinson Labware, N.º cat. 354407).

30 El siguiente es un ejemplo de procedimiento de cultivo celular. Se indica que el día en que se comienzan a sembrar las células en placas es un miércoles. Si se utiliza un día de la semana diferente como día de comienzo, ese día será el día de referencia de la programación diaria para la eliminación y adición de medios durante todo el proceso tal como se indica más adelante. Por ejemplo, si las células se siembran un martes, el medio no debería retirarse y añadirse el primer viernes y sábado, ni en el segundo viernes y sábado. Si se comienza un martes, las placas se preparan para el ensayo de calcio el último domingo. Las células se siembran un miércoles a razón de 2500 células en 200 µl de medio de expansión. El jueves se retira todo el medio de expansión y se añaden 200 µl de medio de diferenciación. El viernes se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación recién preparado. El lunes se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación recién preparado. El martes se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación recién preparado. El miércoles se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación recién preparado. El jueves se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación recién preparado. El viernes se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación recién preparado. Al lunes siguiente se preparan placas para el ensayo de calcio de la siguiente forma: Las placas se lavan una vez con Tris 10 mM, HCl pH 7-8. Se añaden 200 µl de HCl 0,5 N por pocillo mientras se trabaja bajo una campana de extracción. A continuación se congelan las placas a -80 °C. Justo antes de medir el calcio, las placas se congelan-descongelan dos veces, y luego se utiliza la trituración con una pipeta multicanal para dispersar los contenidos de la placa. Luego se deja que los contenidos de la placa se asienten a 4 °C durante 30 minutos, momento en el cual se retira una cantidad apropiada de sobrenadante para medir el calcio, utilizando un kit de calcio comercializado. Un kit de ejemplo y no limitativo es Calcium (CPC) Liquicolor, N.º Cat. 0150-250, Laboratorio Stanbio, Boerne, TX.

35 En este ensayo basado en células, la esclerostina inhibe uno o más de la secuencia de eventos que llevan a e incluyen la deposición mineral (es decir, la esclerostina inhibe la mineralización). Por lo tanto, en los experimentos donde la esclerostina está incluida en el experimento de cultivo celular particular, se añade esclerostina recombinante al medio comenzando el primer jueves y en lo sucesivo cada día de alimentación. En los casos en que

se analiza un anticuerpo anti-esclerostina para ver si puede neutralizar la esclerostina, es decir, si permite la mineralización al neutralizar la capacidad de la esclerostina de inhibir la mineralización, se añade el anticuerpo al medio comenzando el primer jueves y en lo sucesivo cada día de alimentación. El anticuerpo se incuba previamente con la esclerostina recombinante en el medio de diferenciación durante 45-60 minutos a 37 °C y luego este medio se utiliza para alimentar las células.

Anteriormente se ha descrito un protocolo de mineralización de 12 días para las células MC3T3-E1-BF. La mineralización de las células MC3T3-E1 originales se inhibe por la esclerostina recombinante y esta inhibición se bloquea utilizando un anticuerpo neutralizante anti-esclerostina, por ejemplo, un anticuerpo anti-esclerostina que comprende las CDR de la SEQ ID NO: 245-247 y 78-80. El ensayo de neutralización basado en células se describe además en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 7.592.429 en, por ejemplo, el Ejemplo 8.

Ensayo de fosfatasa alcalina específica de hueso - Se describe un ejemplo de ensayo de fosfatasa alcalina específica de hueso 10 en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2008/115732 y en la patente US-7.744.874. El siguiente es un protocolo de ejemplo. Se siembran en placas las células C2C12 (ATCC, CRL 1772) a razón de 3000-5000 células/pocillo en una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos en medio MEM complementado con suero fetal bovino al 5 %. La placa se incuba a 37 °C en CO₂ al 5 % durante la noche. El anticuerpo se diluye en medio acondicionado con Wnt3a 0,5X (preparado tal como se describe en el documento WO 2008/115732) hasta conseguir varias concentraciones finales. Se retira el medio de las células sembradas y se añade una solución de anticuerpo anti-esclerostina-BMP4 premezclado (humano o de mono cinomolgo) (150 µl), lo que proporciona una concentración final de anticuerpo de 30 µg/ml a 0,5 µg/ml, una concentración final de BMP-4 de 25 ng/ml, una concentración de la proteína esclerostina final de 1,0 µg/ml y el medio acondicionado se encuentra a una concentración 0,5X. A continuación se incuba la placa a 37 °C durante 72 horas en CO₂ al 5 %. Se retira el medio de las células, las cuales se lavan una vez con PBS, y se congelan y descongelan tres veces alternando entre -80 °C y 37 °C. La actividad de la fosfatasa alcalina se mide añadiendo sustrato de fosfatasa alcalina (PNPP 1 etapa, Pierce N.º 37621) (150 µl/pocillo). La placa de células se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente, momento en el cual se mide la densidad óptica (OD) a 405 nm para determinar la actividad de la fosfatasa alcalina. Los cálculos de CI₅₀ se pueden realizar utilizando, por ejemplo, el SigmaPlot Regression Wizard con una ecuación de ajuste de 4 parámetros sigmoide.

Ensayo de mineralización de células MC3T3 inducida por BMP2 - Se describe un ejemplo de ensayo de mineralización inducida por BMP2 en células MC3T3 en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2009/047356. Brevemente, las células MC3T3b se siembran en placas de 96 pocillos (por ejemplo, 6 x 10³ células/pocillo o 2 x 10³ células/pocillo) en 100 µl de medio de cultivo de ensayo (medio de cultivo de mantenimiento sin G418) y se incuban durante tres días para alcanzar la confluencia. El medio de cultivo de ensayo se cambia y se añaden los compuestos que se van a analizar con b-glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 µM. Antes de la adición a las células, la esclerostina y un anticuerpo candidato se incuban previamente en una placa separada durante dos horas a temperatura ambiente. A las placas de 96 pocillos del ensayo se les aplica 2,1 o 2,8 nM de BMP-2 (R&D Systems, N.º Cat 355-BM-010) antes de aplicar la mezcla de esclerostina-anticuerpo. Las células se incuban durante 14 días. Al final de la incubación, las células se lavan dos veces con 200 µl de PBS/pocillo, se añaden 50 µl de HCl 0,5 M a cada pocillo, y se congelan las placas a -20 °C durante un mínimo de 24 horas. Las placas se descongelan a temperatura ambiente durante 2 horas para su análisis. Se transfieren diez 10 µl de cada pocillo a una nueva placa y se exponen a una solución de trabajo de calcio (1:5) (200 µl). La densidad óptica se mide después de un periodo de incubación de 5-30 minutos a 595 nm en un lector de microplacas. La absorbancia se traduce en microgramos de calcio de acuerdo con una curva estándar, lo que permite la determinación del grado de mineralización inducida por BMP-2.

Ensayo de señalización de wnt basado en células - Un ejemplo de ensayo de señalización basado en células que emplea la proteína indicadora super top flash (STF) se describe en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2009/047356. Las células HEK293 se transfectan con pcDNA3+ (480 ng); SuperTopFlash (STF) (20 ng); y phRL-CMV (0,5 ng) para pocillos de control y pcDNA-wnt1 (20 ng); pcDNA3+ (460 ng); SuperTopFlash (STF) (20 ng); y phRL-CMV (0,5 ng) para pocillos de tratamiento con Wnt1. Los plásmidos se mezclan 10 con 1,6 µl de lipofectamina 2000 diluida en 50 µl de OptiMEM® y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de su aplicación a las células. Una vez aplicados, las células se incuban a 37 °C durante cinco horas en CO₂ al 5 %.

Los anticuerpos se mezclan previamente con SOST para generar una serie de diluciones. Se prepara un ml de medio para cada dilución, y se añaden 450 µl a cada pocillo luego de quitar la mezcla de transfección. Las células se incuban con las mezclas de anticuerpo-SOST durante 18-20 horas. Al final de la incubación, el medio se retira y se añaden 300 µl de tampón de lisis pasivo 1X (Promega, N.º Cat E194A) para lisar las células. A continuación, se mide la actividad luciferasa utilizando el sistema de luciferasa Dual-Glo (Promega, N.º Cat E2940) con 30 µl de lisados en duplicados. Normalmente se utilizan 30 µl de sustratos de luciferasa Dual-Glo (luciferasa de luciérnaga; para STF) y 30 µl de sustratos de Dual-Glo Stop y Glo (luciferasa de Renilla; para el control de la eficiencia de la transfección). Las señales de luminiscencia se miden con el instrumento Mithras LB940 (Berthold Technologies). Se calcula la relación de las luciferasas de luciérnaga y de Renilla. Los resultados finales se expresan estableciendo el valor de Wnt1 sin SOST como 1. Se proporcionan detalles adicionales del ensayo en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2009/047356.

Ejemplo 2

5 Este Ejemplo ilustra la capacidad de un inhibidor de la esclerostina, concretamente, un anticuerpo monoclonal anti-esclerostina (Scl-Ab), para tratar un defecto de espacio óseo en un sujeto primate. Este ejemplo también ilustra que el tratamiento con un inhibidor de esclerostina, concretamente un anticuerpo monoclonal anti-esclerostina (Scl-Ab), durante un período de 28 semanas aumentó el área y el espesor cortical sin inducir efectos adversos, tales como un aumento de la porosidad cortical en los huesos de los sujetos primates.

10 Se crearon defectos segmentarios (tamaño de espacio de 0,5 cm) en la mitad del cúbito izquierdo en 26 monos cinomolgos (machos, con edades entre 4-4,5 años). Después de la cirugía, el brazo izquierdo se inmoviliza con fibra de vidrio durante todo el período del experimento. Los animales se separaron en dos grupos de tratamiento: Grupo A (n=10) y Grupo B (n=16). Los monos se inyectaron por vía subcutánea semanalmente con un vehículo (Grupo A) o con Scl-Ab (Grupo B), a una dosis de 30 mg/kg, comenzando inmediatamente después de la cirugía y se continuó durante 28 semanas después de la cirugía.

15 El peso corporal del animal se midió en la semana 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20. Las radiografías del brazo izquierdo se tomaron inmediatamente después de la cirugía y en la semana 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 28. Se administró tetraciclina (un marcador óseo), calceína (tinta verde fluorescente que tiñe los tejidos de calcificación) y la alizarina (tinta roja fluorescente que tiñe los tejidos de calcificación) en las semanas 6-7,5, 18-19,5 y 26-27,5 respectivamente. Se analizó el análisis histomorfométrico de la diáfisis de fémur sin fractura después de 28 semanas de tratamiento.

20 En la semana 28, solo 1 de 10 (10 %) de los monos del Grupo A (de control) había puenteado completamente el defecto. Por el contrario, solo 6 de 16 (38 %) de los monos del Grupo B (grupo de tratamiento con Scl-Ab) había puenteado completamente el defecto. Estos resultados muestran que la inhibición de la esclerostina por Scl-mAb puede llenar un vacío o espacio entre segmentos óseos para tratar con éxito un defecto de espacio óseo en seres humanos.

25 Los resultados indicaron que el tratamiento con Scl-Ab aumentó el área d y el espesor cortical en la diáfisis femoral en la semana 28 en los animales de tratamiento. Véanse las Figuras 2A y 2B. Los monos que habían recibido el tratamiento con Scl-mAb también mostraron una mayor tasa de formación ósea endocortical y perióstica. Véanse las Figuras 3A y 3B. Cabe destacar que el tratamiento con el Scl-mAb durante un período de 28 semanas no aumentó de forma considerable la porosidad cortical en la diáfisis femoral en comparación con los monos de control. Véase la Figura 4.

30 Los resultados combinados descritos en este Ejemplo demuestran que el tratamiento con Scl-Ab no solo es útil para el tratamiento de defectos del esqueleto, tales como defectos de espacio óseo, sino también que la administración de Scl-Ab durante un período mayor a 6 meses aumenta la formación ósea y la masa ósea sin producir efectos adversos, tales como un aumento en la porosidad cortical. El aumento de la porosidad cortical se asocia con un mayor riesgo de fracturas y una disminución de la resistencia ósea.

40

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-esclerostina para su uso en un método para tratar un defecto de espacio óseo en un sujeto mamífero, en el que dicho anticuerpo es un inhibidor de esclerostina, comprendiendo dicho método administrar el anticuerpo al sujeto, en el que el anticuerpo anti-esclerostina es administrado durante un período de tratamiento que dura al menos 20 semanas, y en el que el defecto de espacio óseo comprende un espacio entre dos segmentos de hueso de al menos 5 mm.
2. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-esclerostina se administra a una dosis semanal de 1 mg/kg a 50 mg/kg por semana.
3. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de la reivindicación 1, en el que el período de tratamiento dura 28 semanas.
4. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de la reivindicación 1, en el que el defecto de espacio óseo se selecciona del grupo que consiste en una fractura conminuta, una fractura no consolidada, un defecto esquelético segmentario, defectos óseos creados quirúrgicamente, defectos óseos tratados quirúrgicamente y defectos óseos creados a partir de una lesión traumática del hueso o enfermedad (incluida artritis, deformidad del desarrollo, extirpación del tumor (resección) o eliminación de infecciones).
5. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de la reivindicación 4, en el que el defecto de espacio óseo se produce mediante la extirpación de secciones de hueso infectadas o la extirpación de cáncer del hueso.
6. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de la reivindicación 1, en el que el método comprende además administrar un segundo agente terapéutico de refuerzo óseo seleccionado del grupo que consiste en hormona paratiroidea, un bisfosfonato, un anticuerpo anti-RANKL y un anticuerpo anti-DKK-1.
7. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo anti-esclerostina se administra:
- (a) en una cantidad de 30 mg/kg por semana; y/o
 - (b) una vez a la semana durante la duración del período de tratamiento.
8. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el tratamiento con el anticuerpo anti-esclerostina no da como resultado un aumento sustancial de la porosidad cortical en el hueso del sujeto.
9. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo anti-esclerostina se administra por vía subcutánea.
10. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-esclerostina es una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada y una cadena ligera.
11. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo anti-esclerostina es un anticuerpo o fragmento del mismo que demuestra una afinidad de unión por la esclerostina de SEQ ID NO: 1 menor que o igual a 1×10^{-7} M.
12. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el anticuerpo anti-esclerostina se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1, en la que:
- (a) dicho anticuerpo anti-esclerostina se une a la secuencia de SEQ ID NO: 6;
 - (b) dicho anticuerpo anti-esclerostina se une a la secuencia de al menos una de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5; o
 - (c) dicho anticuerpo anti-esclerostina se une a la secuencia de al menos una de SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 73.
13. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el anticuerpo anti-esclerostina bloquea de forma cruzada la unión de al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 y Ab-24 a la esclerostina y/o es bloqueado de forma cruzada en su unión a la esclerostina por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23, y Ab-24, en el que los anticuerpos Ab-A a Ab-D y Ab-1 a Ab-24 tienen las secuencias de cadena pesada y ligera identificadas en la Figura 1.

ES 2 667 554 T3

14. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el anticuerpo anti-esclerostina comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 245, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 246, una CDR-H3 de SEQ ID NO: 247, una CDR-L1 de SEQ ID NO: 78, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 79 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 80.

5 15. El anticuerpo anti-esclerostina para su uso en el método de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo anti-esclerostina:

10 (a) comprende cadenas pesadas que comprenden la SEQ ID NO: 378 y cadenas ligeras que comprenden la SEQ ID NO 376; o
(b) tiene cadenas pesadas de SEQ ID NO: 145 o SEQ ID NO: 392 y cadenas ligeras de SEQ ID NO: 141.

FIGURA 1

Descripción de la secuencia	Secuencia
Ab-A y Ab-1 CDR-L1	QSSQSVYDNNWLA (SEQ ID NO: 54)
Ab-A y Ab-1 CDR-L2	DASDLAS (SEQ ID NO: 55)
Ab-A y Ab-1 CDR-L3	QGAYNDVIYA (SEQ ID NO: 56)
Ab-A y Ab-1 CDR-H1	SYWMN (SEQ ID NO: 51)
Ab-A y Ab-1 CDR-H2	TIDSGGRTDYASWAKG (SEQ ID NO: 52)
Ab-A y Ab-1 CDR-H3	NWNL (SEQ ID NO: 53)
cadena ligera de Ab-A	SEQ ID NO: 23
cadena pesada de Ab-A	SEQ ID NO: 27
región variable de la cad. ligera de Ab-1 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 75
región variable de la cad. pesada de Ab-1 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 77
Ab-B CDR-L1	SASSVSFVD (SEQ ID NO: 60)
Ab-B CDR-L2	RTSNLGF (SEQ ID NO: 61)
Ab-B CDR-L3	QQRSTYPPT (SEQ ID NO: 62)
Ab-B CDR-H1	TSGMGVVG (SEQ ID NO: 57)
Ab-B CDR-H2	HIWWDDVKRYNPVLKS (SEQ ID NO: 58)
Ab-B CDR-H3	EDFDYDEEYYAMDY (SEQ ID NO: 59)
cadena ligera de Ab-B	SEQ ID NO: 31
cadena pesada de Ab-B	SEQ ID NO: 35
Ab-C CDR-L1	KASQSVDYDGD SYMN (SEQ ID NO: 48)
Ab-C CDR-L2	AASNLES (SEQ ID NO: 49)
Ab-C CDR-L3	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 50)
Ab-C CDR-H1	DCYMN (SEQ ID NO: 45)
Ab-C CDR-H2	DINPFNGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 46)
Ab-C CDR-H3	SHYYFDGRVPWDAMDY (SEQ ID NO: 47)
cadena ligera de Ab-C	SEQ ID NO: 15
cadena pesada de Ab-C	SEQ ID NO: 19
Ab-D CDR-L1	QASQGTSINLN (SEQ ID NO: 42)
Ab-D CDR-L2	GSSNLED (SEQ ID NO: 43)
Ab-D CDR-L3	LQHSYLPYT (SEQ ID NO: 44)
Ab-D CDR-H1	DHYMS (SEQ ID NO: 39)
Ab-D CDR-H2	DINPYSGETTYNQKFKG (SEQ ID NO: 40)
Ab-D CDR-H3	DDYDASPFAY (SEQ ID NO: 41)
cadena ligera de Ab-D	SEQ ID NO: 7
cadena pesada de Ab-D	SEQ ID NO: 11
Ab-2 CDR-L1	RASSSVYYMH (SEQ ID NO: 275)
Ab-2 CDR-L2	ATSNLAS (SEQ ID NO: 276)
Ab-2 CDR-L3	QQWSSDPLT (SEQ ID NO: 277)
Ab-2 CDR-H1	DYFIH (SEQ ID NO: 287)
Ab-2 CDR-H2	RLDPEDGESDYAPKFQD (SEQ ID NO: 288)
Ab-2 CDR-H3	EDYDGTYTFFPY (SEQ ID NO: 289)
cadena ligera de Ab-2	SEQ ID NO: 117
cadena pesada de Ab-2	SEQ ID NO: 121

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
Ab-3 y Ab-15 CDR-L1	SVSSTISSNHLH (SEQ ID NO: 278)
Ab-3 y Ab-15 CDR-L2	GTSNLAS (SEQ ID NO: 279)
Ab-3 y Ab-15 CDR-L3	QQWSSYPLT (SEQ ID NO: 280)
Ab-3 y Ab-15 CDR-H1	DFYLLH (SEQ ID NO: 290)
Ab-3 y Ab-15 CDR-H2	RIDPENGDTLYDPKFDQ (SEQ ID NO: 291)
Ab-3 y Ab-15 CDR-H3	EADYFHDGTSYWYFDV (SEQ ID NO: 292)
cadena ligera de Ab-3	SEQ ID NO: 125
cadena pesada de Ab-3	SEQ ID NO: 129
región variable de la cadena ligera de Ab-15	SEQ ID NO: 384
región variable de la cadena pesada de Ab-15	SEQ ID NO: 386
cadena ligera de Ab-15	SEQ ID NO: 221
cadena pesada de Ab-15	SEQ ID NO: 225
Ab-4 y Ab-5 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 78)
Ab-4 y Ab-5 CDR-L2	YTSRLLS (SEQ ID NO: 79)
Ab-4 y Ab-5 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 80)
Ab-4 y Ab-5 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 245)
Ab-4 y Ab-5 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 246)
Ab-4 y Ab-5 CDR-H3	LGYYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 247)
cadena ligera de Ab-4	SEQ ID NO: 133
cadena pesada de Ab-4	SEQ ID NO: 137
región variable de la cadena ligera de Ab-5	SEQ ID NO: 376
región variable de la cadena pesada de Ab-5	SEQ ID NO: 378
cadena ligera de Ab-5	SEQ ID NO: 141
cadena pesada de Ab-5	SEQ ID NO: 145
Ab-6 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 81)
Ab-6 CDR-L2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 99)
Ab-6 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 100)
Ab-6 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 248)
Ab-6 CDR-H2	EINPNSGGSGYNQKFKG (SEQ ID NO: 249)
Ab-6 CDR-H3	LVYDGSYEDWYFDV (SEQ ID NO: 250)
cadena ligera de Ab-6	SEQ ID NO: 149
cadena pesada de Ab-6	SEQ ID NO: 153
Ab-7 CDR-L1	RASQVITNYLY (SEQ ID NO: 101)
Ab-7 CDR-L2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 102)
Ab-7 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 103)
Ab-7 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 251)
Ab-7 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQQFKG (SEQ ID NO: 252)
Ab-7 CDR-H3	LGYYVGNVEDWYFDV (SEQ ID NO: 253)
cadena ligera de Ab-7	SEQ ID NO: 157
cadena pesada de Ab-7	SEQ ID NO: 161
Ab-8 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 104)
Ab-8 CDR-L2	YTSRLLS (SEQ ID NO: 105)
Ab-8 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 106)

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
Ab-8 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 254)
Ab-8 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 255)
Ab-8 CDR-H3	LGYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 256)
cadena ligera de Ab-8	SEQ ID NO: 165
cadena pesada de Ab-8	SEQ ID NO: 169
Ab-9 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 107)
Ab-9 CDR-L2	YTSRLFS (SEQ ID NO: 108)
Ab-9 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 109)
Ab-9 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 257)
Ab-9 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 258)
Ab-9 CDR-H3	LGYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 259)
cadena ligera de Ab-9	SEQ ID NO: 173
cadena pesada de Ab-9	SEQ ID NO: 177
Ab-10 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 110)
Ab-10 CDR-L2	YTSRLLS (SEQ ID NO: 111)
Ab-10 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 112)
Ab-10 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 260)
Ab-10 CDR-H2	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 261)
Ab-10 CDR-H3	LGYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 262)
cadena ligera de Ab-10	SEQ ID NO: 181
cadena pesada de Ab-10	SEQ ID NO: 185
Ab-11 y Ab-16 CDR-L1	RASSSISYIH (SEQ ID NO: 281)
Ab-11 y Ab-16 CDR-L2	ATSNLAS (SEQ ID NO: 282)
Ab-11 y Ab-16 CDR-L3	QQWSSDPLT (SEQ ID NO: 283)
Ab-11 y Ab-16 CDR-H1	DYIYI (SEQ ID NO: 293)
Ab-11 y Ab-16 CDR-H2	RVDPDNGETEFAPKFP (SEQ ID NO: 294)
Ab-11 y Ab-16 CDR-H3	EDYDGTYTWFY (SEQ ID NO: 295)
cadena ligera de Ab-11	SEQ ID NO: 189
cadena pesada de Ab-11	SEQ ID NO: 193
región variable de la cadena ligera de Ab-16	SEQ ID NO: 388
región variable de la cadena pesada de Ab-16	SEQ ID NO: 390
cadena ligera de Ab-16	SEQ ID NO: 229
cadena pesada de Ab-16	SEQ ID NO: 233
Ab-12 CDR-L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 113)
Ab-12 CDR-L2	YTSTLQS (SEQ ID NO: 114)
Ab-12 CDR-L3	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 115)
Ab-12 CDR-H1	DYNMH (SEQ ID NO: 263)
Ab-12 CDR-H2	EINPNSGGSGYNQKFKG (SEQ ID NO: 264)
Ab-12 CDR-H3	LGYYGNYEDWYFDV (SEQ ID NO: 265)
cadena ligera de Ab-12	SEQ ID NO: 197
cadena pesada de Ab-12	SEQ ID NO: 201
Ab-13 y Ab-14 CDR-L1	RASSSVTSSYLN (SEQ ID NO: 284)
Ab-13 y Ab-14 CDR-L2	STSNLAS (SEQ ID NO: 285)

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
Ab-13 y Ab-14 CDR-L3	QQYDFFPST (SEQ ID NO: 286)
Ab-13 y Ab-14 CDR-H1	DYYMN (SEQ ID NO: 296)
Ab-13 y Ab-14 CDR-H2	DINPYNDDTTYNHKFKG (SEQ ID NO: 297)
Ab-13 y Ab-14 CDR-H3	ETAVITTNAMD (SEQ ID NO: 298)
cadena ligera de Ab-13	SEQ ID NO: 205
cadena pesada de Ab-13	SEQ ID NO: 209
región variable de la cadena ligera de Ab-14	SEQ ID NO: 380
región variable de la cadena pesada de Ab-14	SEQ ID NO: 382
cadena ligera de Ab-14	SEQ ID NO: 213
cadena pesada de Ab-14	SEQ ID NO: 217
Ab-17 y Ab-18 CDR-L1	SVSSSISSNLH (SEQ ID NO: 116)
Ab-17 y Ab-18 CDR-L2	GTSNLAS (SEQ ID NO: 237)
Ab-17 y Ab-18 CDR-L3	QQWTTTYT (SEQ ID NO: 238)
Ab-17 y Ab-18 CDR-H1	DYYIH (SEQ ID NO: 266)
Ab-17 y Ab-18 CDR-H2	RIDPDNGESTYVPKFQ (SEQ ID NO: 267)
Ab-17 y Ab-18 CDR-H3	EGLDYGYYAVDY (SEQ ID NO: 268)
región variable de la cad. ligera de Ab-17 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 299
región variable de la cad. pesada de Ab-17 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 301
región variable de la cad. ligera de Ab-18 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 303
región variable de la cad. pesada de Ab-18 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 305
Ab-19, Ab-20 y Ab-23 CDR-L1	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 239)
Ab-19, Ab-20 y Ab-23 CDR-L2	STSR LNS (SEQ ID NO: 240)
Ab-19, Ab-20 y Ab-23 CDR-L3	QQDIKHPT (SEQ ID NO: 241)
Ab-19, Ab-20 y Ab-23 CDR-H1	DYIMH (SEQ ID NO: 269)
Ab-19, Ab-20 y Ab-23 CDR-H2	YINPYNDDTEYNEKFKG (SEQ ID NO: 270)
Ab-19, Ab-20 y Ab-23 CDR-H3	SIYYDAPFAY (SEQ ID NO: 271)
región variable de la cadena ligera de Ab-19	SEQ ID NO: 314
región variable de la cadena pesada de Ab-19	SEQ ID NO: 327
cadena ligera de Ab-19 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 307
cadena pesada de Ab-19 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 309
región variable de la cad. ligera de Ab-20 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 311
región variable de la cad. pesada de Ab-20 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 313
región variable de la cadena ligera de Ab-23	SEQ ID NO: 364
región variable de la cadena pesada de Ab-23	SEQ ID NO: 366
cadena ligera de Ab-23	SEQ ID NO: 341
cadena pesada de Ab-23	SEQ ID NO: 345
Ab-21 y Ab-22 CDR-L1	KASQDVFTAVA (SEQ ID NO: 242)

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
Ab-21 y Ab-22 CDR-L2	WASTRHT (SEQ ID NO: 243)
Ab-21 y Ab-22 CDR-L3	QQYSSYPLT (SEQ ID NO: 244)
Ab-21 y Ab-22 CDR-H1	DYYMH (SEQ ID NO: 272)
Ab-21 y Ab-22 CDR-H2	RIDPENGDIIYDPKFKG (SEQ ID NO: 273)
Ab-21 y Ab-22 CDR-H3	DAGDPAWFTY (SEQ ID NO: 274)
región variable de la cad. ligera de Ab-21 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 315
región variable de la cad. pesada de Ab-21 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 317
región variable de la cadena ligera de Ab-22	SEQ ID NO: 368
región variable de la cadena pesada de Ab-22	SEQ ID NO: 370
Ab-24 CDR-L1	KASQSVDYDGTSYMN (SEQ ID NO: 351)
Ab-24 CDR-L2	AASNLES (SEQ ID NO: 352)
Ab-24 CDR-L3	QQSNEDPFT (SEQ ID NO: 353)
Ab-24 CDR-H1	TYWMN (SEQ ID NO: 358)
Ab-24 CDR-H2	MIHPSASEIRLDQKFKD (SEQ ID NO: 359)
Ab-24 CDR-H3	SGEWGSM DY (SEQ ID NO: 360)
cadena ligera de Ab-24	SEQ ID NO: 350
cadena pesada de Ab-24	SEQ ID NO: 357
CDR SEQ ID NO: 20 de WO 2008/115732	GYTFTDYFLN (SEQ ID NO: 416)
CDR SEQ ID NO: 21 de WO 2008/115732	TIYPYHDGTTYSQKFKG (SEQ ID NO: 417)
CDR SEQ ID NO: 22 de WO 2008/115732	EEEDGQFDY (SEQ ID NO: 418)
CDR SEQ ID NO: 23 de WO 2008/115732	SASQGIQWYLN (SEQ ID NO: 419)
CDR SEQ ID NO: 24 de WO 2008/115732	YTSSLHS (SEQ ID NO: 420)
CDR SEQ ID NO: 25 de WO 2008/115732	QQHSLPRT (SEQ ID NO: 421)
CDR SEQ ID NO: 26 de WO 2008/115732	GFPIKDTFQH (SEQ ID NO: 422)
CDR SEQ ID NO: 27 de WO 2008/115732	WSDPEIGDTEYASKFQG (SEQ ID NO: 423)
CDR SEQ ID NO: 28 de WO 2008/115732	GDTTYKFDF (SEQ ID NO: 424)
CDR SEQ ID NO: 29 de WO 2008/115732	KASQDVHTAVA (SEQ ID NO: 425)
CDR SEQ ID NO: 30 de WO 2008/115732	WASTRWT (SEQ ID NO: 426)
CDR SEQ ID NO: 31 de WO 2008/115732	QQYSDYPWT (SEQ ID NO: 427)
CDR SEQ ID NO: 32 de WO 2008/115732	DFEIKDYIYH (SEQ ID NO: 428)
CDR SEQ ID NO: 33 de WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 429)
CDR SEQ ID NO: 34 de WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 430)
CDR SEQ ID NO: 35 de WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 431)
CDR SEQ ID NO: 36 de WO 2008/115732	STSELAS (SEQ ID NO: 432)
CDR SEQ ID NO: 37 de WO 2008/115732	QQLSHLPLT (SEQ ID NO: 433)
CDR SEQ ID NO: 4 de WO 2009/047356	GFTFRSHWLS (SEQ ID NO: 443)
CDR SEQ ID NO: 15 de WO 2009/047356	WVSNINYDGSSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 454)
CDR SEQ ID NO: 26 de WO 2009/047356	DTYLHFDY (SEQ ID NO: 465)
CDR SEQ ID NO: 37 de WO 2009/047356	SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 476)
CDR SEQ ID NO: 48 de WO 2009/047356	LMIYDVNNRPS (SEQ ID NO: 487)

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
CDR SEQ ID NO: 59 de WO 2009/047356	QSYAGSYLSE (SEQ ID NO: 498)
CDR SEQ ID NO: 135 de WO 2010/130830	DNVMG (SEQ ID NO: 745)
CDR SEQ ID NO: 136 de WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 746)
CDR SEQ ID NO: 137 de WO 2010/130830	RFDMS (SEQ ID NO: 747)
CDR SEQ ID NO: 138 de WO 2010/130830	SYFMG (SEQ ID NO: 748)
CDR SEQ ID NO: 139 de WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 749)
CDR SEQ ID NO: 140 de WO 2010/130830	RYVTG (SEQ ID NO: 750)
CDR SEQ ID NO: 141 de WO 2010/130830	SFVIG (SEQ ID NO: 751)
CDR SEQ ID NO: 142 de WO 2010/130830	QYTIT (SEQ ID NO: 752)
CDR SEQ ID NO: 143 de WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 753)
CDR SEQ ID NO: 153 de WO 2010/130830	WYRQAPGKQRELVA (SEQ ID NO: 763)
CDR SEQ ID NO: 154 de WO 2010/130830	WFRQTPGKERELIA (SEQ ID NO: 764)
CDR SEQ ID NO: 155 de WO 2010/130830	WFRQAPGKQREFIA (SEQ ID NO: 765)
CDR SEQ ID NO: 156 de WO 2010/130830	WFRQAPGKEREVVA (SEQ ID NO: 766)
CDR SEQ ID NO: 157 de WO 2010/130830	WFLQAPGKERELIA (SEQ ID NO: 767)
CDR SEQ ID NO: 158 de WO 2010/130830	WFRQAPGKEREVVA (SEQ ID NO: 768)
CDR SEQ ID NO: 159 de WO 2010/130830	WFRQAPGKQREVVA (SEQ ID NO: 769)
CDR SEQ ID NO: 160 de WO 2010/130830	WFRQAPGKREFVA (SEQ ID NO: 770)
CDR SEQ ID NO: 161 de WO 2010/130830	WFRQSGGKGRELIA (SEQ ID NO: 771)
CDR SEQ ID NO: 171 de WO 2010/130830	GIIVTGTWRSDY (SEQ ID NO: 781)
CDR SEQ ID NO: 172 de WO 2010/130830	GDTGGAAAYGY (SEQ ID NO: 782)
CDR SEQ ID NO: 173 de WO 2010/130830	LGIEYA (SEQ ID NO: 783)
CDR SEQ ID NO: 174 de WO 2010/130830	AKGIGVYGY (SEQ ID NO: 784)
CDR SEQ ID NO: 175 de WO 2010/130830	GVTGGAAAYGY (SEQ ID NO: 785)
CDR SEQ ID NO: 176 de WO 2010/130830	AELPGTYDY (SEQ ID NO: 786)
CDR SEQ ID NO: 177 de WO 2010/130830	AEPAGVYDV (SEQ ID NO: 787)
CDR SEQ ID NO: 178 de WO 2010/130830	DRRGLASTRAADYDY (SEQ ID NO: 788)
CDR SEQ ID NO: 179 de WO 2010/130830	GDTGGASYGY (SEQ ID NO: 789)

FIGURA 2B

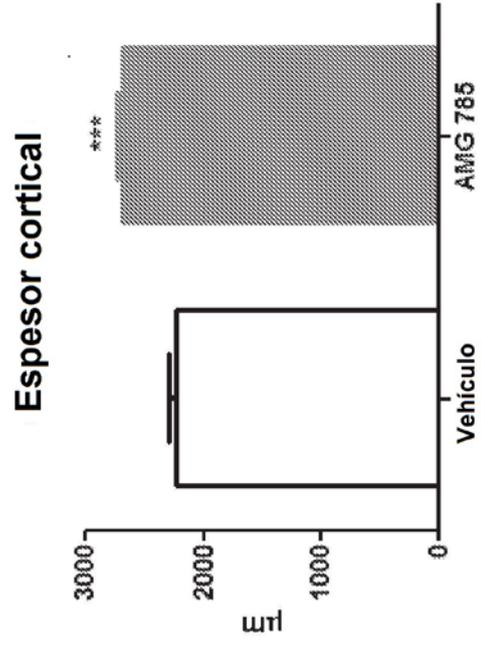


FIGURA 2A

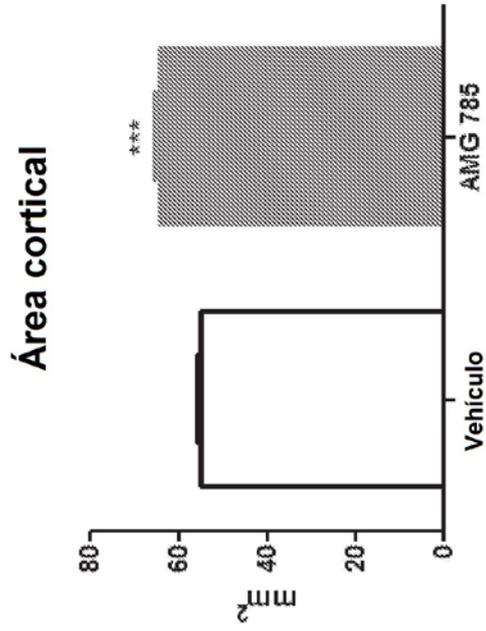


FIGURA 3B

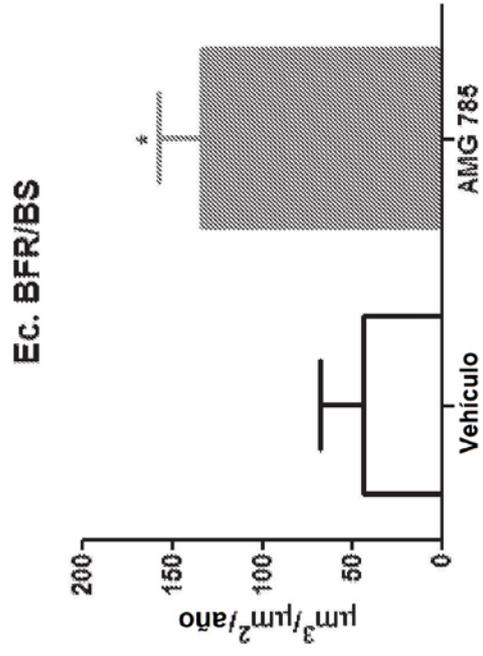


FIGURA 3A

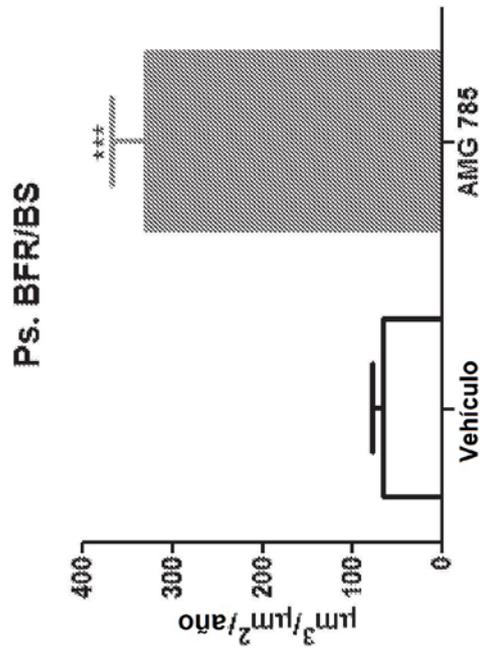


FIGURA 4

