

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 479**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2012** **PCT/US2012/034107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012** **WO12145417**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012** **E 12717002 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** **EP 2699261**

54 Título: **Método para el tratamiento de la osteoporosis**

30 Prioridad:

19.04.2011 US 201161477065 P

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

09.10.2018

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799 , US**

72 Inventor/es:

**SAN MARTIN, JAVIER y
WASSERMAN, SCOTT**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 685 479 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 la osteoporosis

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere, en general, a métodos de aumento de la densidad mineral ósea y tratamiento de la osteoporosis usando un anticuerpo antiesclerostina.

10 **Antecedentes de la invención**

La osteoporosis es una enfermedad debilitante en seres humanos y se caracteriza por reducciones marcadas de la masa y la densidad mineral ósea esqueléticas, deterioro estructural del hueso, incluyendo degradación de la microarquitectura ósea y los correspondientes aumentos en la fragilidad ósea (es decir, disminución de la resistencia ósea) y susceptibilidad a la fractura en individuos afectados. La osteoporosis en seres humanos generalmente está precedida por osteopenia clínica, una afección descubierta en aproximadamente 25 millones de personas en los Estados Unidos. A otros 7-8 millones de pacientes en los Estados Unidos se les ha diagnosticado osteoporosis clínica. La frecuencia de osteoporosis en la población humana aumenta con la edad. Entre los caucásicos, la osteoporosis es predominante en mujeres que, en los Estados Unidos, comprenden el 80 % del grupo de pacientes con osteoporosis. El aumento de la fragilidad y la susceptibilidad a la fractura del hueso esquelético en ancianos se ve agravado por el mayor riesgo de caídas accidentales en esta población. Las caderas, muñecas y vértebras fracturadas se encuentran entre las lesiones más comunes asociadas con la osteoporosis y la baja densidad mineral ósea. Las fracturas de cadera, en particular, son extremadamente incómodas y costosas para el paciente, y para las mujeres, se correlacionan con altas tasas de mortalidad y morbilidad.

25 **Sumario de la invención**

La invención se refiere a un anticuerpo antiesclerostina que comprende una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 245, una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 246, una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 247, una CDR-L1 de la SEQ ID NO: 78, una CDR-L2 de la SEQ ID NO: 79 y una CDR-L3 de la SEQ ID NO: 80, para uso en un método para aumentar la densidad mineral ósea en una mujer postmenopáusica, comprendiendo el método administrar, a una mujer postmenopáusica que tiene una puntuación T de las vértebras lumbares de menos de o igual a -2, dicho anticuerpo antiesclerostina en una cantidad y durante un periodo de tratamiento eficaces para aumentar la densidad mineral ósea (DMO) de las vértebras lumbares al menos un 9 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina; en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de 140 mg a 210 mg y la cantidad del anticuerpo antiesclerostina se administra a un intervalo con una frecuencia no superior a una vez al mes.

La divulgación también incluye métodos de uso de un anticuerpo antiesclerostina para tratar osteoporosis. El método comprende administrar a una mujer postmenopáusica con osteoporosis un anticuerpo antiesclerostina en una cantidad de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 210 mg a un intervalo de una vez al mes. Opcionalmente, el anticuerpo antiesclerostina se administra durante un periodo de tratamiento de aproximadamente tres meses a aproximadamente 18 meses. En diversas realizaciones de la divulgación, el método comprende administrar, a una mujer postmenopáusica con osteoporosis, un anticuerpo antiesclerostina en una cantidad de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 210 mg a un intervalo de cada tres meses, opcionalmente, durante un periodo de tratamiento de aproximadamente seis meses a aproximadamente 18 meses.

El uso de anticuerpos antiesclerostina en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento o para la preparación de medicamentos para administración de acuerdo con cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento está contemplado específicamente por la divulgación. A este respecto, la divulgación incluye un anticuerpo antiesclerostina para uso en un método de aumento de la densidad mineral ósea en una mujer postmenopáusica, comprendiendo el método administrar, a una mujer postmenopáusica que tiene una puntuación T de las vértebras lumbares de menos de o igual a -2, un anticuerpo antiesclerostina en una cantidad y durante un tiempo eficaces para aumentar la densidad mineral ósea (DMO) de las vértebras lumbares al menos aproximadamente un 9 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina. La divulgación incluye además un anticuerpo antiesclerostina para uso en un método para tratar osteoporosis, comprendiendo el método administrar, a una mujer postmenopáusica con osteoporosis, un anticuerpo antiesclerostina en una cantidad de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 210 mg a un intervalo de una vez al mes durante un periodo de tratamiento, opcionalmente, de aproximadamente tres meses a aproximadamente 18 meses. La divulgación incluye además un anticuerpo antiesclerostina para uso en un método para tratar osteoporosis, comprendiendo el método administrar, a una mujer postmenopáusica con osteoporosis, un anticuerpo antiesclerostina en una cantidad de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 210 mg a un intervalo de una vez cada tres meses durante un periodo de tratamiento, opcionalmente, de aproximadamente seis meses a aproximadamente 18 meses.

Además, la divulgación proporciona el uso de un anticuerpo antiesclerostina en la preparación de un medicamento

para aumentar la densidad mineral ósea en una mujer postmenopáusica que tiene una puntuación T de las vértebras lumbares de menos de o igual a -2 en una cantidad eficaz para aumentar la densidad mineral ósea (DMO) de las vértebras lumbares al menos aproximadamente un 9 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina.

La divulgación también incluye el uso de un anticuerpo antiesclerostina en la preparación de un medicamento para tratar osteoporosis en una mujer postmenopáusica en una cantidad de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 210 mg, administrada a un intervalo de una vez al mes durante un periodo de tratamiento, opcionalmente, de aproximadamente tres meses a aproximadamente 18 meses, así como el uso de un anticuerpo antiesclerostina en la preparación de un medicamento para tratar osteoporosis en una cantidad de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 210 mg, administrada a un intervalo de una vez cada tres meses durante un periodo de tratamiento, opcionalmente, de aproximadamente seis meses a aproximadamente 18 meses.

En los siguientes párrafos numerados se definen o resumen aspectos de la invención:

1. Un anticuerpo antiesclerostina que comprende una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 245, una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 246, una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 247, una CDR-L1 de la SEQ ID NO: 78, una CDR-L2 de la SEQ ID NO: 79 y una CDR-L3 de la SEQ ID NO: 80, para uso en un método para aumentar la densidad mineral ósea en una mujer postmenopáusica, comprendiendo el método administrar, a una mujer postmenopáusica que tiene una puntuación T de las vértebras lumbares de menos de o igual a -2, dicho anticuerpo antiesclerostina en una cantidad y durante un periodo de tratamiento eficaces para aumentar la densidad mineral ósea (DMO) de las vértebras lumbares al menos un 9 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina; en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de 140 mg a 210 mg y la cantidad del anticuerpo antiesclerostina se administra a un intervalo con una frecuencia no superior a una vez al mes. 2. El anticuerpo antiesclerostina para el uso del párrafo 1, en el que la mujer postmenopáusica padece osteoporosis y/o corre un riesgo aumentado o elevado de fractura y/o ha dejado o es intolerante a otra terapia para osteoporosis disponible.

3. El anticuerpo antiesclerostina para el uso del párrafo 1 o el párrafo 2, en el que el anticuerpo antiesclerostina se administra en una cantidad y durante un tiempo eficaces para aumentar la DMO de las vértebras lumbares al menos una desviación estándar respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina.

4. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-3, en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina se administra a una frecuencia de una vez al mes durante un periodo de tratamiento de aproximadamente tres meses a aproximadamente 18 meses.

5. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-4, en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de aproximadamente 140 mg.

6. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-4, en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de aproximadamente 210 mg.

7. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-6, en el que la cantidad y el periodo de tratamiento son eficaces para reducir el riesgo de fracturas vertebrales y/o no vertebrales.

8. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-7, en el que la cantidad y el periodo de tratamiento son eficaces para aumentar la DMO de toda la cadera al menos aproximadamente un 3 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina.

9. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-8, en el que el anticuerpo antiesclerostina se administra por vía subcutánea.

10. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-9, en el que el anticuerpo antiesclerostina es una inmunoglobulina que comprende cadenas pesadas y cadenas ligeras.

11. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-10, en el que el anticuerpo antiesclerostina demuestra una afinidad de unión por esclerostina de la SEQ ID NO: 1 de menos de o igual a 1×10^{-7} M.

12. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el anticuerpo antiesclerostina es capaz de neutralizar esclerostina humana en un ensayo de mineralización basado en células MC3T3 cuando el número de moles de sitios de unión a esclerostina por pocillo es menos de 6 veces superior en comparación con el número de moles de esclerostina por pocillo.

13. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el anticuerpo antiesclerostina tiene una CI_{50} de 100 nM o menos, 50 nM o menos o 25 nM o menos para neutralizar esclerostina humana en un ensayo basado en células, tal como un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso.

14. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el anticuerpo antiesclerostina tiene una CI_{50} de 100 nM o menos para neutralizar esclerostina humana en un ensayo de señalización Wnt basado en células en líneas celulares HEK293.

15. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el anticuerpo antiesclerostina tiene una CI_{50} de 500 nM o menos para neutralizar esclerostina humana en un ensayo de mineralización inducida por BMP2 en células MC3T3.

16. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el anticuerpo antiesclerostina administrado por vía subcutánea en una cantidad de aproximadamente 210 mg a un intervalo de una vez al mes durante tres meses aumenta la DMO de las vértebras lumbares en al menos un 5 %.

17. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el anticuerpo antiesclerostina se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 1, en el que dicho anticuerpo antiesclerostina se une a la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

18. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-11, donde el anticuerpo antiesclerostina bloquea de forma cruzada la unión de al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-1, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-12, Ab-19, Ab-20, Ab-23 y Ab-24 a esclerostina y/o su unión a esclerostina es bloqueada de forma cruzada por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-1, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-12, Ab-19, Ab-20, Ab-23 y Ab-24.

19. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 11-18, en el que el anticuerpo antiesclerostina comprende cadenas pesadas que comprenden la SEQ ID NO: 378 y cadenas ligeras que comprenden la SEQ ID NO: 376.

20. El anticuerpo antiesclerostina para el uso del párrafo 19, en el que el anticuerpo antiesclerostina tiene cadenas pesadas de la SEQ ID NO: 145 o la SEQ ID NO: 392 y cadenas ligeras de la SEQ ID NO: 141.

21. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-20, en el que el anticuerpo antiesclerostina es un anticuerpo monoclonal.

22. El anticuerpo antiesclerostina para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-21, en el que el anticuerpo antiesclerostina es un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico.

El sumario anterior no pretende definir todos los aspectos de la invención, y los aspectos adicionales se describen en otras secciones, tales como la Descripción detallada. Se pretende que todo el documento esté relacionado como una divulgación unificada, y se debe entender que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en el presente documento, incluso si la combinación de características no se encuentran juntas en la misma frase, párrafo o sección de este documento. Con respecto a los aspectos de la invención descritos o reivindicados con "un" o "uno", 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 inequívocamente lo contrario. Si de los aspectos de la invención se describe "que comprenden" una característica, las realizaciones también se contemplan como "que consisten en" o "que consisten esencialmente en" la característica.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que enumera secuencias de aminoácidos e identificadores de secuencia para secuencias de aminoácidos de diversos anticuerpos antiesclerostina descritos en el presente documento. Los identificadores de secuencia se refieren a secuencias de aminoácidos proporcionadas en la lista de secuencias adjunta al presente. Las secuencias de aminoácidos también se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747, la publicación de patente internacional N° WO 2008/115732, la publicación de patente internacional N° WO 2009/047356 y la publicación de patente internacional N° WO 2010/130830.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un anticuerpo antiesclerostina que comprende una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 245, una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 246, una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 247, una CDR-L1 de la SEQ ID NO: 78, una CDR-L2 de la SEQ ID NO: 79 y una CDR-L3 de la SEQ ID NO: 80, para uso en un método para aumentar la densidad mineral ósea en una mujer postmenopáusica, comprendiendo el método administrar, a una mujer postmenopáusica

que tiene una puntuación T de las vértebras lumbares de menos de o igual a -2, dicho anticuerpo antiesclerostina en una cantidad y durante un periodo de tratamiento eficaces para aumentar la densidad mineral ósea (DMO) de las vértebras lumbares al menos un 9 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina; en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de 140 mg a 210 mg y la cantidad del anticuerpo antiesclerostina se administra a un intervalo con una frecuencia no superior a una vez al mes. La cantidad y el tiempo de administración son eficaces para aumentar la DMO de las vértebras lumbares al menos aproximadamente un 9 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina.

En la evaluación del riesgo, la presencia o la progresión de la osteoporosis (u otras dolencias asociadas con la pérdida de DMO), la DMO de un paciente generalmente se compara con la densidad máxima de un adulto sano de 30 años de edad (es decir, un "adulto joven"), creando la llamada "puntuación T". Normalmente, la DMO se mide en "todo el cuerpo" (por ejemplo, cabeza, tronco, brazos y piernas) o en la cadera (por ejemplo, toda la cadera y/o el cuello femoral), la columna vertebral (por ejemplo, vértebras lumbares), la muñeca, un dedo, la espinilla y/o el talón. Un paciente puede tener diferentes puntuaciones T que corresponden a diferentes sitios de medición (por ejemplo, una puntuación T de las vértebras lumbares, una puntuación T de toda la cadera, y una puntuación T del cuello femoral, todas las cuales pueden comprender diferentes valores). La DMO de un paciente también puede compararse con una densidad ósea "de la misma edad" (véase, por ejemplo, Grupo científico de la Organización Mundial de la Salud sobre la prevención y el tratamiento de la osteoporosis, "Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group." WHO Technical Report Series; 921, Ginebra, Suiza (2003)). La diferencia entre la DMO de un paciente y la de un adulto joven sano se menciona convencionalmente en términos del múltiplo de una "desviación estándar," que normalmente es igual a de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 12 % de disminución de la densidad ósea. La Organización Mundial de la Salud propuso cuatro categorías de diagnóstico basándose en puntuaciones T de DMO. Un valor de DMO dentro de 1 desviación estándar de la media de referencia del adulto joven (puntuación T ≥ -1) es "normal." Una baja masa ósea (osteopenia) se indica mediante un valor de DMO de más de 1 desviación estándar por debajo de la media del adulto joven, pero menos de 2,5 desviaciones estándar (puntuación T < -1 y $> -2,5$). Una puntuación T de 2,5 desviaciones estándar o más de 2,5 desviaciones estándar por debajo de la norma respalda un diagnóstico de osteoporosis (puntuación T $\leq -2,5$). Si un paciente padece adicionalmente una o más fracturas por fragilidad, se califica al paciente como que tiene osteoporosis grave.

En diversas realizaciones del método de la invención, la mujer postmenopáusica tiene una puntuación T de las vértebras lumbares ≤ -1 , tal como una puntuación T de las vértebras lumbares < -1 y $> -2,5$ (por ejemplo, una puntuación T de las vértebras lumbares de menos de o igual a -2) o una puntuación T de las vértebras lumbares $\leq -2,5$. Como alternativa (o además), la mujer postmenopáusica tiene una puntuación T de toda la cadera ≤ -1 , tal como una puntuación T de toda la cadera < -1 y $> -2,5$ (por ejemplo, una puntuación T de toda la cadera de menos de o igual a -2) o una puntuación T de toda la cadera $\leq -2,5$.

Opcionalmente, la mujer postmenopáusica corre el riesgo de osteoporosis o padece osteoporosis. Como alternativa o además, la mujer postmenopáusica corre un riesgo aumentado o elevado de fractura, es decir, el sujeto tiene antecedentes de fractura osteoporótica o múltiples factores de riesgo para fractura. En diversas realizaciones de la invención, el anticuerpo antiesclerostina se administra a la mujer postmenopáusica en una cantidad y durante un tiempo eficaces para reducir el riesgo de fracturas vertebrales y/o no vertebrales. Como alternativa o además, la mujer postmenopáusica opcionalmente dejó o es intolerante a otra terapia para osteoporosis disponible tal como, aunque sin limitación, inhibidores del ligando de RANK (RANKL), tales como anticuerpo anti-RANKL (por ejemplo, PROLIA®); bisfosfonatos (por ejemplo, ácido zoledrónico (RECLAST®), alendronato sódico (FOSAMAX®), o ibandronato sódico (BONIVA®)); u hormona paratiroidea o análogos de la misma (por ejemplo, teriparatida, un análogo recombinante de la hormona paratiroidea humana (1-34) (FORTEO®)). En diversas realizaciones, la mujer postmenopáusica ha sido tratada con cualquiera de las terapias para osteoporosis enumeradas anteriormente antes de la administración del anticuerpo antiesclerostina. Los pacientes pre-tratados con bisfosfonatos han demostrado exhibir una respuesta atenuada a teriparatida (FORTEO®). El pre-tratamiento con bisfosfonatos no dará como resultado una respuesta atenuada similar al tratamiento con anticuerpo antiesclerostina. De este modo, los pacientes pre-tratados con bisfosfonatos disfrutarán el potencial terapéutico completo del tratamiento con anticuerpo antiesclerostina.

El anticuerpo antiesclerostina se administra a la mujer postmenopáusica en una cantidad y durante un tiempo eficaces para conseguir un aumento de la DMO de las vértebras lumbares al menos un 9 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina. La columna vertebral lumbar es uno de los muchos sitios del esqueleto para la medición de la DMO. Otros sitios del esqueleto adecuados incluyen la cadera (por ejemplo, toda la cadera o el cuello femoral), el antebrazo, el dedo, la muñeca y el talón. "Valor inicial previo al tratamiento" se refiere a la medición de la DMO en el sitio del esqueleto antes de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina. De este modo, la DMO se mide en un sitio del esqueleto antes del tratamiento con anticuerpo antiesclerostina para obtener una medición de la DMO inicial, que se compara con la DMO medida en el mismo sitio del esqueleto en un punto temporal después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina, tal como doce meses después de la administración inicial. En diversos aspectos de la invención, el anticuerpo antiesclerostina se administra en una cantidad y durante un tiempo eficaces

para aumentar la DMO de las vértebras lumbares (o la DMO en otro sitio del esqueleto) al menos una desviación estándar (por ejemplo, 1,5 desviaciones estándar, 2 desviaciones estándar o 2,5 desviaciones estándar) respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina. Además, el anticuerpo antiesclerostina puede administrarse en una cantidad y durante un tiempo eficaces para aumentar la DMO de toda la cadera al menos aproximadamente un 3 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina.

En seres humanos, la densidad mineral ósea a menudo se determina clínicamente usando la absorciometría de rayos X doble (DXA). Otras técnicas incluyen la tomografía computarizada cuantitativa (QCT), la ultrasonografía, la absorciometría de rayos X de energía única (SXA), la resonancia magnética, la radiografía y la absorciometría radiográfica. Excepto por la ecografía, la Asociación Médica Americana señala que las técnicas de DMO normalmente implican el uso de rayos X y se basan en el principio de que la atenuación de la radiación depende del grosor y la composición de los tejidos en la trayectoria de la radiación. A menudo, las técnicas implican la comparación de resultados con una base de datos normativa.

La cantidad de anticuerpo antiesclerostina en una administración a la mujer postmenopáusica como se divulga comprende al menos aproximadamente 70 mg del anticuerpo antiesclerostina. Por ejemplo, en diversos aspectos, la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de aproximadamente 140 mg, o aproximadamente 210 mg de anticuerpo antiesclerostina. La cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada en un método de la divulgación es no superior a aproximadamente 350 mg de anticuerpo antiesclerostina, por ejemplo, no superior a aproximadamente 280 mg de anticuerpo antiesclerostina, no superior a aproximadamente 210 mg de anticuerpo antiesclerostina, no superior a aproximadamente 140 mg de anticuerpo antiesclerostina o no superior a aproximadamente 120 mg de anticuerpo antiesclerostina (por ejemplo, aproximadamente 120 mg de anticuerpo). Dicho de otro modo, una única administración o dosis de antiesclerostina comprende, por ejemplo, no superior a aproximadamente 350 mg del anticuerpo (aunque la dosis única puede administrarse mediante múltiples inyecciones contemporáneas (por ejemplo, dos inyecciones de 105 mg de anticuerpo hasta conseguir una dosis 210 mg)). De este modo, en diversas realizaciones de la divulgación, el método comprende administrar anticuerpo antiesclerostina en una cantidad de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 350 mg, tal como de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 280 mg, o de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 350 mg, o de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 350 mg, o de aproximadamente 210 mg a aproximadamente 350 mg, o de aproximadamente 280 mg a aproximadamente 350 mg. Opcionalmente, una dosis única de anticuerpo antiesclerostina comprende de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 210 mg de anticuerpo antiesclerostina, tal como de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 120 mg (por ejemplo, aproximadamente 70 mg) de anticuerpo antiesclerostina, o de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 140 mg de anticuerpo antiesclerostina, o de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 210 mg de anticuerpo antiesclerostina, o de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 140 mg de anticuerpo antiesclerostina. Una dosis única de anticuerpo antiesclerostina comprende de 140 mg a 210 mg (por ejemplo, aproximadamente 140 mg o aproximadamente 210 mg) de anticuerpo antiesclerostina. Una cantidad de anticuerpo antiesclerostina (es decir, dosis de anticuerpo antiesclerostina) se administra a un intervalo con una frecuencia no superior a una vez al mes (o cuatro semanas), opcionalmente durante un periodo de tratamiento de al menos aproximadamente tres meses (o 12 semanas). El periodo de tratamiento comprende no más de aproximadamente 18 meses (es decir, de aproximadamente tres meses a aproximadamente 18 meses). En otras palabras, transcurre un periodo de espera de al menos un mes entre administraciones del anticuerpo antiesclerostina a la mujer postmenopáusica, y el ciclo de tratamiento opcionalmente dura al menos aproximadamente tres meses y no más de aproximadamente 18 meses (por ejemplo, de aproximadamente tres meses a aproximadamente 18 meses). En diversos aspectos, las dosis múltiples del anticuerpo antiesclerostina se administran durante un periodo de tratamiento de aproximadamente tres meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente tres meses a aproximadamente 12 meses, o de aproximadamente tres meses a aproximadamente nueve meses, o de aproximadamente tres meses a aproximadamente seis meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 18 meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 12 meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 9 meses, o de aproximadamente 9 meses a aproximadamente 18 meses, o de aproximadamente 9 meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente 9 meses a aproximadamente 12 meses, o de aproximadamente 12 meses a aproximadamente 18 meses, o de aproximadamente 12 meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente 15 meses a aproximadamente 18 meses (por ejemplo, aproximadamente tres meses, aproximadamente seis meses, aproximadamente nueve meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 15 meses o aproximadamente 18 meses). Opcionalmente, las dosis múltiples del anticuerpo antiesclerostina se administra durante un periodo de tratamiento de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 52 semanas, o de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 36 semanas, o de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 24 semanas, con dosis administradas una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada 8 semanas o una vez cada 12 semanas. En un aspecto de la divulgación, la cantidad de anticuerpo antiesclerostina se administra a un intervalo con una frecuencia no superior a una vez cada tres meses (por ejemplo, una vez cada 12 semanas), opcionalmente durante un periodo de tratamiento de aproximadamente seis meses a aproximadamente 18 meses.

El régimen de dosificación y de temporización descrito en el presente documento (por ejemplo, aproximadamente 70

mg, aproximadamente 140 mg o aproximadamente 210 mg, administrados una vez al mes (QM) o cada tres meses (Q3M) durante un periodo de tratamiento de, por ejemplo, aproximadamente 12 meses) ha demostrado ser eficaz para aumentar la densidad mineral ósea en las vértebras lumbares en al menos aproximadamente un 5 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 6 %, al menos aproximadamente un 7 %, al menos aproximadamente un 8 %, al menos aproximadamente un 9 %, al menos aproximadamente un 10 % o al menos aproximadamente un 11 %) a los 12 meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina, y/o al menos aproximadamente un 4 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 6 %, al menos aproximadamente un 7 % o al menos aproximadamente un 8 %) a los 6 meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina. Por ejemplo, cuando se administra por vía subcutánea en una cantidad de aproximadamente 210 mg una vez al mes durante tres meses, el anticuerpo antiesclerostina aumenta la densidad mineral ósea de las vértebras lumbares en al menos aproximadamente un 5 %. El régimen de dosificación y de temporización del método de la invención ha demostrado ser eficaz para aumentar la densidad mineral ósea de toda la cadera en al menos aproximadamente un 1 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 % o al menos aproximadamente un 4 %) a los 12 meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina. El régimen de dosificación y de temporización descrito en el presente documento ha demostrado ser eficaz para aumentar la densidad mineral ósea del cuello femoral en al menos aproximadamente un 0,5 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 1,5 %, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 2,5 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 3,5 % o al menos aproximadamente un 4 %) a los 12 meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina.

La respuesta fisiológica de un sujeto a un anticuerpo antiesclerostina puede calibrarse controlando los niveles de marcadores óseos. Los marcadores óseos son productos creados durante el proceso de remodelación ósea y son liberados por los huesos, los osteoblastos y/o los osteoclastos. Las fluctuaciones en la resorción ósea y/o los niveles de "marcadores" de formación ósea implican cambios en la remodelación/modelado óseo. La International Osteoporosis Foundation (IOF) recomienda usar marcadores óseos para monitorizar las terapias de densidad ósea (véase, por ejemplo, Delmas y col., Osteoporosis Int., Supl. 6: S2-17 (2000)). Los marcadores indicativos de resorción ósea (o actividad de osteoclastos) incluyen, por ejemplo, telopéptido C (por ejemplo, telopéptido C-terminal de colágeno tipo 1 (CTX) o telopéptido C reticulado en suero), telopéptido N (telopéptido N-terminal de colágeno tipo 1 (NTX)), desoxipiridinolina (DPD), piridinolina, hidroxiprolina urinaria, galactosil hidroxilisina y fosfatasa ácida resistente a tartrato (por ejemplo, isoforma 5b de fosfatasa ácida resistente a tartrato sérico). Los marcadores de mineralización/formación ósea incluyen, aunque sin limitación, fosfatasa alcalina específica de huesos (BSAP), péptidos liberados de la prolongación N- y C-terminal del procolágeno tipo I (P1NP, PICP) y osteocalcina (OC). Varios kits están disponibles en el mercado para detectar y cuantificar marcadores en muestras clínicas, tales como orina y sangre.

En diversos aspectos de la invención, la administración del anticuerpo antiesclerostina da como resultado un aumento de los niveles de marcadores de formación ósea en, por ejemplo, el suero y/o la orina de un sujeto tratado. Generalmente, la cantidad de marcadores de formación ósea alcanza su máximo en el plazo de uno o dos meses desde la administración inicial de anticuerpo antiesclerostina y disminuyen durante los siguientes (por ejemplo, dos a seis) meses, independientemente de si se administran dosis posteriores de anticuerpo antiesclerostina. En el ejemplo 2, por ejemplo, los niveles de P1NP, BSAP y OC disminuyeron a aproximadamente el valor inicial (cantidad de marcador detectado antes de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina) a aproximadamente de dos a seis meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina, a pesar de administraciones repetidas del anticuerpo durante el mismo período de tiempo. Simultáneamente, los niveles de un marcador de resorción ósea (por ejemplo, CTX) disminuyen después de la administración del anticuerpo antiesclerostina, lo que indica un desacoplamiento de la formación ósea y la resorción ósea durante el tratamiento. En el ejemplo 2, por ejemplo, los niveles séricos de CTX cayeron por debajo del valor inicial tan solo una semana después de la administración inicial de anticuerpos antiesclerostina, y se mantuvieron por debajo del valor inicial durante un período de tratamiento de doce meses. También sorprendentemente, la DMO continúa elevándose después de que los marcadores de formación y de resorción ósea se acerquen a los niveles iniciales.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de la osteoporosis. A una mujer postmenopáusica con osteoporosis se le puede administrar un anticuerpo antiesclerostina en una cantidad de aproximadamente 210 mg a un intervalo de una vez al mes. En diversos aspectos, a la mujer postmenopáusica se le administra una dosis una vez al mes de aproximadamente 140 mg de anticuerpo antiesclerostina, o una dosis una vez al mes de aproximadamente 210 mg de anticuerpo antiesclerostina. Múltiples administraciones (es decir, dosis) del anticuerpo antiesclerostina son administradas a la mujer postmenopáusica durante un periodo de tratamiento de, por ejemplo, aproximadamente tres meses a aproximadamente 18 meses, tal como un periodo de tratamiento de aproximadamente tres meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente tres meses a aproximadamente 12 meses, o de aproximadamente tres meses a aproximadamente nueve meses, o de aproximadamente tres meses a aproximadamente seis meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 18 meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 12 meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 9 meses, o de aproximadamente 9 meses a aproximadamente 18 meses, o de aproximadamente 9 meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente 9 meses a aproximadamente 12 meses, o de

aproximadamente 12 meses a aproximadamente 18 meses, o de aproximadamente 12 meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente 15 meses a aproximadamente 18 meses (por ejemplo, aproximadamente tres meses, aproximadamente seis meses, aproximadamente nueve meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 15 meses o aproximadamente 18 meses). Opcionalmente, múltiples dosis de un anticuerpo antiesclerostina son administradas durante un periodo de tratamiento de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 52 semanas, o de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 36 semanas, o de aproximadamente 12 semanas a aproximadamente 24 semanas, con dosis administradas una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada 8 semanas o una vez cada 12 semanas. En diversas realizaciones, el anticuerpo antiesclerostina se administra durante un periodo de tratamiento que consiste en 12 meses o 18 meses.

Como alternativa, el método de la divulgación comprende administrar, a una mujer postmenopáusica con osteoporosis, un anticuerpo antiesclerostina en una cantidad de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 210 mg o en una cantidad de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 210 mg, a un intervalo de cada tres meses. A este respecto, a la mujer postmenopáusica se le administra opcionalmente una dosis de aproximadamente 140 mg de anticuerpo antiesclerostina o una dosis de aproximadamente 210 mg de anticuerpo antiesclerostina cada tres meses (por ejemplo, aproximadamente cada 90 días). Múltiples administraciones (es decir, dosis) del anticuerpo antiesclerostina son administradas a la mujer postmenopáusica durante un periodo de tratamiento aproximadamente seis meses a aproximadamente 18 meses de longitud, tal como un periodo de tratamiento de aproximadamente seis meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 12 meses, o de aproximadamente seis meses a aproximadamente 9 meses, o de aproximadamente 9 meses a aproximadamente 18 meses, o de aproximadamente 9 meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente 15 meses a aproximadamente 18 meses, o de aproximadamente 12 meses a aproximadamente 15 meses, o de aproximadamente 15 meses a aproximadamente 18 meses (por ejemplo, aproximadamente tres meses, aproximadamente seis meses, aproximadamente nueve meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 15 meses o aproximadamente 18 meses). En diversas realizaciones, el anticuerpo antiesclerostina se administra durante un periodo de tratamiento que consiste en 12 meses o 18 meses.

Por "tratar la osteoporosis" se entiende la mejoría, en todo o en parte, de la osteoporosis, o la protección, en todo o en parte, contra la progresión adicional de la osteoporosis. La reversión completa de la enfermedad no es necesaria en el contexto de la invención; se contempla cualquier beneficio terapéutico, incluyendo la mejora de la DMO y/o la reducción del riesgo de fractura.

El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo. Un anticuerpo puede comprender una molécula completa de anticuerpo (inmunoglobulina) (incluyendo versiones policlonales, monoclonales, quiméricas, humanizadas y/o humanas que tienen cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo de IgG)), o comprender un fragmento de unión al antígeno del mismo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos F(ab')₂, Fab, Fab', Fv, Fc y Fd, y pueden incorporarse en anticuerpos de dominio único (por ejemplo, nanoanticuerpos), anticuerpos monocatenarios, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology*, 23(9): 1126-1136 (2005)). Los polipéptidos de anticuerpos, incluyendo los monocuerpos de polipéptidos de fibronectina, también se desvelan en la patente de Estados Unidos Nº 6.703.199. Otros polipéptidos de anticuerpos se desvelan en la publicación de patente de Estados Unidos Nº 20050238646. Las patentes de Estados Unidos Nº 6.395.511 y 6.803.453, y las publicaciones de patente de Estados Unidos Nº 20040009535 y 20050106683 se refieren a anticuerpos antiesclerostina en general. La secuencia de aminoácidos de la esclerostina humana se describe en la SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias y se proporciona como la SEQ ID NO: 1 de la publicación de patente de Estados Unidos Nº 20070110747. La esclerostina también se describe en Brunkow y col., *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 577-589 (2001); y Balemans y col., *Hum. Mol. Genet.*, 10: 537-543 (2001). Se puede encontrar información adicional sobre los materiales y métodos para generar anticuerpos antiesclerostina en la publicación de patente de Estados Unidos Nº 20040158045.

Un fragmento de anticuerpo puede ser cualquier proteína sintética o modificada genéticamente. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados que consisten en la región variable de cadena ligera o cadena pesada, fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, y moléculas de polipéptido de cadena sencilla recombinantes en las que regiones variables ligeras y pesadas están conectadas mediante un enlazador peptídico (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 de reconocimiento mínimo" o "región hipervariable") pueden obtenerse 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 células productoras de anticuerpos como modelo (véase, por ejemplo, Larrick y col., *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 y col. (eds.), página 166, Cambridge University Press (1995); y Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of

Antibodies," en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch y col., (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc. (1995)).

Los anticuerpos antiesclerostina pueden unirse a esclerostina de la SEQ ID NO: 1, o una variante de origen natural de la misma, con una afinidad (K_d) 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 diversas técnicas, un ejemplo de las cuales es un ensayo ELISA de afinidad. En diversas realizaciones, la afinidad se determina mediante un ensayo de resonancia del plasmón superficial (por ejemplo, un ensayo BIAcore™). En diversas realizaciones, la afinidad se determina mediante un método cinético. En diversas realizaciones, la afinidad se determina mediante un método de equilibrio/solución. La publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747 contiene una descripción adicional de ensayos de afinidad adecuados para determinar la afinidad (K_d) de un anticuerpo por esclerostina.

Los anticuerpos antiesclerostina para uso en el método de la invención preferentemente modulan la función de la esclerostina en el ensayo basado en células descrito en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747 y/o el ensayo *in vivo* descrito en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747 y/o los anticuerpos antiesclerostina para uso en el método desvelado se unen a uno o más de los epítomos descritos en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747 y/o bloquean de forma cruzada la unión de uno de los anticuerpos descritos en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747 y/o su unión a esclerostina es bloqueada de forma cruzada por uno de los anticuerpos descritos en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747.

En diversas realizaciones, el anticuerpo antiesclerostina se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 1 y se une a la secuencia de la SEQ ID NO: 6 (C4GPARLLPNAIGRGKWWRPSPDFRC5; que corresponde a los aminoácidos 86-111 de la SEQ ID NO: 1). Como alternativa o además, el anticuerpo antiesclerostina de la divulgación se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 1 y se une a la secuencia de al menos una de la SEQ ID NO: 2 (DVSEYSC1RELHFTR; que corresponde a los aminoácidos 51-64 de la SEQ ID NO: 1), la SEQ ID NO: 3 (SAKPVTELVLC3SGQC4GPAR; que corresponde a los aminoácidos 73-90 de la SEQ ID NO: 1), la SEQ ID NO: 4 (WWRPSPDFRC5IPDRYR; que corresponde a los aminoácidos 101-117 de la SEQ ID NO: 1), la SEQ ID NO: 5 (LVASC7KC8KRLTR; que corresponde a los aminoácidos 138-149 de la SEQ ID NO: 1), la SEQ ID NO: 70 (SAKPVTELVLC3SGQC4; que corresponde a los aminoácidos 73-86 de la SEQ ID NO: 1), la SEQ ID NO: 71 (LVASC7KC8; que corresponde a los aminoácidos 138-144 de la SEQ ID NO: 1), la SEQ ID NO: 72 (C1RELHFTR; que corresponde a los aminoácidos 57-64 de la SEQ ID NO: 1) o la SEQ ID NO: 73 (C5IPDRYR; que corresponde a los aminoácidos 111-117 de la SEQ ID NO: 1) dentro de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo antiesclerostina se une a una subregión de esclerostina de SEQ ID NO: 1 que comprende las SEQ ID NO: 2-5 (y/o las SEQ ID NO: 70-73), opcionalmente en su conformación tridimensional nativa. Opcionalmente, el anticuerpo antiesclerostina de la divulgación se une a un péptido que consiste en una o más de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 70, la SEQ ID NO: 71, la SEQ ID NO: 72 o la SEQ ID NO: 73 (por ejemplo, un péptido que consiste en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5 o un péptido que consiste en la SEQ ID NO: 70, la SEQ ID NO: 71, la SEQ ID NO: 72 y la SEQ ID NO: 73).

En diversos aspectos, el anticuerpo antiesclerostina es capaz de neutralizar esclerostina humana en un ensayo de mineralización basado en células MC3T3 cuando el número de moles de sitios de unión a esclerostina por pocillo es menos de 6 veces superior en comparación con el número de moles de esclerostina por pocillo. La mineralización por células de linaje de osteoblastos en cultivo, ya sea células primarias o líneas celulares, se usa como un modelo *in vitro* de formación ósea. Un ensayo de mineralización basado en células ejemplar se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747 en, por ejemplo, el ejemplo 8. Células MC3T3-E1 (Sudo y col., *J. Cell Biol.*, 96:191-198 (1983)) y subclones de la línea celular original pueden formar mineral en cultivo tras el crecimiento en presencia de agentes diferenciadores. Dichos subclones incluyen MC3T3-E1-BF (Smith y col., *J. Biol. Chem.*, 275:19992-20001 (2000)). Tanto para el subclón MC3T3-E1-BF como para las células MC3T3-E1 originales, la esclerostina puede inhibir una o más de las secuencias de acontecimientos que conducen hasta e incluyen el depósito mineral (es decir, la esclerostina inhibe la mineralización). Los anticuerpos antiesclerostina que son capaces de neutralizar la actividad inhibidora de la esclerostina permiten la mineralización del cultivo en presencia de esclerostina de modo que hay un aumento estadísticamente significativo de, por ejemplo, el depósito de fosfato cálcico (medida como calcio) en comparación con la cantidad de calcio medida en el grupo de tratamiento con esclerostina solamente (es decir, sin anticuerpo).

Cuando se ejecuta el ensayo con el objetivo de determinar si un anticuerpo antiesclerostina particular puede neutralizar la esclerostina, la cantidad de esclerostina usada en el ensayo deseablemente es la cantidad mínima de esclerostina que causa al menos una reducción del 70 %, estadísticamente significativa, del depósito de fosfato cálcico (medido como calcio) en el grupo de esclerostina solamente, en comparación con la cantidad de calcio medida en el grupo sin esclerostina. Un anticuerpo neutralizante anti-esclerostina se define como uno que causa un aumento estadísticamente significativo del depósito de fosfato cálcico (medido como calcio) en comparación con la cantidad de calcio medida en el grupo de tratamiento con esclerostina solamente (es decir, sin anticuerpo). Para

determinar si un anticuerpo antiesclerostina es neutralizante o no, es necesario que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina usada en el ensayo sea tal que exista un exceso de moles de sitios de unión a esclerostina por pocillo en comparación con el número de lunares de esclerostina por pocillo. Dependiendo de la potencia del anticuerpo, el exceso de veces que puede requerirse puede ser de 24, 18, 12, 6, 3 o 1,5, y un experto en la materia está familiarizado con la práctica habitual de ensayar más de una concentración de agente de unión (anticuerpo). Por ejemplo, un anticuerpo neutralizante anti-esclerostina muy potente neutralizará la esclerostina cuando el número de moles de sitios de unión a esclerostina por pocillo es menos de 6 veces superior en comparación con el número de moles de esclerostina por pocillo. Un anticuerpo neutralizante antiesclerostina menos potente neutralizará la esclerostina solo a un exceso de 12, 18 o 24 veces.

El anticuerpo antiesclerostina opcionalmente tiene 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 esclerostina humana en un ensayo basado en células, tal como un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso, por ejemplo, el ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso descrito en la publicación de patente internacional N° WO 2008/115732 y la patente de Estados Unidos N° 7.744.874. El ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso se fundamenta en la capacidad de esclerostina para reducir los niveles de BMP-4 y fosfatasa alcalina estimulada por Wnt3a en la línea celular murina multipotencial, C2C12. De acuerdo con el documento WO 2008/115732, un anticuerpo antiesclerostina neutralizante media un aumento dependiente de la dosis de la actividad de fosfatasa alcalina en este ensayo. En el ejemplo 1 se proporcionan protocolos ejemplares de los ensayos basados en células.

Como alternativa o además, el anticuerpo antiesclerostina tiene una CI_{50} de 100 nM o menos (por ejemplo, 75 nM o menos, o 50 nM o menos) para neutralizar esclerostina humana en un ensayo de señalización Wnt basado en células en líneas celulares HEK293, tal como el ensayo de Wnt que implica inducción mediada por Wnt1 del gen indicador STF descrito, por ejemplo, en la publicación de patente internacional N° WO 2009/047356. Como alternativa o además, el anticuerpo antiesclerostina 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 esclerostina humana en un ensayo de mineralización inducida por BMP2 en células MC3T3, tal como el ensayo de mineralización descrito, por ejemplo, en la publicación de patente internacional N° WO 2009/047356. En el ejemplo 1 se proporciona el protocolo ejemplar.

Ejemplos de anticuerpos antiesclerostina adecuados para uso en el contexto de la divulgación se describen en las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20070110747 y 20070072797. En una realización de la invención, el anticuerpo antiesclerostina bloquea de forma cruzada la unión de al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-1, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-12, Ab-19, Ab-20, Ab-23 o Ab-24 (todos los cuales se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747, y cuyas secuencias de aminoácidos se proporcionan en la figura 1) a la esclerostina. Como alternativa o además, la unión del anticuerpo antiesclerostina a esclerostina es bloqueada de forma cruzada por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-1, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-12, Ab-19, Ab-20, Ab-23 o Ab-24 (todos los cuales se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747). En una realización de la divulgación, el anticuerpo antiesclerostina bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo de referencia a esclerostina de la SEQ ID NO: 1 o se bloquea de forma cruzada su unión a esclerostina de la SEQ ID NO: 1 por el anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de referencia comprende (a) cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 205 y cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 209; (b) cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 15 y cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 19; o (c) cadenas ligeras que comprenden la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 7 y cadenas pesadas que comprenden la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 11.

Los términos "bloqueo cruzado", "bloqueado de forma cruzada" y "bloquear de forma cruzada" se usan indistintamente en el presente documento para indicar la capacidad de un anticuerpo para interferir en la unión de otros anticuerpos a la esclerostina. El grado en que un anticuerpo es capaz de interferir en la unión de otro a la esclerostina y, por lo tanto, si puede decirse que bloquea de forma cruzada, puede determinarse usando ensayos de unión competitiva. En algunos aspectos de la invención, un anticuerpo bloqueante de forma cruzada o fragmento del mismo reduce la unión a esclerostina de un anticuerpo de referencia entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 100 %, tal como aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 100 %, específicamente entre el 70 % y el 100 %, y más específicamente entre el 80 % y el 100 %. Un ensayo cuantitativo particularmente adecuado para detectar el bloqueo cruzado usa una máquina Biacore que mide el alcance de las interacciones usando la tecnología de resonancia del plasmón superficial. A este respecto, el anticuerpo antiesclerostina se une opcionalmente a la esclerostina en un ensayo de resonancia del plasmón superficial de modo que, durante el ensayo en presencia de un anticuerpo de referencia, la unión registrada está entre el 80 % y el 4 % (por ejemplo, entre el 75 % y el 4 % o entre el 70 % y el 4 %) de la unión teórica máxima (es decir, la suma de la unión de cada anticuerpo cuando pasa sobre la superficie de la esclerostina en solitario). Otro ensayo cuantitativo de bloqueo cruzado adecuado usa un enfoque basado en ELISA para medir la competencia entre anticuerpos en términos de su unión a la esclerostina. A este respecto, el anticuerpo antiesclerostina en solución en un ensayo ELISA causa una reducción de entre el 60 % y el 100 % (por ejemplo, entre el 70 % y el 100 % o entre el 80 % y el 100 %) de la cantidad de esclerostina a la que se unió un anticuerpo de referencia inmovilizado y/o el anticuerpo de referencia en solución en

un ensayo ELISA causa una reducción de entre el 60 % y el 100 % (por ejemplo, entre el 70 % y el 100 % o entre el 80 % y el 100 %) en la cantidad de esclerostina a la que se unió el anticuerpo antiesclerostina, en comparación con la cantidad de esclerostina a la que se unió en ausencia del anticuerpo antiesclerostina o anticuerpo de referencia en solución. Ensayos para detectar el bloqueo cruzado de anticuerpos antiesclerostina y un anticuerpo de referencia se describen adicionalmente en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747.

Los ejemplos de anticuerpos antiesclerostina adecuados y fragmentos de los mismos de la divulgación incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que tienen una o más de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 desveladas específicamente en la publicación de patente de Estados Unidos N° 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 aminoácidos (por ejemplo, una sustitución de aminoácidos conservativa), siempre que el anticuerpo conserve la especificidad de unión de la CDR sin sustituir. Preferentemente, el anticuerpo antiesclerostina es Ab-4 o Ab-5 de la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747.

Además, el anticuerpo antiesclerostina de la divulgación 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 entre las SEQ ID NO: 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 la lista de secuencias y desveladas en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747. Preferentemente, el anticuerpo antiesclerostina de la divulgación comprende al menos una secuencia de CDR que tiene al menos un 75 % de identidad con una CDR seleccionada entre las SEQ ID NO: 245, 246, 247, 78, 79, 80, 269, 270, 271, 239, 240 y 241, todas las cuales se proporcionan en la lista de secuencias y se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747. Como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747, el anticuerpo antiesclerostina de la divulgación puede comprender: a) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 54, 55 y 56 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 51, 52 y 53; b) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 60, 61 y 62 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 57, 58 y 59; c) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 48, 49 y 50 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 45, 46 y 47; d) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 42, 43 y 44 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 39, 40 y 41; e) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 275, 276 y 277 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 287, 288 y 289; f) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 278, 279 y 280 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 290, 291 y 292; g) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 78, 79 y 80 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 245, 246 y 247; h) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 81, 99 y 100 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 248, 249 y 250; i) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 101, 102 y 103 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 251, 252 y 253; j) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 104, 105 y 106 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 254, 255 y 256; k) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 107, 108 y 109 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 257, 258 y 259; l) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 110, 111 y 112 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 260, 261 y 262; m) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 281, 282 y 283 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 293, 294 y 295; n) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 113, 114 y 115 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 263, 264 y 265; o) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 284, 285 y 286 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 296, 297 y 298; p) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 116, 237 y 238 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 266, 267 y 268; q) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 239, 240 y 241 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 269, 270 y 271; r) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 242, 243 y 244 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 272, 273 y 274; o s) secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 351, 352 y 353 y secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 358, 359 y 360.

El anticuerpo antiesclerostina comprende secuencias de CDR que tiene un 100 % de identidad con CDR de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 en las que CDR-H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 245, CDR-H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 246, CDR-H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 247, CDR-L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 78, CDR-L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 79 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 80, todas las cuales se proporcionan en la lista de secuencias y se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747. El anticuerpo antiesclerostina, en diversos aspectos de la divulgación, comprende dos de las CDR o tres de las CDR o seis de las CDR. Opcionalmente, el anticuerpo antiesclerostina comprende cadenas pesadas que comprenden la SEQ ID NO: 378 y cadenas ligeras que comprenden la SEQ ID NO 376.

El anticuerpo antiesclerostina de la divulgación también puede comprender al menos una secuencia de CDR que tiene al menos un 75 % de identidad (por ejemplo, un 100 % idéntica) a una CDR seleccionada entre CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 en las que CDR-H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 269, CDR-H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 270, CDR-H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 271, CDR-L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 239, CDR-L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 240 y CDR-L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO 241, todas las cuales se proporcionan en la lista de secuencias y se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747. El anticuerpo antiesclerostina, en diversos aspectos de la divulgación, comprende dos de las CDR o tres de las CDR o seis de las CDR.

Como alternativa, el anticuerpo antiesclerostina puede tener una cadena pesada que comprende las CDR H1, H2 y H3 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 100 % idénticas a las SEQ ID NO: 245, 246 y 247, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las CDR L1, L2 y L3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 133 o una variante de la misma en la que dichas CDR son 100 % idénticas a las SEQ ID NO: 78, 79, y 80, respectivamente (como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747).

El anticuerpo antiesclerostina puede tener una cadena pesada que comprende las CDR H1, H2 y H3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en las SEQ ID NO: 145 o 392 o una variante de las mismas en la que dichas CDR son 100 % idénticas a las SEQ ID NO: 245, 246 y 247, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las CDR L1, L2 y L3 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 100 % idénticas a las SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente (como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747).

El anticuerpo antiesclerostina de la divulgación puede tener una cadena pesada que comprende las CDR H1, H2 y H3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en las SEQ ID NO: 335, 331, 345 o 396 o una variante de cualquiera de las anteriores en la que dichas CDR son al menos 75 % (por ejemplo, 100 % idénticas) idénticas a las SEQ ID NO: 269, 270 y 271, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las CDR L1, L2 y L3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en las SEQ ID NO: 334 o 341 o una variante de cualquiera de las anteriores en la que dichas CDR son al menos 75 % idénticas (por ejemplo, 100 % idénticas) a las SEQ ID NO: 239, 240 y 241, respectivamente (como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747). Todas las combinaciones de las secuencias de cadena pesada y ligera están contempladas por la divulgación (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 las SEQ ID NO: 334 o 341; y cadenas pesadas que comprenden las SEQ ID NO: 345 o 396 y cadenas ligeras que comprenden la SEQ ID NO: 341). La identidad de secuencia de variantes puede comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia.

El anticuerpo antiesclerostina puede tener una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en las 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; (como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747).

Ejemplos de anticuerpos antiesclerostina también incluyen, aunque sin limitación, los anticuerpos antiesclerostina desvelados en las publicaciones de patente internacional N° 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 antiesclerostina que comprende CDR de las SEQ ID NO: 20-25 de la publicación de patente internacional N° WO 2008/115732 (SEQ ID NO: 416-421 en el presente documento), un anticuerpo antiesclerostina que comprende CDR de las SEQ ID NO: 26-31 de la publicación de patente internacional N° WO 2008/115732 (SEQ ID NO: 422-427 en el presente documento), un anticuerpo antiesclerostina que comprende CDR de las SEQ ID NO: 32-37 de la publicación de patente internacional N° WO 2008/115732 (SEQ ID NO: 428-433 en el presente documento), un anticuerpo antiesclerostina que comprende CDR de las SEQ ID NO: 4, 15, 26, 37, 48 y 59 de la publicación de patente internacional N° WO 2009/047356 (SEQ ID NO: 443, 454, 465, 476, 487 y 498 en el presente documento), o un anticuerpo antiesclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos de al menos una de las SEQ ID NO: 135-143, 153-161 o 171-179 de la publicación de patente internacional N° WO 2010/130830 (SEQ ID NO: 745-753, 763-771 o 781-789 en el presente documento).

La invención también incluye administrar a un sujeto un anticuerpo antiesclerostina en combinación con uno o más agentes adicionalmente adecuados, administrándose cada uno de acuerdo con un régimen adecuado para ese agente activo. Las estrategias de administración incluyen administración concurrente (es decir, administración sustancialmente simultánea) y administración no concurrente (es decir, administración en diferentes momentos, en cualquier orden, ya sea que se solapen o no) del anticuerpo antiesclerostina y uno o más agentes adicionalmente adecuados. Se apreciará que diferentes componentes se administran opcionalmente en la misma o en composiciones independientes, y por las mismas o diferentes vías de administración.

Opcionalmente, el agente o agentes adicionales emplean un mecanismo de acción que difiere del anticuerpo antiesclerostina y proporcionan un beneficio para el sujeto. Agente o agentes adicionales adecuados incluyen, aunque sin limitación, calcio; vitaminas (por ejemplo, vitamina D); antirresortivos, tales como inhibidores de RANKL (por ejemplo, anticuerpos anti-RANKL tales como PROLIA®), bisfosfonatos (por ejemplo, alendronato sódico (FOSAMAX®), risedronato (ACTONEL®), ibandronato sódico (BONIVA®) o ácido zoledrónico (RECLAST®)), calcitonina, compuestos de estroncio (por ejemplo, ranelato de estroncio), moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM) (por ejemplo, raloxifeno), antagonistas de la catepsina K (por ejemplo, odanacatib) y derivados de estrógenos (por ejemplo, estrógeno conjugado equino); agentes anabólicos, tales como hormona paratiroidea o análogos de la misma (por ejemplo, teriparatida (FORTEO®), antibióticos, terapia hormonal y agentes

antiinflamatorios (por ejemplo, antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o sustancias antiinflamatorias esteroideas). La cantidad de agente adicional variará dependiendo del sujeto y la presencia o ausencia de necesidades terapéuticas adicionales. Por ejemplo, en diversas realizaciones, al sujeto se le administran al menos aproximadamente 1000 mg de calcio y al menos aproximadamente 400 UI de vitamina D a diario durante el periodo de tratamiento. A sujetos que tienen un nivel de vitamina D por debajo de 40 ng/ml se les administra opcionalmente una dosis inicial de 50.000 UI de vitamina D. En diversas realizaciones, el uno o más agentes adicionales se administran después del periodo de tratamiento como una terapia de mantenimiento.

Diversas vías de administración de un anticuerpo a un sujeto se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070110747. Por ejemplo, en diversas realizaciones, es deseable administrar una composición farmacéutica que comprenda el anticuerpo antiesclerostina por vía subcutánea, parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal. Dichos enfoques son bien conocidos por el experto en la materia, algunos de los cuales se describen adicionalmente, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.543.158; 5.641.515; y 5.399.363. Opcionalmente, el anticuerpo antiesclerostina se administra a la mujer postmenopáusica por vía subcutánea. Las formas (por ejemplo, farmacéuticas) ilustrativas fisiológicamente aceptables adecuadas para uso incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos N° 5.466.468). La forma debe ser estéril y deseablemente fluida en la medida en que exista facilidad de inyección mediante jeringa (es decir, no excesivamente viscosa para impedir el paso a través de una jeringa). Cualquier volumen de vehículo es apropiado para administrar el anticuerpo antiesclerostina; en ocasiones, el anticuerpo antiesclerostina se administra por vía subcutánea en un volumen de dos mililitros o menos (por ejemplo, 1,5 ml o menos, 1 ml o menos, 0,88 ml o menos, o 0,5 ml o menos). Se pueden emplear múltiples inyecciones para administrar una dosis deseada (por ejemplo, se administra una dosis deseada de 210 mg de anticuerpo antiesclerostina mediante dos inyecciones subcutáneas de 105 mg de anticuerpo antiesclerostina disueltos en 0,88 ml de vehículo). Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo antiesclerostina puede colocarse dentro de recipientes (por ejemplo, viales o jeringas), junto con material de envasado que proporciona instrucciones con respecto al uso de dichas composiciones farmacéuticas. Generalmente, tales instrucciones incluirán una expresión tangible que describe la concentración de reactivo, así como dentro de ciertas realizaciones, cantidades relativas de ingredientes excipientes o diluyentes (por ejemplo, agua, solución salina o PBS) que pueden ser necesarios para reconstituir la composición farmacéutica.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos. El ejemplo sirve solo para ilustrar la invención y no pretende limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo describe diversos ensayos de neutralización basados en células útiles para caracterizar la actividad de neutralización de un anticuerpo antiesclerostina.

Ensayo de mineralización basado en células MC3T3 - Se usan ácido ascórbico y el B-glicerofosfato para inducir la diferenciación de las células MC3T3-E1-BF que conduce al depósito de minerales. Un protocolo de cribado ejemplar, en formato de 96 pocillos, incluye sembrar las células el día 1, seguido de siete cambios de medios durante un período de 12 días, teniendo lugar la mayor parte del depósito de minerales en las últimas dieciocho horas. El momento específico y al alcance del depósito de minerales pueden variar dependiendo, en parte, del número de lote de suero particular que se esté usando. Los experimentos de control permitirán que se tengan en cuenta dichas variables, como es bien conocido en la técnica de la experimentación de cultivos celulares en general. Para el análisis estadístico (usando MS Excel y JMP), se puede usar un ANOVA de 1 vía seguido de comparación de Dunnett para determinar las diferencias entre los grupos. Las medias de los grupos para cada conjunto de datos se consideran significativamente diferentes cuando el valor P es menor de 0,05 ($P < 0,05$).

El cultivo celular para la expansión de células MC3T3-E1-BF se realiza de la siguiente manera. El cultivo celular se realiza a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se puede generar un banco de células para los fines de cribado de anticuerpos neutralizantes de esclerostina. Un vial de células MC3T3-E1-BF congeladas se descongela por 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 resuspenden en 4 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células usando azul de tripano y hemacitómetro, se siembran 1×10^6 células en 50 ml de medio Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu en un matraz T175.

Cuando este pase es confluyente (aproximadamente a los 7 días), las células se tripsinizan con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05 %, EDTA 0,53 mM), se centrifugan suavemente durante 5 minutos y a continuación se resuspenden en 5 ml de Alpha-MEM /FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células usando azul de tripano y hemacitómetro, las células se siembran a 1×10^5 células en 50 ml de medio Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu por un matraz T175. El número de matraces T175 usados para la siembra en este punto depende

del número total de células disponibles y el número deseado de matraces que se llevarán a la próxima etapa.

Cuando este pase 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 a continuación se resuspenden en 5 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células usando azul de tripano y hemacitómetro, las células se siembran a 1×10^6 células en 50 ml de medio Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu por un matraz T175. El número de matraces T175 usados para la siembra en este punto depende del número total de células disponibles y el número deseado de matraces que se llevarán a la próxima etapa.

Cuando este pase 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 a continuación se resuspenden en 5 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células usando azul de tripano y hemacitómetro, las células se siembran a 1×10^6 células en 50 ml de medio Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu por un matraz T175. El número de matraces T175 usados para la siembra en este punto depende del número total de células disponibles y el número deseado de matraces que se llevarán a la próxima etapa. Células adicionales se congelan a $1-2 \times 10^6$ células vivas/ml en FBS al 90 %/DMSO al 10 %.

Cuando este pase 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 a continuación se resuspenden en 5 ml de Alpha-MEM/FBS al 10 %/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células usando azul de tripano y hemacitómetro, las células se congelan a $1-2 \times 10^6$ células vivas/ml en FBS al 90 %/DMSO al 10 %. Este "pase final" de células congeladas es el pase usado para el ensayo de cribado.

El cultivo celular para mineralizar células MC3T3-E1-BF se realiza de la siguiente manera. El cultivo celular se realiza a 37 °C y CO₂ al 5 %. Es deseable minimizar las fluctuaciones de temperatura y % de CO₂ durante el procedimiento de cultivo celular de mineralización. Un número apropiado de viales de "pase final" preparados como se ha descrito anteriormente se descongelan por 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 resuspenden en 4 ml de Alpha-MEM/FBS al 10%/PenStrepGlu. Después de determinar el número de células con azul de tripano y hematocitómetro, se siembran 2500 células en 200 microlitros de medio de expansión por pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno I (Becton Dickinson Labware, n° de cat. 354407).

Un procedimiento de cultivo celular ejemplar es el siguiente. El día de inicio para sembrar las células está indicado que es un miércoles. Si se usa un día diferente de la semana como día de inicio para sembrar las celdas, ese día se activará el programa diario para retirar y añadir medios durante todo el proceso como se indica a continuación. Por ejemplo, si las células se siembran un martes, los medios no se deben retirar y añadir el primer viernes y sábado, ni el segundo viernes y sábado. Con un inicio en martes, las placas se prepararían para el análisis de calcio el domingo final. Las células se siembran un miércoles a 2500 células en 200 µl de medio de expansión. El jueves, todo el medio de expansión se retira 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 fresco. El lunes se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación fresco. El martes se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación fresco. El miércoles se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación fresco. El jueves se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación fresco. El viernes se retiran 100 µl de medio y se añaden 100 µl de medio de diferenciación fresco. El lunes siguiente se preparan placas para el ensayo de calcio de la siguiente manera: las placas se lavan una vez con Tris 10 mM, HCl pH 7-8. Trabajando bajo una campana extractora de humos, se añaden 200 µl de HCl 0,5 N por pocillo. Las placas se congelan a -80 °C. Justo antes de medir el calcio, las placas se congelan-descongelan dos veces, y a continuación se usa la trituración con una pipeta multicanal para dispersar el contenido de la placa. El contenido de la placa se deja sedimentar a continuación a 4 °C durante 30 minutos, momento en el cual se retira una cantidad apropiada de sobrenadante para medir el calcio usando un kit de calcio disponible en el mercado. Un kit ejemplar y no limitante es Calcium (CPC) Liquicolor, N° de Cat. 0150-250, Stanbio Laboratory, Boerne, TX.

En este ensayo basado en células, la esclerostina inhibe una o más de las secuencias de acontecimientos que conducen hasta e incluyen el depósito mineral (es decir, la esclerostina inhibe la mineralización). Por lo tanto, en experimentos en los que se incluye esclerostina en el experimento de cultivo celular particular, la esclerostina recombinante se añade a los medios comenzando el primer jueves y cada día de alimentación posterior. En los casos en que un anticuerpo antiesclerostina se evalúa para la capacidad para neutralizar la esclerostina, es decir, permitir la mineralización al neutralizar la capacidad de la esclerostina para inhibir la mineralización, el anticuerpo se añade a los medios a partir del primer jueves y cada día de alimentación posterior. El anticuerpo se preincubó con la esclerostina recombinante en medio de diferenciación durante 45-60 minutos a 37 °C y a continuación este medio se usó para alimentar a las células.

Se ha descrito anteriormente un protocolo de mineralización de 12 días para células MC3T3-E1-BF. La mineralización de las células MC3T3-E1 originales es inhibida por la esclerostina recombinante y esta inhibición se

bloquea usando un anticuerpo neutralizante antiesclerostina, por ejemplo, un anticuerpo antiesclerostina que comprende CDR de las SEQ ID NO: 245-247 y 78-80. El ensayo de neutralización basado en células se describe adicionalmente en la publicación de patente de Estados Unidos N° 7.592.429, por ejemplo, en el ejemplo 8.

5 *Ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso* - Un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso ejemplar se describe en la publicación de patente internacional N° WO 2008/115732 y la patente de Estados Unidos N° 7.744.874. Un protocolo ejemplar es el siguiente. Se siembran células C2C12 (ATCC, CRL 1772) a 3000-5000 células/pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos en medio MEM suplementado con suero fetal de ternero al 5 %. La placa se incuba a 37 °C en CO₂ al 5 % durante una noche. El anticuerpo se diluye en 0,5 X medio
10 acondicionado con Wnt3a (preparado como se describe en el documento WO 2008/115732) a diversas concentraciones finales. El medio se retira de las células sembradas y se añade una solución de anticuerpo BMP4-esclerostina premezclada (ser humano o macaco cangrejero) (150 µl), proporcionando 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 final de proteína esclerostina de 1,0 µg/ml, y el medio acondicionado está a una concentración de 0,5X. La placa se incuba a
15 37 °C en CO₂ al 5 % durante 72 horas. El medio se retira de las células, que se lavan una vez con PBS y se congelan y descongelan tres veces alternando entre -80 °C y 37 °C. La actividad de fosfatasa alcalina se mide añadiendo sustrato de fosfatasa alcalina (PNPP en 1 etapa, Pierce # 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 (DO) a 405 nm para determinar la actividad de fosfatasa alcalina. Los cálculos de CI₅₀ pueden realizarse usando, por ejemplo, el
20 asistente SigmaPlot Regression Wizard con una ecuación de ajuste sigmoidal de 4 parámetros.

Ensayo de mineralización de células MC3T3 inducida por BMP2 - Un ensayo ejemplar de mineralización inducida por BMP2 en células MC3T3 se describe en la publicación de patente internacional N° WO 2009/047356. En resumen, se siembran células MC3T3b en placas de 96 pocillos (por ejemplo, 6 x 10³ células/pocillo o 2 x 10³
25 células/pocillo) en 100 µl de medio de cultivo de ensayo (medio de cultivo de mantenimiento sin G418) y se incuban durante tres días hasta alcanzar la confluencia. El medio de cultivo de ensayo se cambia y los compuestos a ensayar se añaden con b-glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 µM. Antes de la adición a las células, la esclerostina y un anticuerpo candidato se preincuban en una placa independiente durante dos horas a temperatura ambiente. A las 96 placas de pocillos de ensayo, se les aplica BMP-2 2,1 o 2,8 nM (R&D Systems, N° de 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 las placas se congelan a -20 °C durante un mínimo de 24 horas. Las placas se descongelan a temperatura ambiente durante 2 horas para el ensayo. Se transfieren diez microlitros de cada pocillo a una placa nueva y se exponen a la solución de trabajo de calcio (1:5) (200 µl). La densidad óptica se mide después de un período 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 patrón, lo que permite determinar el grado de mineralización inducida por BMP-2.

Ensayo de señalización wnt basado en células - Un ensayo de señalización basado en células ejemplar empleando proteína indicadora super top flash (STF) se describe en la publicación de patente internacional N° WO 2009/047356. Se transfectan células HEK293 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 Wnt1. Los plásmidos se mezclan con 1,6 µl de Lipofectamine 2000 diluido en 50 µl de OptiMEM® y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la aplicación a las células. Una vez aplicadas, las células se incuban a 37 °C en CO₂ al 5 % durante cinco horas.

Los anticuerpos se premezclan 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 después de retirar la mezcla de transfección. Las células se incuban con las mezclas de anticuerpo-SOST durante 18-20 horas. Al final de la incubación, se retira el medio y se añaden 300 µl de tampón Passive Lysis Buffer 1X (Promega, n.º de cat. E194A) a las células de lisis. La actividad de luciferasa se mide a continuación usando el sistema Dual-Glo Luciferase System (Promega, n.º cat. E2940) con 30 µl de lisados por duplicado. Normalmente, se utilizan 30 µl de luciferasa Dual-Glo (luciferasa de luciérnaga; para STF) y 30 µl de sustratos Dual-Glo Stop and Glo (luciferasa de *Renilla*; para el control de la eficacia de la transfección). Las señales luminiscentes se miden con el instrumento Mithras LB940 (Berthold Technologies). Se calcula la proporción de luciferasa de luciérnaga respecto a *Renilla*. Los resultados finales se expresan estableciendo el valor de Wnt1 sin SOST como 1. Detalles adicionales del ensayo se proporcionan en la publicación de patente internacional N° WO 2009/047356.

Ejemplo 2

60 Este ejemplo describe estudios *in vivo* en los que un anticuerpo antiesclerostina mejoraba la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas.

Se llevó a cabo un estudio multicéntrico, internacional, aleatorizado, de grupos paralelos en mujeres postmenopáusicas con baja DMO en las vértebras lumbares, toda la cadera o el cuello femoral. 419 sujetos fueron aleatorizados para recibir uno de los cinco regímenes de un anticuerpo antiesclerostina, placebo, alendronato sin

anonimato (ALN) o teriparatida sin anonimato (TPTD), durante un año. El grupo de placebo se aleatorizó adicionalmente para que coincidiera con los programas correspondientes a los cinco regímenes de anticuerpo antiesclerostina. La distribución de sujetos fue la siguiente: 52 sujetos para el grupo de placebo, 51 sujetos para el grupo de ALN, 55 sujetos para el grupo de TPTD, y 51, 54, 51, 53 y 52 sujetos para los grupos de anticuerpo antiesclerostina 70 mg QM, 140 mg Q3M, 140 mg QM, 210 mg Q3M y 210 mg QM, respectivamente. 383 sujetos completaron los 12 meses de estudio. Entre todos los sujetos inscritos en el estudio, la edad media fue de 66,8 años, el 86,4 % de los sujetos eran caucásicos, y las puntuaciones T iniciales de DMO medias de las vértebras lumbares y de cadera total fueron -2,29 y -1,53, respectivamente. El análisis primario se produjo después de que todos los sujetos tuvieron la oportunidad de completar la visita de estudio del mes 12. La DMO se midió con DXA. En general, las proporciones de pacientes que notificaron acontecimientos adversos estuvieron equilibradas entre los grupos con placebo y los grupos con anticuerpos antiesclerostina.

Densidad mineral ósea

Cambio porcentual de la DMO de las vértebras lumbares respecto al valor inicial previo al tratamiento el mes 6: el mes 6, el cambio porcentual medio de la DMO de las vértebras lumbares respecto al valor inicial previo al tratamiento en los grupos de control fue del 0,3 % en el grupo de placebo, el 2,6 % en el grupo de alendronato y el 4,8 % en el grupo de TPTD. En los grupos de anticuerpo antiesclerostina, el cambio porcentual medio de la DMO de las vértebras lumbares respecto al valor inicial previo al tratamiento fue del 4,1 % en el grupo de 70 mg QM, el 4,2 % en el grupo de 140 mg Q3M, el 4,4 % en el grupo de 210 mg Q3M, el 7,1 % en el grupo de 140 mg QM y el 8,2 % en el grupo de 210 mg QM. En comparación con el grupo de placebo, cada uno de los grupos de anticuerpo antiesclerostina aumentó significativamente la DMO de las vértebras lumbares el mes 6 (valores $p < 0,0001$).

Cambio porcentual de la DMO de las vértebras lumbares respecto al valor inicial previo al tratamiento el mes 12: el mes 12, el cambio porcentual medio de la DMO de las vértebras lumbares respecto al valor inicial previo al tratamiento en los grupos de control fue del -0,1 % en el grupo de placebo, el 4,1 % en el grupo de alendronato y el 7,1 % en el grupo de TPTD. En los grupos de anticuerpo antiesclerostina, el cambio porcentual medio de la DMO de las vértebras lumbares respecto al valor inicial previo al tratamiento fue del 5,4 % en el grupo de 70 mg QM, el 5,4 % en el grupo de 140 mg Q3M, el 5,5 % en el grupo de 210 mg Q3M, el 9,1 % en el grupo de 140 mg QM y el 11,3 % en el grupo de 210 mg QM. Cada uno de los grupos de anticuerpo antiesclerostina aumentó significativamente la DMO de las vértebras lumbares el mes 12 (valores $p < 0,0001$) después del ajuste para multiplicidad. El cambio porcentual medio respecto al valor inicial previo al tratamiento en la DMO de las vértebras lumbares por visita y comparaciones con los controles sin anonimato activos se resume en la tabla A.

TABLA A: DMO de las vértebras lumbares % de cambio respecto al valor inicial a los 12 meses

	Placebo	ALN	TPTD	Ab-5				
				70 mg QM	140 mg Q3M	140 mg QM	210 mg Q3M	210 mg QM
Media	-0,1	4,1	7,1	5,4	5,4	9,1	5,5	11,3
Diferencia respecto a placebo (Media)				5,5	5,6	9,2	5,6	11,5
Diferencia respecto a ALN (Media)				1,3	1,4	5,0	1,5	7,3
Diferencia respecto a TPTD (Media)				-1,8	-1,7	2,0	-1,6	4,2

Cambio porcentual de la DMO de toda la cadera respecto al valor inicial previo al tratamiento los meses 12 y 6: el mes 12, el cambio porcentual medio de la DMO de toda la cadera respecto al valor inicial previo al tratamiento en los grupos de control fue del -0,7 % en el grupo de placebo, el 1,9 % en el grupo de alendronato y el 1,3 % en el grupo de TPTD. En los grupos de anticuerpo antiesclerostina, el cambio porcentual medio de la DMO de toda la cadera respecto al valor inicial previo al tratamiento fue del 1,3 % en el grupo de 70 mg QM, el 1,3 % en el grupo de 140 mg Q3M, el 1,9 % en el grupo de 210 mg Q3M, el 3,4 % en el grupo de 140 mg QM y el 4,1 % en el grupo de 210 mg QM. En comparación con el grupo de placebo, cada uno de los grupos de anticuerpo antiesclerostina aumentó significativamente la DMO de toda la cadera el mes 12 (valores $p < 0,0001$). El mes 6, el aumento de la DMO de toda la cadera en cada uno de los grupos de anticuerpo antiesclerostina fue significativamente mayor que aquel en el grupo de placebo (valores $p < 0,0061$). El cambio porcentual medio respecto al valor inicial previo al tratamiento de la DMO de toda la cadera por visita y comparaciones con los controles sin anonimato activos a los 12 meses se muestra en la tabla B.

TABLA B: DMO de toda la cadera % de cambio respecto al valor inicial a los 12 meses

				Ab-5				
	Placebo	ALN	TPTD	70 mg QM	140 mg Q3M	140 mg QM	210 mg Q3M	210 mg QM
Media	-0,7	1,9	1,3	1,3	1,3	3,4	1,9	4,1
Diferencia respecto a placebo (Media)				2,0	2,1	4,1	2,6	4,9
Diferencia respecto a ALN (Media)				-0,7	-0,6	1,5	0,0	2,2
Diferencia respecto a TPTD (Media)				-0,1	0,0	2,1	0,6	2,8

Cambio porcentual de la DMO del cuello femoral respecto al valor inicial previo al tratamiento los meses 12 y 6: el mes 12, el cambio porcentual medio de la DMO del cuello femoral respecto al valor inicial previo al tratamiento en los grupos de control fue del -1,1 % en el grupo de placebo, el 1,2 % en el grupo de alendronato y el 1,1 % en el grupo de TPTD. En los grupos de anticuerpo antiesclerostina, el cambio porcentual medio de la DMO del cuello femoral respecto al valor inicial previo al tratamiento fue del 0,6 % en el grupo de 70 mg QM, el 1,8 % en el grupo de 140 mg Q3M, el 1,4 % en el grupo de 210 mg Q3M, el 4,2 % en el grupo de 140 mg QM, y el 3,7 % en el grupo de 210 mg QM. En comparación con el grupo de placebo, cada uno de los grupos de anticuerpo antiesclerostina aumentó significativamente la DMO del cuello femoral el mes 12 (valores $p < 0,0044$). El mes 6, el aumento de la DMO del cuello femoral en los grupos de anticuerpo antiesclerostina 140 mg QM, 210 mg QM y 210 mg Q3M fue significativamente mayor que aquel en el grupo de placebo (valores $p \leq 0,0164$). El aumento no fue significativamente diferente del placebo en el grupo de anticuerpo antiesclerostina 70 mg QM y el grupo de 140 mg Q3M (las dosis más bajas para cada programa). El cambio porcentual medio respecto al valor inicial previo al tratamiento de la DMO del cuello femoral por visita y comparaciones con los controles sin anonimato activos se resume en la tabla C.

TABLA C: DMO del cuello femoral % de cambio respecto al valor inicial a los 12 meses

				Ab-5				
	Placebo	ALN	TPTD	70 mg QM	140 mg Q3M	140 mg QM	210 mg Q3M	210 mg QM
Media	-1,1	1,2	1,1	0,6	1,8	4,2	1,4	3,7
Diferencia respecto a placebo (Media)				1,8	2,9	5,3	2,5	4,8
Diferencia respecto a ALN (Media)				-0,6	0,69	3,0	0,2	2,5
Diferencia respecto a TPTD (Media)				-0,5	0,6	3,1	0,3	2,6

Cambio porcentual de la DMO del 1/3 distal del radio respecto al valor inicial previo al tratamiento el mes 12: el mes 12, el cambio porcentual medio de la DMO del 1/3 distal del radio respecto al valor inicial previo al tratamiento en los grupos de control fue del -0,9 % en el grupo de placebo, el -0,3 % en el grupo de alendronato y el -1,7 % en el grupo de TPTD. En los grupos de anticuerpo antiesclerostina, el cambio porcentual medio de la DMO del cuello femoral respecto al valor inicial previo al tratamiento fue del -1,8 % en el grupo de 70 mg QM, el -1,1 % en el grupo de 140 mg Q3M, el -0,4 % en el grupo de 210 mg Q3M, el -1,0 % en el grupo de 140 mg QM y el -1,2 % en el grupo de 210 mg QM. En comparación con el grupo de placebo, no hay ninguna disminución significativa en el 1/3 distal del radio el mes 12 en cualquiera de los grupos de anticuerpo antiesclerostina.

Marcadores óseos

Cambio porcentual del marcador de resorción ósea (CTX): Para todas las dosis de anticuerpo antiesclerostina, el CTX sérico disminuía inicialmente respecto al valor inicial previo al tratamiento. La disminución mediana más grande para todos los anticuerpos antiesclerostina fue en la semana 1 y las dosis más altas se mantuvieron por debajo del valor inicial previo al tratamiento hasta durante 12 meses.

Cambio porcentual de marcadores de formación ósea (P1NP, BSAP y osteocalcina (OC)): Para todas las dosis de anticuerpo antiesclerostina, P1NP, BSAP y OC aumentaron respecto al valor inicial previo al tratamiento en la semana 1, alcanzaron un máximo el mes 1, y volvieron al valor inicial previo al tratamiento entre el mes 2 y el mes 6. Al final de la observación durante 12 meses, los marcadores de formación ósea disminuyeron a niveles en o por debajo del valor inicial previo al tratamiento. En general, los tres marcadores de formación ósea exhibieron perfiles similares.

Este ejemplo ilustra la capacidad del método de la invención de aumentar significativamente la DMO en las vértebras lumbares, toda la cadera y el cuello femoral. Las dos dosis mensuales más elevadas, 140 mg QM y 210 mg QM, aumentaron significativamente la DMO en las vértebras lumbares, toda la cadera y el cuello femoral en

comparación con dos comparadores activos, teriparatida (QD) y alendronato (QW). La magnitud de los aumentos de la DMO mediados por anticuerpo antiesclerostina seguía un patrón de respuesta a la dosis.

La disminución de la resorción ósea asociada con el tratamiento con anticuerpos antiesclerostina evaluada con CTX sérico se observó en la semana 1 (punto temporal medido más temprano) y los regímenes QM se mantuvieron por debajo del valor inicial previo al tratamiento durante los 12 meses completos. Los marcadores de formación ósea aumentaron temprano después del inicio del tratamiento con anticuerpo antiesclerostina y disminuyeron con el tiempo de una manera dependiente de la dosis, en el que las dosis más altas se asociaron con marcadores incrementados durante un período de tiempo más prolongado. Los niveles del marcador de formación ósea disminuyeron aproximadamente a los niveles iniciales previos al tratamiento en el plazo de los dos a seis meses posteriores al inicio del tratamiento. No se observó una respuesta adaptativa similar para alendronato o teriparatida. Por ejemplo, los marcadores de formación ósea se mantuvieron elevados a lo largo del tratamiento con teriparatida. Sorprendentemente, la DMO en sujetos que recibieron anticuerpos antiesclerostina continuó aumentando a pesar de la normalización de los niveles del marcador (es decir, declive de los niveles de marcadores de formación ósea desde niveles máximos iniciales y retorno de los niveles de resorción ósea hacia niveles iniciales). En el grupo de 140 mg QM, por ejemplo, la DMO de las vértebras lumbares aumentó aproximadamente un 2 % desde el mes seis hasta el mes doce del período de tratamiento, mientras que los marcadores de formación ósea se encontraban aproximadamente a los niveles iniciales previos al tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antiesclerostina que comprende una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 245, una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 246, una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 247, una CDR-L1 de la SEQ ID NO: 78, una CDR-L2 de la SEQ ID NO: 79 y una CDR-L3 de la SEQ ID NO: 80, para uso en un método para aumentar la densidad mineral ósea en una mujer postmenopáusica, comprendiendo el método administrar, a una mujer postmenopáusica que tiene una puntuación T de las vértebras lumbares de menos de o igual a -2, dicho anticuerpo antiesclerostina en una cantidad y durante un periodo de tratamiento eficaces para aumentar la densidad mineral ósea (DMO) de las vértebras lumbares al menos un 9 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina; en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de 140 mg a 210 mg y la cantidad del anticuerpo antiesclerostina se administra a un intervalo con una frecuencia no superior a una vez al mes.
2. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mujer postmenopáusica padece osteoporosis y/o corre un riesgo aumentado o elevado de fractura y/o ha dejado o es intolerante a otra terapia para osteoporosis disponible.
3. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo antiesclerostina se administra en una cantidad y durante un periodo de tratamiento eficaces para aumentar la DMO de las vértebras lumbares al menos una desviación estándar respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina.
4. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina se administra a una frecuencia de una vez al mes durante un periodo de tratamiento de tres meses a 18 meses.
5. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de 210 mg.
6. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que
 - (i) la cantidad y el periodo de tratamiento son eficaces para reducir el riesgo de fracturas vertebrales y/o no vertebrales; y/o
 - (ii) la cantidad y el periodo de tratamiento son eficaces para aumentar la DMO de toda la cadera al menos un 3 % respecto al valor inicial previo al tratamiento a los doce meses después de la administración inicial del anticuerpo antiesclerostina.
7. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo antiesclerostina es una inmunoglobulina que comprende cadenas pesadas y cadenas ligeras.
8. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo antiesclerostina es un anticuerpo de IgG.
9. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo antiesclerostina
 - (i) demuestra una afinidad de unión por esclerostina de la SEQ ID NO: 1 de menos de o igual a 1×10^{-7} M;
 - (ii) es capaz de neutralizar esclerostina humana en un ensayo de mineralización basado en células MC3T3 cuando el número de moles de sitios de unión a esclerostina por pocillo es menos de 6 veces superior en comparación con el número de moles de esclerostina por pocillo;
 - (iii) tiene una CI_{50} de 100 nM o menos, 50 nM o menos, o 25 nM o menos para neutralizar esclerostina humana en un ensayo basado en células, tal como un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso;
 - (iv) tiene una CI_{50} de 100 nM o menos para neutralizar esclerostina humana en un ensayo de señalización Wnt basado en células en líneas celulares HEK293;
 - (v) tiene una CI_{50} de 500 nM o menos para neutralizar esclerostina humana en un ensayo de mineralización inducida por BMP2 en células MC3T3;
 - (vi) se une a un polipéptido de esclerostina que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 1, en el que dicho anticuerpo antiesclerostina se une a la secuencia de la SEQ ID NO: 6; o
 - (vii) bloquea de forma cruzada la unión de al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-1, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-12, Ab-19, Ab-20, Ab-23 y Ab-24 a esclerostina y/o su unión a esclerostina es bloqueada de forma cruzada por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-1, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-12, Ab-19, Ab-20, Ab-23 y Ab-24.
10. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el anticuerpo antiesclerostina

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

- 5 11. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el anticuerpo antiesclerostina es
 - (i) un anticuerpo monoclonal; y/o
 - (ii) un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.
- 10 12. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que un antirresortivo es administrado al ser humano después del periodo de tratamiento, opcionalmente un periodo de tratamiento de 12 meses.
- 15 13. El anticuerpo antiesclerostina para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el antirresortivo es:
 - (i) un bisfosfonato;
 - (ii) un inhibidor de RANKL;
 - (iii) un inhibidor de RANKL en el que el inhibidor de RANKL es un anticuerpo anti-RANKL; o
 - 20 (iv) un inhibidor de RANKL en el que el inhibidor de RANKL es el anticuerpo anti-RANKL denosumab.

FIGURA 1

Descripción de la secuencia	Secuencia
CDR-L1 de Ab-A y Ab-1	QSSQSVYDNNWLA (SEQ ID NO: 54)
CDR-L2 de Ab-A y Ab-1	DASDLAS (SEQ ID NO: 55)
CDR-L3 de Ab-A y Ab-1	QGAYNDVTYA (SEQ ID NO: 56)
CDR-H1 de Ab-A y Ab-1	SYWMN (SEQ ID NO: 51)
CDR-H2 de Ab-A y Ab-1	TIDSGGRTDYASWAKG (SEQ ID NO: 52)
CDR-H3 de Ab-A y Ab-1	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 ligera de Ab-1 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 75
Región variable pesada de Ab-1 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 77
CDR-L1 de Ab-B	SASSSVSFVD (SEQ ID NO: 60)
CDR-L2 de Ab-B	RTSNLGF (SEQ ID NO: 61)
CDR-L3 de Ab-B	QQRSTYPPT (SEQ ID NO: 62)
CDR-H1 de Ab-B	TSGMGVG (SEQ ID NO: 57)
CDR-H2 de Ab-B	HIWWDDVKRYNPVLKS (SEQ ID NO: 58)
CDR-H3 de Ab-B	EDFDYDEEYYAMDY (SEQ ID NO: 59)
Cadena ligera de Ab-B	SEQ ID NO: 31
Cadena pesada de Ab-B	SEQ ID NO: 35
CDR-L1 de Ab-C	KASQSVDYDGD SYMN (SEQ ID NO: 48)
CDR-L2 de Ab-C	AASNLES (SEQ ID NO: 49)
CDR-L3 de Ab-C	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 50)
CDR-H1 de Ab-C	DCYMN (SEQ ID NO: 45)
CDR-H2 de Ab-C	DINPFNGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 46)
CDR-H3 de Ab-C	SHYYFDGRVPWDAMDY (SEQ ID NO: 47)
Cadena ligera de Ab-C	SEQ ID NO: 15
Cadena pesada de Ab-C	SEQ ID NO: 19
CDR-L1 de Ab-D	QASQGTSINLN (SEQ ID NO: 42)
CDR-L2 de Ab-D	GSSNLED (SEQ ID NO: 43)
CDR-L3 de Ab-D	LQHSYLPYT (SEQ ID NO: 44)
CDR-H1 de Ab-D	DHYMS (SEQ ID NO: 39)
CDR-H2 de Ab-D	DINPYSGETTYNQKFKG (SEQ ID NO: 40)
CDR-H3 de Ab-D	DDYDASPFAY (SEQ ID NO: 41)
Cadena ligera de Ab-D	SEQ ID NO: 7
Cadena pesada de Ab-D	SEQ ID NO: 11
CDR-L1 de Ab-2	RASSSVYYMH (SEQ ID NO: 275)
CDR-L2 de Ab-2	ATSNLAS (SEQ ID NO: 276)
CDR-L3 de Ab-2	QQWSSDPLT (SEQ ID NO: 277)
CDR-H1 de Ab-2	DYFIH (SEQ ID NO: 287)
CDR-H2 de Ab-2	RLDPEDGESDYAPKFQD (SEQ ID NO: 288)
CDR-H3 de Ab-2	EDYDGTYYTFFPY (SEQ ID NO: 289)
Cadena ligera de Ab-2	SEQ ID NO: 117
Cadena pesada de Ab-2	SEQ ID NO: 121
CDR-L1 de Ab-3 y Ab-15	SVSSTISSNHLH (SEQ ID NO: 278)
CDR-L2 de Ab-3 y Ab-15	GTSNLAS (SEQ ID NO: 279)
CDR-L3 de Ab-3 y Ab-15	QQWSSYPLT (SEQ ID NO: 280)
CDR-H1 de Ab-3 y Ab-15	DFYLH (SEQ ID NO: 290)

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
CDR-H2 de Ab-3 y Ab-15	RIDPENGDTLYDPKFQD (SEQ ID NO: 291)
CDR-H3 de Ab-3 y Ab-15	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 ligera de Ab-15	SEQ ID NO: 384
Región variable 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
CDR-L1 de Ab-4 y Ab-5	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 78)
CDR-L2 de Ab-4 y Ab-5	YTSRLLS (SEQ ID NO: 79)
CDR-L3 de Ab-4 y Ab-5	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 80)
CDR-H1 de Ab-4 y Ab-5	DYNMH (SEQ ID NO: 245)
CDR-H2 de Ab-4 y Ab-5	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 246)
CDR-H3 de Ab-4 y Ab-5	LGYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 247)
Cadena ligera de Ab-4	SEQ ID NO: 133
Cadena pesada de Ab-4	SEQ ID NO: 137
Región variable ligera de Ab-5	SEQ ID NO: 376
Región variable 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
CDR-L1 de Ab-6	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 81)
CDR-L2 de Ab-6	YTSRLHS (SEQ ID NO: 99)
CDR-L3 de Ab-6	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 100)
CDR-H1 de Ab-6	DYNMH (SEQ ID NO: 248)
CDR-H2 de Ab-6	EINPNSGGSGYNQKFKG (SEQ ID NO: 249)
CDR-H3 de Ab-6	LVYDGSYEDWYFDV (SEQ ID NO: 250)
Cadena ligera de Ab-6	SEQ ID NO: 149
Cadena pesada de Ab-6	SEQ ID NO: 153
CDR-L1 de Ab-7	RASQVITNYLY (SEQ ID NO: 101)
CDR-L2 de Ab-7	YTSRLHS (SEQ ID NO: 102)
CDR-L3 de Ab-7	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 103)
CDR-H1 de Ab-7	DYNMH (SEQ ID NO: 251)
CDR-H2 de Ab-7	EINPNSGGAGYNQQFKG (SEQ ID NO: 252)
CDR-H3 de Ab-7	LGYVGNIEDWYFDV (SEQ ID NO: 253)
Cadena ligera de Ab-7	SEQ ID NO: 157
Cadena pesada de Ab-7	SEQ ID NO: 161
CDR-L1 de Ab-8	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 104)
CDR-L2 de Ab-8	YTSRLLS (SEQ ID NO: 105)
CDR-L3 de Ab-8	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 106)
CDR-H1 de Ab-8	DYNMH (SEQ ID NO: 254)
CDR-H2 de Ab-8	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 255)
CDR-H3 de Ab-8	LGYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 256)
Cadena ligera de Ab-8	SEQ ID NO: 165
Cadena pesada de Ab-8	SEQ ID NO: 169
CDR-L1 de Ab-9	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 107)
CDR-L2 de Ab-9	YTSRLFS (SEQ ID NO: 108)
CDR-L3 de Ab-9	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 109)
CDR-H1 de Ab-9	DYNMH (SEQ ID NO: 257)

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
CDR-H2 de Ab-9	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 258)
CDR-H3 de Ab-9	LGYDDIYDDWYFDV (SEQ ID NO: 259)
Cadena ligera de Ab-9	SEQ ID NO: 173
Cadena pesada de Ab-9	SEQ ID NO: 177
CDR-L1 de Ab-10	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: HO)
CDR-L2 de Ab-10	YTSRLLS (SEQ ID NO: 111)
CDR-L3 de Ab-10	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 112)
CDR-H1 de Ab-10	DYNMH (SEQ ID NO: 260)
CDR-H2 de Ab-10	EINPNSGGAGYNQKFKG (SEQ ID NO: 261)
CDR-H3 de Ab-10	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 CDR-L1 de Ab-11 y Ab-16	RASSISYIH (SEQ ID NO: 281)
CDR-L2 de Ab-11 y Ab-16	ATSNLAS (SEQ ID NO: 282)
CDR-L3 de Ab-11 y Ab-16	QQWSSDPLT (SEQ ID NO: 283)
CDR-H1 de Ab-11 y Ab-16	DYYIH (SEQ ID NO: 293)
CDR-H2 de Ab-11 y Ab-16	RVDPDNGETEFAPKFG (SEQ ID NO: 294)
CDR-H3 de Ab-11 y Ab-16	EDYDGTWTFPY (SEQ ID NO: 295)
Cadena ligera de Ab-11	SEQ ID NO: 189
Cadena pesada de Ab-11	SEQ ID NO: 193
Región variable ligera de Ab-16	SEQ ID NO: 388
Región variable 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
CDR-L1 de Ab-12	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 113)
CDR-L2 de Ab-12	YTSTLQS (SEQ ID NO: 114)
CDR-L3 de Ab-12	QQGDTLPYT (SEQ ID NO: 115)
CDR-H1 de Ab-12	DYNMH (SEQ ID NO: 263)
CDR-H2 de Ab-12	EINPNSGGSGYNQKFKG (SEQ ID NO: 264)
CDR-H3 de Ab-12	LGYGNYEDWYFDV (SEQ ID NO: 265)
Cadena ligera de Ab-12	SEQ ID NO: 197
Cadena pesada de Ab-12	SEQ ID NO: 201
CDR-L1 de Ab-13 y Ab-14	RASSVTSSYLN (SEQ ID NO: 284)
CDR-L2 de Ab-13 y Ab-14	STSNLAS (SEQ ID NO: 285)
CDR-L3 de Ab-13 y Ab-14	QQYDFPST (SEQ ID NO: 286)
CDR-H1 de Ab-13 y Ab-14	DYYMN (SEQ ID NO: 296)
CDR-H2 de Ab-13 y Ab-14	DINPYNDDTTYNHKFKG (SEQ ID NO: 297)
CDR-H3 de Ab-13 y Ab-14	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 ligera de Ab-14	SEQ ID NO: 380
Región variable 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
CDR-L1 de Ab-17 y Ab-18	SVSSSISSNLH (SEQ ID NO: 116)
CDR-L2 de Ab-17 y Ab-18	GTSNLAS (SEQ ID NO: 237)
CDR-L3 de Ab-17 y Ab-18	QQWTTTYT (SEQ ID NO: 238)
CDR-H1 de Ab-17 y Ab-18	DYYIH (SEQ ID NO: 266)

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
CDR-H2 de Ab-17 y Ab-18	RIDPDNGESTYVPKFQG (SEQ ID NO: 267)
CDR-H3 de Ab-17 y Ab-18	EGLDYGDIYAVDY (SEQ ID NO: 268)
Región variable ligera de Ab-17 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 299
Región variable pesada de Ab-17 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 301
Región variable ligera de Ab-18 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 303
Región variable pesada de Ab-18 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 305
CDR-L1 de Ab-19, Ab-20 y Ab-23	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 239)
CDR-L2 de Ab-19, Ab-20 y Ab-23	STSRLNS (SEQ ID NO: 240)
CDR-L3 de Ab-19, Ab-20 y Ab-23	QQDIKHPT (SEQ ID NO: 241)
CDR-H1 de Ab-19, Ab-20 y Ab-23	DYIMH (SEQ ID NO: 269)
CDR-H2 de Ab-19, Ab-20 y Ab-23	YINPYNDDEYNEKFKG (SEQ ID NO: 270)
CDR-H3 de Ab-19, Ab-20 y Ab-23	SIYYDAPFAY (SEQ ID NO: 271)
Región variable ligera de Ab-19	SEQ ID NO: 314
Región variable 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 ligera de Ab-20 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 311
Región variable pesada de Ab-20 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 313
Región variable ligera de Ab-23	SEQ ID NO: 364
Región variable 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
CDR-L1 de Ab-21 y Ab-22	KASQDVFTAVA (SEQ ID NO: 242)
CDR-L2 de Ab-21 y Ab-22	WASTRHT (SEQ ID NO: 243)
CDR-L3 de Ab-21 y Ab-22	QQYSSYPLT (SEQ ID NO: 244)
CDR-H1 de Ab-21 y Ab-22	DYYMH (SEQ ID NO: 272)
CDR-H2 de Ab-21 y Ab-22	RIDPENGDIIDPKFQG (SEQ ID NO: 273)
CDR-H3 de Ab-21 y Ab-22	DAGDPAWFTY (SEQ ID NO: 274)
Región variable ligera de Ab-21 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 315
Región variable pesada Ab-21 (con secuencia señal)	SEQ ID NO: 317
Región variable ligera de Ab-22	SEQ ID NO: 368
Región variable pesada de Ab-22	SEQ ID NO: 370
CDR-L1 de Ab-24	KASQSVYDGTSMN (SEQ ID NO: 351)
CDR-L2 de Ab-24	AASNLES (SEQ ID NO: 352)
CDR-L3 de Ab-24	QQSNEDPFT (SEQ ID NO: 353)
CDR-H1 de Ab-24	TYWMN (SEQ ID NO: 358)
CDR-H2 de Ab-24	MIHPASEIRLDQKFKD (SEQ ID NO: 359)
CDR-H3 de Ab-24	SGEWGSMY (SEQ ID NO: 360)
Cadena ligera de Ab-24	SEQ ID NO: 350
Cadena pesada de Ab-24	SEQ ID NO: 357

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 20 de CDR de WO 2008/115732	GYTFTDYFLN (SEQ ID NO: 416)
SEQ ID NO: 21 de CDR de WO 2008/115732	TIYPYHDGTTYSQKFKG (SEQ ID NO: 417)
SEQ ID NO: 22 de CDR de WO 2008/115732	EEEDGQFDY (SEQ ID NO: 418)
SEQ ID NO: 23 de CDR de WO 2008/115732	SASQGIQWYLN (SEQ ID NO: 419)
SEQ ID NO: 24 de CDR de WO 2008/115732	YTSSLHS (SEQ ID NO: 420)
SEQ ID NO: 25 de CDR de WO 2008/115732	QQHSKLPRT (SEQ ID NO: 421)
SEQ ID NO: 26 de CDR de WO 2008/115732	GFPIKDTFQH (SEQ ID NO: 422)
SEQ ID NO: 27 de CDR de WO 2008/115732	WSDPEIGDTEYASKFQG (SEQ ID NO: 423)
SEQ ID NO: 28 de CDR de WO 2008/115732	GDTTYKFDF (SEQ ID NO: 424)
SEQ ID NO: 29 de CDR de WO 2008/115732	KASQDVHTAVA (SEQ ID NO: 425)
SEQ ID NO: 30 de CDR de WO 2008/115732	WASTRWT (SEQ ID NO: 426)
SEQ ID NO: 31 de CDR de WO 2008/115732	QQYSYPWT (SEQ ID NO: 427)
SEQ ID NO: 32 de CDR de WO 2008/115732	DFEIKDYIYH (SEQ ID NO: 428)
SEQ ID NO: 33 de CDR de WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 429)
SEQ ID NO: 34 de CDR de WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 430)
SEQ ID NO: 35 de CDR de WO 2008/115732	QIDAEDGETEYAPRFQG (SEQ ID NO: 431)
SEQ ID NO: 36 de CDR de WO 2008/115732	STSELAS (SEQ ID NO: 432)
SEQ ID NO: 37 de CDR de WO 2008/115732	QQLSHLPLT (SEQ ID NO: 433)
SEQ ID NO: 4 de CDR de WO 2009/047356	GFTFRSHWLS (SEQ ID NO: 443)
SEQ ID NO: 15 de CDR de WO 2009/047356	WVSNINYDGSSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 454)
SEQ ID NO: 26 de CDR de WO 2009/047356	DTYLHFDY (SEQ ID NO: 465)
SEQ ID NO: 37 de CDR de WO 2009/047356	SGDNIGSFYVH (SEQ ID NO: 476)
SEQ ID NO: 48 de CDR de WO 2009/047356	LMIYDVNNRPS (SEQ ID NO: 487)
SEQ ID NO: 59 de CDR de WO 2009/047356	QSYAGSYLSE (SEQ ID NO: 498)
SEQ ID NO: 135 de CDR de WO 2010/130830	DNVMG (SEQ ID NO: 745)
SEQ ID NO: 136 de CDR de WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 746)
SEQ ID NO: 137 de CDR de WO 2010/130830	RFDMS (SEQ ID NO: 747)
SEQ ID NO: 138 de CDR de WO 2010/130830	SYFMG (SEQ ID NO: 748)
SEQ ID NO: 139 de CDR de WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 749)
SEQ ID NO: 140 de CDR de WO 2010/130830	RYVTG (SEQ ID NO: 750)
SEQ ID NO: 141 de CDR de WO 2010/130830	SFVIG (SEQ ID NO: 751)
SEQ ID NO: 142 de CDR de WO 2010/130830	QYTIT (SEQ ID NO: 752)
SEQ ID NO: 143 de CDR de WO 2010/130830	IYNMD (SEQ ID NO: 753)
SEQ ID NO: 153 de CDR de WO 2010/130830	WYRQAPGKQRELVA (SEQ ID NO: 763)
SEQ ID NO: 154 de CDR de WO 2010/130830	WFRQTPGKERELIA (SEQ ID NO: 764)
SEQ ID NO: 155 de CDR de WO 2010/130830	WFRQAPGKQREFIA (SEQ ID NO: 765)
SEQ ID NO: 156 de CDR de WO 2010/130830	WFRQAPGKEREVVA (SEQ ID NO: 766)
SEQ ID NO: 157 de CDR de WO 2010/130830	WFLQAPGKERELIA (SEQ ID NO: 767)
SEQ ID NO: 158 de CDR de WO 2010/130830	WFRQAPGKEREVVA (SEQ ID NO: 768)
SEQ ID NO: 159 de CDR de WO 2010/130830	WFRQAPGKQREVVA (SEQ ID NO: 769)
SEQ ID NO: 160 de CDR de WO 2010/130830	WFRQAPGKEREVVA (SEQ ID NO: 770)
SEQ ID NO: 161 de CDR de WO 2010/130830	WFRQSGGKGRELIA (SEQ ID NO: 771)
SEQ ID NO: 171 de CDR de WO 2010/130830	GTIVTGTWRSDY (SEQ ID NO: 781)
SEQ ID NO: 172 de CDR de WO 2010/130830	GDTGGAAYGY (SEQ ID NO: 782)
SEQ ID NO: 173 de CDR de WO 2010/130830	LGIEYA (SEQ ID NO: 783)
SEQ ID NO: 174 de CDR de WO 2010/130830	AKGIGVYGY (SEQ ID NO: 784)
SEQ ID NO: 175 de CDR de WO 2010/130830	GVTGGAAYGY (SEQ ID NO: 785)
SEQ ID NO: 176 de CDR de WO 2010/130830	AELPGTYDY (SEQ ID NO: 786)

FIGURA 1 (cont.)

Descripción de la secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 111 de CDR de WO 2010/130830	AEPAGVYDV (SEQ ID NO: 787)
SEQ ID NO: 178 de CDR de WO 2010/130830	DRRGLASTRAADYDY (SEQ ID NO: 788)
SEQ ID NO: 179 de CDR de WO 2010/130830	GDTGGASYGY (SEQ ID NO: 789)
