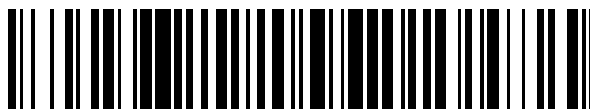


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 849**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2011** **PCT/US2011/061785**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012** **WO12071381**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2011** **E 11843652 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019** **EP 2643019**

54 Título: **Anticuerpos contra notum pectinacetilesterasa**

30 Prioridad:

24.11.2010 US 416927 P

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

04.07.2019

73 Titular/es:

LEXICON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
8800 Technology Forest Place
The Woodlands, TX 77381-1160, US

72 Inventor/es:

BROMMAGE, ROBERT, JOSEPH, JR.;
FENG, XIAO;
HONG, SEOKJOO;
LANDES, GREGORY;
LIU, JEFF;
POTTER, DAVID, GEORGE y
POWELL, DAVID, REED

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 718 849 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

Anticuerpos contra notum pectinacetilesterasa

5 **1. Campo de la invención**

Esta invención se refiere a anticuerpos inhibidores de Notum Pectinacetilesterasa, composiciones que los comprenden y métodos para su uso.

10 **2. Antecedentes de la invención**

La salud ósea depende de las actividades coordinadas de los osteoblastos que forman el hueso y los osteoclastos que reabsorben el hueso. "El recambio óseo refleja un equilibrio entre estas funciones celulares anabólicas y catabólicas y garantiza que el esqueleto maduro pueda repararse a sí mismo cuando está dañado y mantener su función endocrina mediante la liberación de minerales como el calcio y el fósforo en la circulación". Allen, J.G. et al., *J. Med. Chem.*, 53 (10 de junio de 2010), págs. 4332 - 4353, 4332. Muchas patologías alteran este equilibrio, dando como resultado un aumento o disminución de la masa ósea o cambios en la calidad ósea. La pérdida gradual de la densidad mineral ósea se conoce como osteopenia; y la pérdida severa de hueso se conoce como osteoporosis. *Id.*

El tratamiento de referencia actual para el tratamiento y la prevención de la osteoporosis utiliza la clase de bifosfonatos antirresortivos orales de molécula pequeña. *Id.* en 4333. Los suplementos de ácido zoledrónico, raloxifeno, calcio y vitamina D también se usan generalmente en el tratamiento de la osteoporosis. *Id.* Mientras que los agentes antirresortivos pueden ayudar a prevenir la pérdida ósea, los agentes anabólicos "son capaces de aumentar la masa ósea en mayor grado... y también tienen la capacidad de mejorar la calidad ósea y aumentar la resistencia ósea". Guo, H., et al., *J. Med. Chem.*, 53 (25 de febrero de 2010), pág.1819 -1829,1819. En Estados Unidos, la PTH (hormona paratiroidea por sus siglas en inglés) humana es el único agente anabólico aprobado por la FDA. *Id.*; Allen en 4333. "Debido a la escasez de agentes anabólicos disponibles para el tratamiento de la osteoporosis, existe una necesidad urgente de desarrollar compuestos moleculares pequeños para tratar esta enfermedad que sean no tóxicos, rentables y fáciles de administrar". Guo, en 1819.

"Aunque el desarrollo de agentes farmacológicos que estimulan la formación ósea está menos avanzado en comparación con las terapias antirresortivas, se sabe que varias vías facilitan la función de los osteoblastos". Allen en 4338. Estas vías incluyen proteínas morfogénicas óseas, factor de crecimiento transformante β , hormona paratiroidea, factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento de fibroblastos y señalización del sitio de integración MMTV de tipo sin alas (WNT). *Id.* Guo y sus colegas informaron recientemente sobre los resultados de la primera de estas vías. Guo, *citado anteriormente*. En particular, informaron que ciertos compuestos de benzotiofeno y benzofurano sustituidos potencian la expresión de la proteína morfogénica ósea 2 en ratones y ratas. Dos de los compuestos informados estimulan la formación de hueso y la restauración de la conectividad trabecular *in vivo*. *Id.* en 1819.

Otra de estas vías es la vía WNT, que está implicada en una variedad de procesos de desarrollo y regenerativos. Allen en 4340. Sin embargo, la vía es compleja, y aún no está claro mucho sobre ella y de cómo sus componentes afectan al hueso. Por ejemplo, se ha sugerido que LRP-5, cuyas mutaciones están asociadas con el aumento de la masa ósea en los seres humanos, y la β -catenina, a través de la cual se produce la señalización canónica WNT, "no se pueden vincular directamente a través de la señalización WNT al control de la masa ósea." *Id.*

El análisis reciente de los datos de expresión génica ha llevado a la identificación de nuevas dianas de señalización WNT. Véanse, por ejemplo, Torisu, Y., et al., *Cancer Sci.*, 99(6):1139-1146, 1143 (2008). Una de estas dianas es Notum Pectinacetilesterasa, también conocida como NOTUM y LOC174111.

50 **3. Sumario de la invención**

El objeto de la invención se establece en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a la notum pectinacetilesterasa humana (NOTUM) y reduce la actividad de NOTUM humana en un ensayo con 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trisulfonato trisódico (OPTS) *in vitro*, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno caracterizado por la pérdida ósea en un paciente. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a una NOTUM seleccionada de NOTUM de ratón, NOTUM de cobaya, NOTUM de mono cynomolgus y NOTUM de mono rhesus. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención reduce la actividad de NOTUM humana en un ensayo con 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trisulfonato trisódico (OPTS) *in vitro*. En algunas realizaciones, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención tiene al menos una actividad seleccionada de aumentar los niveles de PINP séricos *in vivo*, aumentar la densidad mineral ósea *in vivo*, aumentar el espesor cortical de la diáfisis del fémur *in vivo*, aumentar el área ósea de la diáfisis del fémur *in vivo*, aumentar el espesor cortical de la diáfisis del húmero *in vivo*, aumentar la formación ósea endocortical *in vivo*, aumentar la proporción de volumen de hueso cortical en el cuerpo vertebral de la vértebraVL5 *in vivo*, y aumentar la proporción de volumen de hueso de cuello femoral a volumen total de cuello femoral *in vivo*. En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención que se une a NOTUM se une a un polipéptido que tiene la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con K_D de menos de 50 nM, menos de 20 nM o menos de 10 nM.

En algunas realizaciones, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención tiene al menos una característica de unión seleccionada de: a) se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83 con una afinidad de unión que es al menos 5 veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84; b) se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 con una afinidad de unión que es al menos 5 veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86; c) se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con una afinidad de unión que es al menos 5 veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94; d) se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con una afinidad de unión que es al menos 5 veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99; e) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 f) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; g) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; h) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; i) y compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

En algunas realizaciones, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención se selecciona de un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo humano.

En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención que se une a NOTUM comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende al menos una CDR seleccionada de: a) una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 17, 25, 33 y 41; b) una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 18, 26, 34 y 42 y c) una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 19, 27, 35 y 43. En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende un conjunto que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3, en donde el conjunto se selecciona de: a) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; b) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27; c) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35; d) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; y e) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 57, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59. En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende unas regiones variables de cadena pesada que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 15, 23, 31, 39, 63, 67, 71, 75 y 79.

En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención que se une a NOTUM comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende al menos una CDR seleccionada de: a) una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 20, 28, 36 y 44 y b) una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 21, 29, 37, 45 y 61 y c) una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 22, 30, 38, 46 y 62. En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende un conjunto que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3, en donde el conjunto se selecciona de: a) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; b) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30; c) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38; d) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; y e) un conjunto que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de

aminoácidos SEQ ID NO: 60, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62. En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende unas regiones variables de cadena ligera que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 16, 24, 32, 40, 56, 65, 69, 73, 77 y 81.

5

En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención que se une a NOTUM comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: a) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 y la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; o b) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, o c) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 y la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38; o d) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42, y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; o e) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62.

En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención que se une a NOTUM comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde a) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; o b) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73; o c) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74; o d) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; o e) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77; o f) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78; o g) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; o h) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81; o (i) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; o j) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; o h) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69; o (i) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70; o m) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56

Un aspecto adicional de la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a la notum pectinacetiltransferasa humana (NOTUM) y que neutraliza al menos una actividad de NOTUM, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: a) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42, y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; o b) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57, una CDR2 que

tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62. En algunas realizaciones del anticuerpo de la invención de acuerdo con (a), la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; o la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69; o la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones del anticuerpo de la invención de acuerdo con (b), la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena pesada, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena ligera. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es un vector. Un aspecto adicional de la invención proporciona una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico anterior que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena pesada, y se proporciona una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena ligera. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para producir el anticuerpo anterior de la invención que comprende incubar la célula hospedadora anterior en condiciones suficientes para expresar el anticuerpo. Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anterior de la invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención estimula la formación endocortical realizada en un paciente, y el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención proporcionada. En algunas realizaciones del anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención, dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es osteoporosis. En algunas realizaciones, se proporciona una forma de dosificación unitaria única que comprende la composición farmacéutica.

4. Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona una representación gráfica de las diferencias entre los espesores corticales de varios sitios óseos en ratones knockout homocigotos para NOTUM ("HOM") y los de sus compañeros de camada de tipo silvestre ("TS").

La Figura 2 proporciona una representación gráfica de un aumento en el espesor cortical del hueso observado en ratones knockout homocigotos y heterocigotos ("HET") para NOTUM en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre.

La Figura 3 proporciona una representación gráfica de los resultados obtenidos de las pruebas de resistencia a la rotura del fémur y de compresión de la columna vertebral realizadas en los huesos de ratones knockout macho homocigotos y heterocigotos para NOTUM y sus compañeros de camada de tipo silvestre.

La Figura 4 proporciona una representación gráfica de los resultados obtenidos de las pruebas de resistencia a la rotura del fémur y de compresión de la columna vertebral realizadas en los huesos de ratones knockout hembra homocigotos y heterocigotos para NOTUM y sus compañeros de camada de tipo silvestre.

La Figura 5 proporciona una representación gráfica de ciertas proteínas quiméricas humanas/de ratón, e indica una región que parece estar involucrada en la unión de los anticuerpos que neutralizan NOTUM en Bin 1, como se describe en el Ejemplo 6.7.

La Figura 6 proporciona una representación gráfica de las medidas del espesor cortical de la diáfisis del fémur obtenidas en ratones después de ocho semanas de administración de MAb 2.1029 o MAb 2.78, como se describe en el Ejemplo 6.9.1.

La Figura 7 proporciona una representación gráfica de las medidas del espesor cortical de la diáfisis del fémur obtenidas en ratones después de cuatro semanas de administración de varias dosis de MAb 2.1029, como se describe en el Ejemplo 6.9.2.

La Figura 8 proporciona una representación gráfica de las medidas del espesor cortical de la diáfisis del fémur obtenidas en ratones después de cuatro semanas de administración de varias dosis de MAb 2.78b, como se describe en el Ejemplo 6.9.3. La Figura 8A muestra dosis de 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg de MAb 2.78b. La Figura 8B muestra dosis de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg y 3 mg/kg de MAb 2.78b.

La Figura 9 proporciona una representación gráfica de las medidas del espesor cortical de la diáfisis del fémur (A) y

los niveles séricos de PINP (B) obtenidos en ratones después de 4 semanas de administración de MAb 2.78b, con y sin tratamiento previo con zoledronato, como se describe en el Ejemplo 6.9.4.

La Figura 10 proporciona una representación gráfica de las medidas del espesor cortical de la diáfisis del fémur obtenidas en ratones después de 4 semanas de administración de MAb 2.78a, como se describe en el Ejemplo 6.9.5.

La Figura 11 proporciona una representación gráfica de las medidas del espesor cortical de la diáfisis del fémur (A) medidas del espesor cortical de la diáfisis del húmero (B) obtenidos en ratones después de 12 semanas de administración de MAb 2.78a, como se describe en el Ejemplo 6.9.6.

La Figura 12 proporciona una representación gráfica de las medidas del espesor cortical de la diáfisis del fémur (A), las medidas del espesor cortical de la diáfisis del húmero (B) y el espesor cortical de la novena costilla (C) obtenidas en ratones después de 24 semanas de administración de MAb 2.78a, como se describe en el Ejemplo 6.9.6.

La Figura 13 proporciona una representación gráfica del espesor cortical de la diáfisis del fémur (A) y del área de hueso mineralizado de la diáfisis del fémur (B) en ratones de cirugía simulada y ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo 2.78b que neutraliza NOTUM o el anticuerpo control, como se describe en el Ejemplo 6.10.3.

La Figura 14 proporciona una representación gráfica de la proporción en el cuerpo vertebral de la VL5 del volumen óseo al volumen total (A), la proporción en el cuerpo vertebral de la VL5 del volumen del hueso cortical al volumen total (B) y la proporción en el cuerpo vertebral de la VL5 del volumen de hueso trabecular al volumen total (C) en ratones de cirugía simulada y ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo 2.78b que neutraliza NOTUM o el anticuerpo control, como se describe en el Ejemplo 6.10.3.

La Figura 15 proporciona una representación gráfica de la proporción del volumen del hueso del cuello femoral al volumen total en ratones de cirugía simulada y ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo 2.78b que neutraliza NOTUM o el anticuerpo control, como se describe en el Ejemplo 6.10.3.

La Figura 16 proporciona una representación gráfica del porcentaje de la superficie endocortical de las secciones transversales de la diáfisis del fémur que se marcaron con calceína, alizarina y tetraciclina en ratones de cirugía simulada y ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo 2.78b que neutraliza NOTUM o el anticuerpo control, como se describe en el Ejemplo 6.10.4.

La Figura 17 proporciona una representación gráfica de la tasa de aposición mineral (A) y la tasa de formación ósea referente al volumen (B) en ratones de cirugía simulada y ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo 2.78b que neutraliza NOTUM o el anticuerpo control, como se describe en el Ejemplo 6.10.4.

5. Descripción detallada de la invención

La divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de que la inhibición de NOTUM puede afectar la formación de hueso endocortical. Los aspectos particulares de la invención se basan en estudios de ratones que carecen de un gen NOTUM funcional ("ratones knockout"), en el desarrollo de anticuerpos que inhiben NOTUM y en el descubrimiento de que dichos anticuerpos pueden usarse para estimular la formación de hueso cortical en ratones y ratas.

Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente, y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita. En el caso de que una o más de las publicaciones incorporadas y materiales similares definan un término que contradiga la definición de ese término en la presente solicitud, la presente solicitud será la determinante.

5.1 Definiciones

El término "anticuerpo," como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo intacto o un fragmento de un anticuerpo que compite con el anticuerpo intacto por la unión al antígeno. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, diacuerpos y otros fragmentos de anticuerpos que conservan al menos una porción de la región variable de un anticuerpo intacto. Véanse, por ejemplo, Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134. En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos se producen por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos se producen mediante técnicas de ADN recombinante.

La expresión "sitio de unión a antígeno" se refiere a una porción de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un antígeno. En algunas realizaciones, se proporciona un sitio de unión a antígeno por una o más regiones variables de anticuerpo.

La expresión "afinidad de unión" se refiere a una determinación cualitativa o cuantitativa de la fuerza con la que un anticuerpo se une a un antígeno. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es la constante de disociación (K_D) del anticuerpo para el antígeno. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno se determina cualitativamente, como en relación con la afinidad de unión de un anticuerpo diferente por un antígeno, o en relación con la afinidad de unión del mismo anticuerpo por un antígeno diferente (como el antígeno con uno o más cambios en su secuencia de aminoácidos). La afinidad de unión de un anticuerpo por un primer antígeno se considera "más fuerte" que su afinidad por un segundo antígeno, por ejemplo, cuando la K_D del anticuerpo por el primer antígeno es menor que la K_D del anticuerpo por el segundo antígeno. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de un anticuerpo por un primer antígeno se considera "más fuerte" cuando la K_D del anticuerpo por el primer antígeno es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces menor que la K_D del anticuerpo para el segundo antígeno. Por el contrario, la afinidad de unión de un anticuerpo por un primer antígeno se considera "más débil" que su afinidad por un segundo antígeno, por ejemplo, cuando la K_D del anticuerpo por el primer antígeno es mayor que la K_D del anticuerpo por el segundo antígeno. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de un anticuerpo por un primer antígeno se considera "más débil" cuando la K_D del anticuerpo por el primer antígeno es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces mayor que la K_D del anticuerpo para el segundo antígeno.

Un anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo compuesto de componentes de al menos dos fuentes diferentes. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende una porción de un anticuerpo derivado de una primera especie fusionada con otra molécula, por ejemplo, una porción de un anticuerpo derivado de una segunda especie. En algunas de dichas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende una porción de un anticuerpo derivado de un animal no humano fusionado con una porción de un anticuerpo derivado de un ser humano. En algunas de dichas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende la totalidad o una porción de una región variable de un anticuerpo derivado de un animal no humano fusionada con una región constante de un anticuerpo derivado de un ser humano.

El término "epítipo" se refiere a cualquier polipéptido determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T. En algunas realizaciones, un epítipo es una región de un antígeno a la que se une específicamente un anticuerpo. En algunas realizaciones, un epítipo puede incluir agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o sulfonilo. En algunas realizaciones, un epítipo puede tener características estructurales tridimensionales específicas (por ejemplo, un "epítipo conformacional") y/o características de carga específicas.

Un epítipo se define como "el mismo" que otro epítipo si un anticuerpo particular se une específicamente a ambos epítipos. En algunas realizaciones, los polipéptidos que tienen diferentes secuencias primarias de aminoácidos pueden comprender epítipos que son los mismos. Se dice que diferentes anticuerpos se unen al mismo epítipo si compiten por la unión específica a ese epítipo.

Un "fragmento" de un polipéptido de referencia se refiere a un tramo contiguo de aminoácidos de cualquier porción del polipéptido de referencia. Un fragmento puede ser de cualquier longitud que sea menor que la longitud del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un fragmento es un tramo contiguo de aminoácidos de cualquier porción del polipéptido de referencia que tiene una actividad particular o contiene un epítipo particular.

La expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo monoclonal que contiene secuencias de anticuerpos humanos y no contiene secuencias de anticuerpos de un animal no humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano puede contener secuencias sintéticas que no se encuentran en los anticuerpos nativos. La expresión no está limitada por la manera en que se producen los anticuerpos. Por ejemplo, en diversas realizaciones, un anticuerpo humano puede producirse en un ratón transgénico, por presentación en fagos, por linfocitos B humanos o por métodos recombinantes.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo no humano que se ha modificado de modo que coincida más estrechamente (en la secuencia de aminoácidos) con un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado es, por lo tanto, un tipo de anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, se modifican los restos de aminoácidos fuera de los restos de unión al antígeno de la región variable del anticuerpo no humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado se construye reemplazando la totalidad o una parte de una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano con la totalidad o una parte de una o más CDR de otro anticuerpo, tal como un anticuerpo no humano, que tiene la especificidad de unión al antígeno deseada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende regiones variables en las que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a CDR de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las regiones marco (FR) corresponden a las FR de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, se modifican uno o más aminoácidos dentro de una o más CDR del anticuerpo no humano en el anticuerpo humanizado, por ejemplo, a través de un proceso de maduración por afinidad. Los métodos ejemplares de maduración por afinidad son conocidos en la técnica. En algunas de dichas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende además una región constante (Fc) de un anticuerpo humano.

A menos que se indique de otro modo, el término "incluyen" tiene el mismo significado que "incluyen, pero sin

limitación", el término "incluye" tiene el mismo significado que "incluye, pero sin limitación", y el término "que incluye" tiene el mismo significado que "que incluye, pero sin limitación". De manera similar, la expresión "tal como" tiene el mismo significado que el término "tal como, pero sin limitación".

A menos que se indique de otro modo, los términos "gestionar", "que gestiona" y "gestión" incluyen la prevención de la recurrencia de la enfermedad o trastorno especificado en un paciente que ya ha padecido la enfermedad o trastorno, y/o la prolongación del tiempo que un paciente que ha padecido la enfermedad o trastorno permanece en remisión. Los términos incluyen la modulación del umbral, el desarrollo y/o la duración de la enfermedad o trastorno, o cambiar la forma en que un paciente responde a la enfermedad o trastorno.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos que se unen específicamente al mismo epítipo. En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal es secretado por un hibridoma. En algunas de dichas realizaciones, se produce un hibridoma de acuerdo con algunos métodos conocidos por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-499. En algunas realizaciones, se produce un anticuerpo monoclonal utilizando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal se refiere a un fragmento de anticuerpo aislado de una biblioteca de presentación en fagos. Véanse, por ejemplo, Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597. Para otras técnicas diferentes de producción de anticuerpos monoclonales, véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

La expresión "anticuerpo neutralizante" o "anticuerpo que neutraliza" se refiere a un anticuerpo que reduce al menos una actividad de un polipéptido que comprende el epítipo al que se une específicamente el anticuerpo. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante reduce la actividad del polipéptido *in vitro* y/o *in vivo*.

El término "NOTUM" se refiere a notum pectinacetiltransferasa que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier fuente de vertebrados o mamíferos, incluyendo seres humanos, bovino, pollo, roedor, ratón, rata, porcino, ovino, primate, mono y cobaya, a menos que se especifique otra cosa. El término también se refiere a fragmentos y variantes de NOTUM nativa que mantienen al menos una actividad *in vivo* o *in vitro* de una NOTUM nativa. El término abarca formas precursoras no procesadas de longitud completa de NOTUM, así como formas maduras que resultan de la escisión postraduccional de un péptido señal y otras formas de procesamiento proteolítico. En algunas realizaciones, una NOTUM humana no procesada de longitud completa tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una NOTUM de ratón no procesada de longitud completa tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2.

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos que contienen aminoácidos naturales, así como a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente. Los polímeros de aminoácidos pueden ser de cualquier longitud. La expresión "polipéptido nativo" se refiere a un polipéptido de origen natural.

A menos que se indique de otro modo, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" contemplan una acción que se produce antes de que un paciente comience a padecer la enfermedad o trastorno especificado, que inhibe o reduce la gravedad de la enfermedad o trastorno. En otras palabras, los términos abarcan la profilaxis.

A menos que se indique de otro modo, una "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto es una cantidad suficiente para prevenir una enfermedad o afección, o uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección, o para prevenir su recurrencia. Una "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto se refiere a una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" puede abarcar una cantidad que mejora la profilaxis global o mejora la eficacia profiláctica de otro agente profiláctico.

Un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno cuando reconoce preferentemente el antígeno en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un epítipo particular. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a diferentes antígenos siempre que los diferentes antígenos comprendan ese epítipo particular. En algunos casos, por ejemplo, las proteínas homólogas de diferentes especies pueden comprender el mismo epítipo. En algunas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación (K_D) es $\leq 1 \mu M$, en algunas realizaciones, cuando la constante de disociación es $\leq 100 nM$, y en algunas realizaciones, cuando la constante de disociación es $\leq 10 nM$.

Los términos "sujeto" y "paciente" incluyen tanto a seres humanos como a animales. En algunas realizaciones, un sujeto o paciente es un mamífero. En algunas de dichas realizaciones, un sujeto o paciente es un ser humano.

A menos que se indique de otro modo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de una enfermedad o afección o

para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto se refiere a una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de la enfermedad o afección. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" puede abarcar una cantidad que mejora la terapia global, reduce o evita síntomas o causas de una enfermedad o afección o mejora la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

A menos que se indique de otro modo, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" contemplan una acción que se produce mientras un paciente padece la enfermedad o trastorno especificado, que reduce la gravedad de la enfermedad o trastorno, o retarda o ralentiza la progresión de la enfermedad o trastorno.

5.2. Anticuerpos

5.2.1. Estructura de Anticuerpo Ejemplar

Un anticuerpo nativo generalmente tiene una estructura tetramérica. Un tetrámero comprende generalmente dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena ligera (en algunas realizaciones, aproximadamente 25 kDa) y una cadena pesada (en algunas realizaciones, aproximadamente 50-70 kDa). En un anticuerpo nativo, una cadena pesada comprende una región variable, VH, y tres regiones constantes, CH1, CH2 y CH3. El dominio VH está en el extremo amino de la cadena pesada, y el dominio CH3 está en el extremo carboxi. En un anticuerpo nativo, una cadena ligera comprende una región variable, VL y una región constante, CL. La región variable de la cadena ligera está en el extremo amino de la cadena ligera. En un anticuerpo nativo, las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman generalmente el sitio de unión al antígeno. Las regiones constantes son generalmente responsables de la función efectora.

Las cadenas ligeras humanas nativas se clasifican generalmente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas humanas nativas se clasifican generalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene subclases, que incluyen IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. IgM tiene subclases que incluyen IgM1 e IgM2. IgA tiene subclases que incluyen IgA1 e IgA2. Dentro de una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada que también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véanse, por ejemplo, Fundamental Immunology (1989) Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y.).

En un anticuerpo nativo, las regiones variables muestran generalmente la misma estructura general en la que las regiones marco relativamente conservadas (FR) están unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR de las dos cadenas de cada par generalmente están alineadas por las regiones marco, lo que puede permitir la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N al extremo C, las regiones variables tanto de la cadena ligera como de la pesada comprenden generalmente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en la cadena pesada se conocen como H1, H2 y H3, mientras que las CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2 y L3. Generalmente, la CDR3 es la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión del anticuerpo. H3, por ejemplo, en determinados casos, puede ser de tan solo dos restos de aminoácidos o de más de 26 aminoácidos. La asignación de los aminoácidos a cada dominio es generalmente de acuerdo con las definiciones de Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Publicación N.º 91-3242, vols. 1-3, Bethesda, MD); Chothia, C., y Lesk, A.M. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; o Chothia, C. et al. Nature 342:878-883 (1989). En la presente solicitud, el término "CDR" se refiere a un CDR de la cadena ligera o pesada, a menos que se especifique lo contrario.

Un fragmento "Fab" comprende una cadena ligera y la región CH1 y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento "Fab" comprende una cadena ligera y una cadena pesada que comprende una región constante adicional, que se extiende entre los dominios CH1 y CH2. Se puede formar un enlace disulfuro entre cadenas entre dos cadenas pesadas de un fragmento Fab para formar una molécula "F(ab')2".

Un fragmento "Fv" comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera, pero carece de regiones constantes. Un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) comprende regiones variables de cadena pesada y ligera conectadas por un enlazador flexible para formar una única cadena polipeptídica con una región de unión a antígeno. Se analizan en detalle, anticuerpos de cadena única ejemplares en el documento WO 88/01649 y en las patentes de Estados Unidos números 4.946.778 y 5.260.203. En ciertos casos, una región variable única (es decir, una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera) puede tener la capacidad de reconocer y unirse al antígeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cadena pesada" se refiere a un polipéptido que comprende suficiente secuencia de región variable de cadena pesada para conferir especificidad de antígeno sola o en combinación con una cadena ligera.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cadena ligera" se refiere a un polipéptido que comprende suficiente secuencia de región variable de cadena ligera para conferir especificidad de antígeno sola o en combinación con una cadena pesada.

5 5.2.2. Anticuerpos Ejemplares

Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a la notum pectinacetilesterasa humana (NOTUM) y reduce la actividad de NOTUM humana en un ensayo con 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trisulfonato trisódico (OPTS) *in vitro*, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno caracterizado por la pérdida ósea en un paciente.

Un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención reduce la actividad de NOTUM en un ensayo con 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trisulfonato trisódico (OPTS) *in vitro*.

En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención aumenta los niveles séricos de PINP *in vivo* cuando se administra a un sujeto en una cantidad suficiente y durante un tiempo suficiente. Se analizan en el presente documento, dosis y programas de dosificación ejemplares para administrar una cantidad suficiente durante un tiempo suficiente. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención aumenta la densidad mineral ósea. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención aumenta el espesor cortical de la diáfisis del fémur *in vivo*. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención aumenta el área ósea de la diáfisis del fémur *in vivo*. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención aumenta el espesor cortical de la diáfisis del húmero *in vivo*. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención aumenta la formación ósea endocortical *in vivo*. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención aumenta la proporción de volumen de hueso cortical en el cuerpo vertebral de la VL5 *in vivo*. Por "proporción de volumen de hueso cortical en el cuerpo vertebral LV5" se entiende la proporción de volumen de hueso cortical al volumen total del cuerpo vertebral de la VL5. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención aumenta la proporción de volumen de hueso del cuello femoral al volumen total de cuello femoral *in vivo*.

Se proporcionan anticuerpos neutralizantes que se unen específicamente a NOTUM humana. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes que se unen a una región de Q47 a M177 de NOTUM humana, para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes que dependen, para la unión, de una región de Q47 a M177 de NOTUM humana, para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes que se unen específicamente a la misma región de NOTUM de diferentes especies (es decir, anticuerpos que demuestran reactividad cruzada) para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes que se unen a NOTUM humana y NOTUM de al menos una especie seleccionada de ratón, rata, cobaya, macaco cangrejero, tití y macaco rhesus para su uso de acuerdo con la invención. En algunas de dichas realizaciones, los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se unen específicamente tanto a NOTUM de primate no humano como a NOTUM humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se unen específicamente tanto a NOTUM de ratón como a NOTUM humana.

En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes que se unen a una región de NOTUM humana de Q47 a M177, para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes que dependen, para la unión, de una región de NOTUM humana de Q47 a M177, para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención que se unen a NOTUM quimérica humana-de ratón (SEQ ID NO: 83) con una afinidad que es al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 20 veces más fuerte que la afinidad por NOTUM quimérica de ratón-humana (SEQ ID NO: 84). En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención que se unen a NOTUM quimérica humana-de ratón-humana (SEQ ID NO: 85) con una afinidad que es al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 20 veces más fuerte que la afinidad por NOTUM quimérica de ratón-humana- de ratón (SEQ ID NO: 86). En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención que se unen a NOTUM humana (SEQ ID NO: 1) con una afinidad que es al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 20 veces más fuerte que la afinidad por NOTUM D141S (SEQ ID NO: 94). En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes de NOTUM que se unen a NOTUM humana (SEQ ID NO: 1) con una afinidad que es al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 20 veces más fuerte que la afinidad por NOTUM humana R144A/R145A (SEQ ID NO: 99).

En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención se une a NOTUM humana (SEQ ID NO: 1) con una afinidad (K_D) de menos de 100 nM, menos de 50 nM, menos de 40 nM o menos de 30 nM, menos de 25 nM, menos de 20 nM, menos de 15 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 3 nM o menos de 2 nM, determinada como se describe en el Ejemplo 6.8. En algunas realizaciones, un

anticuerpo neutralizante contra NOTUM para su uso de acuerdo con la invención una IC_{50} en un ensayo OPTS de menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 40 nM, menos de 30 nM, menos de 25 nM, menos de 20 nM, menos de 15 nM o menos de 10 nM, como se describe en el Ejemplo 6.4.1. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante contra NOTUM tiene una IC_{50} en un ensayo de señalización Wnt de menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 40 nM, menos de 30 nM, menos de 25 nM, menos de 20 nM, menos de 15 nM o menos de 10 nM, como se describe en el Ejemplo 6.4.2. La IC_{50} es para NOTUM humana.

En algunas realizaciones, los anticuerpos neutralizantes para su uso de acuerdo con la invención son anticuerpos monoclonales no humanos. En algunas de dichas realizaciones, Los anticuerpos neutralizantes son anticuerpos monoclonales de roedor. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos neutralizantes para su uso de acuerdo con la invención son anticuerpos monoclonales de ratón. En algunas realizaciones, los anticuerpos neutralizantes para su uso de acuerdo con la invención son anticuerpos monoclonales no quiméricos. En algunas realizaciones los anticuerpos neutralizantes para su uso de acuerdo con la invención son anticuerpos monoclonales humanizados. En algunas realizaciones los anticuerpos neutralizantes para su uso de acuerdo con la invención son anticuerpos monoclonales humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados y/o humanos son útiles como anticuerpos terapéuticos en seres humanos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos neutralizantes son para su uso de acuerdo con los fragmentos de anticuerpos de la invención. Fragmentos de anticuerpos ejemplares incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv, Fd, diacuerpos y similares.

Los anticuerpos neutralizantes de NOTUM ejemplares no limitantes para su uso de acuerdo con la invención incluyen MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78. Cada uno de los MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78 neutraliza al menos una actividad de NOTUM. Además, al menos los MAb 1.802, 1.815, 1.846 y 2.78 son dependientes para unirse a NOTUM en al menos una porción de la región del NOTUM humana unida por los aminoácidos Q47 a M177. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención compite por la unión a NOTUM con al menos un anticuerpo seleccionado de los MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención se une a un epítipo de NOTUM que se solapa al menos parcialmente con el epítipo unido por al menos un anticuerpo seleccionado de MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78. Además, en algunas realizaciones, se pronostica que un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención que compite por la unión a NOTUM con al menos un anticuerpo seleccionado de MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78 es un anticuerpo neutralizante de NOTUM. Las secuencias de las CDR y las regiones variables de los MAb 1.731 (comparativo) 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029, 2.55 (comparativo) y 2.78 se muestran en la Sección 7, a continuación.

En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes NOTUM para su uso de acuerdo con la invención que se unen al mismo epítipo al que se une MAb 1.802. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes NOTUM para su uso de acuerdo con la invención que se unen al mismo epítipo al que se une MAb 1.815. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes NOTUM para su uso de acuerdo con la invención que se unen al mismo epítipo al que se une MAb 1.846. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes NOTUM para su uso de acuerdo con la invención que se unen al mismo epítipo al que se une MAb 2.1029. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes NOTUM para su uso de acuerdo con la invención que se unen al mismo epítipo al que se une MAb 2.78.

En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NO: 15, 23, 31 y 39. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena ligera seleccionada a partir de las SEQ ID NO: 16, 24, 32 y 4C. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40.

En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una CDR1 de cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NO: 17, 25, 33 y 41. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una CDR2 de cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NO: 18, 26, 34, y 42. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NO: 19, 27, 35 y 43. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención

aminoácidos SEQ ID NO: 60, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62.

Los anticuerpos neutralizantes de NOTUM que se unen específicamente a NOTUM humana se proporcionan para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes de NOTUM que se unen específicamente al mismo epítipo en NOTUM de diferentes especies (es decir, anticuerpos que demuestran reactividad cruzada) para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes de NOTUM que se unen específicamente a NOTUM humana y también se unen específicamente a al menos una especie de NOTUM seleccionada de ratón, rata, cobaya, macaco cangrejero, tití y macaco rhesus para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes de NOTUM que se unen específicamente a NOTUM humana y a NOTUM de al menos una especie de primate no humano para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos neutralizantes de NOTUM que se unen específicamente a NOTUM humana y a NOTUM de ratón para su uso de acuerdo con la invención.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a la notum pectinacetiltransferasa humana (NOTUM) y que neutraliza al menos una actividad de NOTUM, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: a) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42, y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46; o b) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62. En algunas realizaciones del anticuerpo de la invención de acuerdo con (a), la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; o la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69; o la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones del anticuerpo de la invención de acuerdo con (b), la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

5.2.2.1. Anticuerpos monoclonales quimerizados y humanizados

En algunas realizaciones, los anticuerpos no humanos para su uso de acuerdo con la invención están quimerizados. En algunas realizaciones, se quimerizan los anticuerpos monoclonales de ratón que se unen específicamente a NOTUM humana para su uso de acuerdo con la invención. Se proporcionan ciertos métodos ejemplares para hacer anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en Morrison et al. (1984) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda et al. (1985) *Nature* 314:452-454; y en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.075.181 y 5.877.397.

En algunas realizaciones, se "humanizan" los anticuerpos no humanos para su uso de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se humanizan los anticuerpos monoclonales de ratón para su uso de acuerdo con la invención que se unen específicamente a NOTUM humana. En algunas realizaciones, se humanizan los anticuerpos monoclonales de ratón para su uso de acuerdo con la invención, que se generan contra NOTUM de ratón, pero que se unen específicamente (es decir, reaccionan de forma cruzada) con NOTUM humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados para su uso de acuerdo con la invención conservan su especificidad de unión y tienen una inmunogenicidad reducida (por ejemplo, una respuesta reducida al anticuerpo anti-ratón humano (HAMA)) cuando se administran a un ser humano. En algunas realizaciones, la humanización se logra mediante métodos que incluyen injertos de CDR e ingeniería humana, como se describe con detalle en lo sucesivo.

En algunas realizaciones de anticuerpos humanizados para su uso de acuerdo con la invención, una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo con la especificidad de unión deseada (el anticuerpo donante) se injertan en regiones marco humanas (FR) en un anticuerpo "aceptor". Injertos de CDR ejemplares se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, y 5.530.101; en Morrison et al. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033. En algunas realizaciones, se injertan una o más CDR de las regiones variables de cadena ligera y pesada en las FR humanas consenso en un anticuerpo aceptor. Para crear FR humanas consenso, en algunas realizaciones, se alinean las FR de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o ligera de cadena humanas para identificar una secuencia de aminoácidos consenso.

En algunas realizaciones, se reemplazan ciertos aminoácidos de FR en el anticuerpo aceptor con aminoácidos de FR del anticuerpo donante. En ciertas de estas realizaciones, los aminoácidos de FR del anticuerpo donante son aminoácidos que contribuyen a la afinidad del anticuerpo donante por el antígeno diana. Véanse, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, y 5.530.101; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033. En algunas realizaciones, los programas informáticos se utilizan para modelar anticuerpos de donante y/o aceptor para identificar restos que puedan participar en la unión del antígeno y/o contribuir a la estructura del sitio de unión a antígeno, ayudando, de este modo, en la selección de restos, como los restos de FR, para sustituirse en el anticuerpo donante.

En algunas realizaciones, Las CDR de un anticuerpo donante se injertan en un anticuerpo aceptor que comprende una región constante humana. En algunas de dichas realizaciones, las FR también se injertan en el aceptor. En algunas realizaciones, las CDR de un anticuerpo donante derivan de un anticuerpo Fv de cadena sencilla. En algunas realizaciones, las FR de un anticuerpo donante derivan de un anticuerpo Fv de cadena sencilla. En algunas realizaciones, las CDR injertadas en un anticuerpo humanizado se modifican adicionalmente (por ejemplo, mediante sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos) para aumentar la afinidad del anticuerpo humanizado por el antígeno diana. En algunas realizaciones, las FR injertadas en un anticuerpo humanizado se modifican adicionalmente (por ejemplo, mediante sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos) para aumentar la afinidad del anticuerpo humanizado por el antígeno diana.

En algunas realizaciones, los anticuerpos no humanos para su uso de acuerdo con la invención pueden humanizarse usando un método de "ingeniería humana". Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU n.º 5.766.886 y 5.869.619. En algunas realizaciones de ingeniería humana, la información sobre la estructura de los dominios variables de anticuerpos (p. ej., información obtenida de estructuras cristalinas y/o modelos moleculares) se usa para evaluar la probabilidad de que un resto de aminoácido dado en una región variable esté (a) involucrado en la unión al antígeno, (b) expuesto en la superficie del anticuerpo (es decir, accesible al disolvente), o (c) internado dentro de la región variable del anticuerpo (es decir, involucrado en el mantenimiento de la estructura de la región variable). Asimismo, en algunas realizaciones, las secuencias consenso de la región variable humana se generan para identificar restos que se conservan entre las regiones variables humanas. En algunas realizaciones, esa información proporciona orientación sobre si se debe sustituir un resto de aminoácido en la región variable de un anticuerpo no humano.

En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM humanizado para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende al menos, una de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo seleccionado de Mab 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo seleccionado de Mab 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena ligera que comprende al menos, una de CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo seleccionado de Mab 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo seleccionado de Mab 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de Mab 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78.

En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 63, 67, 71, 75, 79 y En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 64, 68, 72, 76 y 80. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 65, 69, 73, 77 y 81. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 66, 70, 74, 78 y 82. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de

acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante de NOTUM para su uso de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

5.2.2.2. Isotipos de anticuerpos

En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM es de cualquier isotipo seleccionado de IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM es del isotipo IgG. En ciertas de estas realizaciones, un anticuerpo es de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM es del isotipo IgM. En ciertas de estas realizaciones, un anticuerpo es de la subclase IgM1 o IgM2. En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM es del isotipo IgA. En ciertas de estas realizaciones, un anticuerpo es de la subclase IgA1 o IgA2. Un anticuerpo contra NOTUM puede comprender una región constante de cadena ligera lambda o kappa, por ejemplo, de origen humano o de ratón. En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM comprende una región constante de cadena ligera kappa humana y una región constante de la cadena pesada de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM comprende una cadena ligera kappa de ratón y una cadena pesada IgG1 o IgG2 de ratón.

5.2.2.3. Anticuerpos modificados

En algunas realizaciones, un anticuerpo se modifica para alterar una o más de sus propiedades. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado puede tener ventajas sobre un anticuerpo no modificado, como el aumento de la estabilidad, el aumento del tiempo en circulación o la disminución de la inmunogenicidad (*véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.179.337*). En algunas realizaciones, un anticuerpo se modifica enlazándolo a un resto no proteico. En algunas realizaciones, un anticuerpo se modifica alterando el estado de glicosilación del anticuerpo, por ejemplo, alterando el número, tipo, enlace y/o posición de las cadenas de carbohidratos en el anticuerpo. En algunas realizaciones, se altera un anticuerpo para que no esté glicosilado.

En algunas realizaciones, uno o más restos químicos están unidos a la cadena principal de aminoácidos y/o restos de carbohidratos del anticuerpo. Ciertos métodos ejemplares para unir un resto químico a un anticuerpo son conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, reacciones de acilación o reacciones de alquilación. Véanse, *p.ej.*, EP 0 401 384; Malik et al. (1992), *Exp. Hematol.*, 20:1028-1035; Francis (1992) *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10, publicado por Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, Londres N20 0LD, R. U.; EP 0 154 316; EP 0 401 384; documento WO 92/16221; documento WO 95/34326; documento WO 95/13312; documento WO 96/11953; documento WO 96/19459 y documento WO 96/19459. En algunas realizaciones, cualquiera de estas reacciones se usa para generar un anticuerpo que se modifica químicamente en su extremo amino.

En algunas realizaciones, un anticuerpo está unido a un marcador detectable, como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad. En ciertas de estas realizaciones, un marcador detectable permite la detección o el aislamiento del anticuerpo. En algunas realizaciones, un marcador detectable permite la detección de un antígeno unido por el anticuerpo.

En algunas realizaciones, un anticuerpo se modifica enlazándolo a uno o más polímeros. En algunas realizaciones, un anticuerpo está unido a uno o más polímeros solubles en agua. En ciertas de estas realizaciones, la unión a un polímero soluble en agua reduce la probabilidad de que el anticuerpo precipite en un ambiente acuoso, como un ambiente fisiológico. En algunas realizaciones, un anticuerpo está unido a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, un experto en la materia puede seleccionar un polímero soluble en agua adecuado basándose en consideraciones que incluyen si el conjugado polímero/anticuerpo se usará en el tratamiento de un paciente y, si es así, el perfil farmacológico del anticuerpo (por ejemplo, semivida, dosificación, actividad, antigenicidad y/u otros factores).

Ciertos polímeros solubles en agua clínicamente aceptables ejemplares incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG); propionaldehído de polietilenglicol; copolímeros de etilenglicol/propilenglicol; monometoxi-polietilenglicol; carboximetilcelulosa; dextrano; alcohol de polivinilo (PVA); polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano; poli-1,3,6-trioxano; copolímero de etileno/anhidrido maleico; poli-β-aminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios); poli (n-vinil pirrolidona) polietilenglicol; homopolímeros de polipropilenglicol (PPG) y otros óxidos de polialquilenos; copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno; polioles polioxiethylados (POG) (por ejemplo, glicerol) y otros polioles polioxiethylados; sorbitol polioxiethylado, glucosa polioxiethylada, ácidos colónicos u otros polímeros de carbohidratos; y Ficoll, dextrano o mezclas de los mismos. Ciertos PEG ejemplares incluyen, pero sin limitación, ciertas formas conocidas en la técnica por ser útiles en la modificación de anticuerpos, tales como mono- (C₁-C₁₀) alcoxi o ariloxi-PEG. En algunas realizaciones, El propionaldehído de PEG puede tener ventajas en la fabricación debido a su

estabilidad en agua.

En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua es de cualquier peso molecular. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua es ramificado o no ramificado. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, incluyendo todos los puntos entre los puntos finales del intervalo. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 35 kDa. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 15 kDa a aproximadamente 30 kDa.

En algunas realizaciones, un anticuerpo está unido polietilenglicol (PEG; es decir, un anticuerpo está "pegilado"). En diversas realizaciones, PEG tiene baja toxicidad en mamíferos. Véase Carpenter et al. (1971) Toxicol. Appl. Pharmacol., 18:35-40. De forma destacable, un aducto PEG de adenosina desaminasa fue aprobado en los Estados Unidos para su uso en seres humanos para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia combinada grave. En diversas realizaciones, PEG puede reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el enlace de PEG a un anticuerpo que tiene secuencias no humanas puede reducir la antigenicidad de ese anticuerpo cuando se administra a un ser humano.

En algunas realizaciones, un polímero está unido a uno o más restos de aminoácidos reactivos en un anticuerpo. Ciertos restos de aminoácidos reactivos ejemplares incluyen, pero sin limitación, el grupo alfa-amino del aminoácido amino-terminal, los grupos épsilon amino de las cadenas laterales de lisina, los grupos sulfhidrilo de las cadenas laterales de cisteína, los grupos carboxilo de las cadenas laterales de aspartilo y glutamilo, el grupo alfa-carboxilo del aminoácido carboxi-terminal, cadenas laterales de tirosina y cadenas de glicosilo activadas unidas a ciertos restos de asparagina, serina o treonina. Ciertas formas activadas de PEG ("reactivos de PEG") ejemplares adecuadas para la reacción directa con proteínas son conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los reactivos de PEG adecuados para la unión a grupos amino incluyen, pero sin limitación, ésteres activos de derivados de ácido carboxílico o carbonato de PEG, por ejemplo, aquellos en los que los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenzeno-4-sulfonato; En algunas realizaciones, los reactivos de PEG que contienen grupos maleimido o haloacetilo se utilizan para modificar los grupos sulfhidrilo. En algunas realizaciones, los reactivos de PEG que contienen grupos amino, hidrazina y/o hidrazida se pueden usar en reacciones con aldehídos generados por la oxidación con periodato de grupos de carbohidratos en proteínas.

En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene al menos un grupo reactivo. En algunas realizaciones, un derivado activado de un polímero soluble en agua, tal como PEG, se crea haciendo reaccionar el polímero soluble en agua con un grupo activador. En algunas realizaciones, un grupo activador puede ser monofuncional, bifuncional o multifuncional. Ciertos grupos de activación ejemplares que pueden usarse para unir un polímero soluble en agua a dos o más anticuerpos incluyen, pero sin limitación, los siguientes grupos: sulfona (por ejemplo, clorosulfona, vinilsulfona y divinilsulfona), maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidrina, oxirano y 5-piridilo. En algunas realizaciones, un derivado de PEG es generalmente estable contra la hidrólisis durante períodos prolongados en ambientes acuosos a pH de aproximadamente 11 o menos. En algunas realizaciones, un derivado de PEG unido a otra molécula, tal como un anticuerpo, confiere estabilidad de la hidrólisis a esa molécula. Ciertos derivados de PEG homobifuncionales ejemplares incluyen, pero sin limitación, PEG-bis-clorosulfona y PEG-bis-vinilsulfona (véase el documento WO 95/13312).

5.2.3. Ciertos métodos de producir anticuerpos monoclonales

5.2.3.1. Ciertos métodos de hibridoma

En algunas realizaciones, se producen anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales. En algunas realizaciones, se producen anticuerpos monoclonales por métodos basados en hibridomas. Ciertos métodos de este tipo son conocidos por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Kohler et al. (1975) Nature 256:495-497; Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Capítulo. 6 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). En ciertas de estas realizaciones, un animal no humano adecuado, tal como un ratón, rata, hámster, mono u otro mamífero, se inmuniza con un inmunógeno para producir células secretoras de anticuerpos. En algunas realizaciones, las células secretoras de anticuerpos son células B, como linfocitos o esplenocitos. En algunas realizaciones, los linfocitos (por ejemplo, los linfocitos humanos) se inmunizan *in vitro* para generar células secretoras de anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Borreback et al. (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:3995-3999.

En algunas realizaciones, las células secretoras de anticuerpos se fusionan con una línea celular "inmortalizada", tal como una línea celular de tipo mieloide, para producir células de hibridoma. En algunas realizaciones, las células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados se identifican, por ejemplo, mediante ELISA. En algunas realizaciones, tales células pueden ser subclonadas y cultivadas, a continuación, usando métodos convencionales. En algunas realizaciones, dichas células también pueden crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un hospedador animal adecuado. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales se aíslan de medio de cultivo de hibridoma, suero o líquido ascítico utilizando procedimientos de separación convencionales, tal como cromatografía de afinidad. Se proporciona una guía para la producción de hibridomas y la purificación de anticuerpos monoclonales

de acuerdo con ciertas realizaciones, por ejemplo, en Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Capítulo. 8 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

- 5 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales de ratón se producen inmunizando ratones genéticamente alterados con un inmunógeno. En ciertas de estas realizaciones, los ratones son ratones deficientes en NOTUM, que carecen parcial o totalmente de la función de NOTUM. En ciertas de estas realizaciones, los ratones son ratones "knockout" que carecen de la totalidad o de parte de un gen que codifica NOTUM. En algunas realizaciones, tales ratones knockout se inmunizan con NOTUM humana.
- 10 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos se producen en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir anticuerpos humanos. Véanse, *por ejemplo*, las patentes de los Estados Unidos n.º 6.075.181 A y 6.114.598 A; y el documento WO 98/24893 A2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se introducen genes de inmunoglobulinas humanas (*por ejemplo*, utilizando cromosomas artificiales de levadura, fragmentos de cromosomas humanos o integración de línea germinal) en ratones en los que se han inactivado los genes de Ig endógenos. Véanse, *por ejemplo*, Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258; Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727; y Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156 (que describen la línea XenoMouse II® de ratones transgénicos).
- 15 En algunas realizaciones, tales ratones transgénicos se inmunizan con un inmunógeno. En ciertas de estas realizaciones, se obtienen células linfáticas (como las células B) de ratones que expresan anticuerpos. En ciertas de estas realizaciones, tales células recuperadas se fusionan con una línea celular "inmortalizada", tal como una línea celular de tipo mieloide, para producir células de hibridoma. En ciertas de estas realizaciones, las células de hibridoma se analizan y seleccionan para identificar aquellas que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. Se describen ciertos métodos ejemplares y ratones transgénicos adecuados para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, en Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258; Jakobovits (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6:561-566; Lonberg et al. (1995) Int'l Rev. Immunol. 13:65-93; Fishwild et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156; Green (1999) J. Immunol. Methods 231:11-23; Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727; y revisado en Little et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370; y el documento WO 98/24893. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos contra NOTUM son adecuados para su uso como anticuerpos terapéuticos. Véase Part V.G., a continuación.
- 20
- 25
- 30

5.2.3.2. Ciertos métodos basados en presentación

- 35 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos se producen utilizando un método basado en la presentación, tal como, por ejemplo, cualquiera de los descritos a continuación.

En algunas realizaciones, se produce un anticuerpo monoclonal usando técnicas de presentación en fagos. Los expertos en la materia conocen diversos métodos de presentación en fagos de anticuerpos y se describen, por ejemplo, en Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien y Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una biblioteca de anticuerpos se presenta en la superficie de un fago filamentoso, tal como el fago filamentoso no lítico fd o M13. En algunas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos, tales como scFv, Fab, Fv con un enlace disulfuro intermolecular diseñado para estabilizar el par V_H-V_L y diacuerpos. En algunas realizaciones, pueden seleccionarse, por lo tanto, anticuerpos con la especificidad de unión deseada. Realizaciones ejemplares no limitantes de métodos de presentación en fagos de anticuerpos se describen con más detalle a continuación.

40

45

En algunas realizaciones, puede prepararse una biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos usando ciertos métodos conocidos por los expertos en la materia. Véanse, *por ejemplo*, Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). En algunas realizaciones, los repertorios de genes variables se preparan mediante amplificación por PCR de ADN genómico o ADNc derivado del ARNm de células secretoras de anticuerpos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ADNc se prepara a partir de ARNm de células B. En algunas realizaciones, el ADNc que codifica las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras se amplifica, por ejemplo, mediante PCR.

50

55

En algunas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y el ADNc de cadena ligera se clonan en un vector adecuado. En algunas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y el ADNc de cadena ligera se combinan aleatoriamente durante el proceso de clonación, dando como resultado, de este modo, la formación de una biblioteca de ADNc que codifica diversos scFv o Fab. En algunas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y el ADNc de cadena ligera se unen antes de clonarse en un vector adecuado. En algunas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y el ADNc de cadena ligera se unen mediante clonación por etapas en un vector adecuado.

60

En algunas realizaciones, el ADNc se clona en un vector de presentación en fagos, tal como un vector fagémido. Ciertos vectores fagémidos ejemplares, tales como pCES1, son bien conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el ADNc que codifica tanto cadenas pesadas como ligeras está presente en el mismo vector.

65

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ADNc que codifica scFv se clona en marco con la totalidad o una porción del gen III, que codifica la proteína de la cubierta de fago menor pIII. En ciertas de estas realizaciones, el fagémido dirige la expresión de la fusión de scFv-pIII en la superficie del fago. Como alternativa, en algunas realizaciones, el ADNc que codifica la cadena pesada (o cadena ligera) se clona en marco con la totalidad o una porción del gen III, y el ADNc que codifica la cadena ligera (o cadena pesada) se clona cadena abajo de una secuencia señal en el mismo vector. La secuencia de señal dirige la expresión de la cadena ligera (o cadena pesada) en el periplasma de la célula hospedadora, donde las cadenas pesada y ligera se ensamblan en fragmentos Fab. Como alternativa, en algunas realizaciones, el ADNc que codifica la cadena pesada y el ADNc que codifica la cadena ligera están presentes en vectores separados. En ciertas de estas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y cadena ligera se clona por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago, que contienen, ambos, señales para la recombinación *in vivo* en la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, los vectores fagémidos o de fagos recombinantes se introducen en un hospedador bacteriano adecuado, tal como *E. coli*. En algunas realizaciones que usan fagémidos, el hospedador se infecta con fagos auxiliares para suministrar proteínas estructurales de fagos, permitiendo, de este modo, la expresión de partículas de fago que portan la proteína de fusión anticuerpo-píldora en la superficie del fago.

En algunas realizaciones, las bibliotecas de anticuerpos "sintéticos" se construyen utilizando repertorios de genes variables que se reorganizan *in vitro*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los segmentos de genes individuales que codifican cadenas pesadas o ligeras (V-D-J o V-J, respectivamente) se combinan aleatoriamente utilizando PCR. En algunas realizaciones, se puede introducir diversidad de secuencia adicional en las CDR, y posiblemente en las FR, por ejemplo, mediante PCR propensa a errores. En algunas de dichas realizaciones, se introduce una diversidad de secuencia adicional en CDR3, por ejemplo, H3 de la cadena pesada.

En algunas realizaciones, las bibliotecas de presentación en fagos "nativas" o "universales" se construyen como se describe anteriormente utilizando ácido nucleico de un animal no inmunizado. En algunas realizaciones, el animal no inmunizado es un ser humano. En algunas realizaciones, las bibliotecas de presentación en fagos "inmunizadas" se construyen como se describe anteriormente usando ácido nucleico de un animal inmunizado. En algunas realizaciones, el animal inmunizado es un ser humano, rata, ratón, hámster o mono. En ciertas de estas realizaciones, los animales no humanos se inmunizan con cualquiera de los inmunógenos descritos a continuación.

Ciertas bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos humanos universales ejemplares están disponibles de fuentes comerciales. Ciertas bibliotecas ejemplares incluyen, pero sin limitación, la serie de bibliotecas HuCAL de MorphoSys AG (Martinstreid/Munich, Alemania); bibliotecas de Crucell (Leiden, Países Bajos) que utilizan la tecnología MAbstract®; la biblioteca de Fab de n-CoDeR™ de BioInvent (Lund, Suecia); y bibliotecas disponibles de Cambridge Antibody Technology (Cambridge, Reino Unido).

En algunas realizaciones, la selección de anticuerpos que tienen la especificidad de unión deseada a partir de una biblioteca de presentación en fagos se consigue mediante etapas de selección sucesivas. En algunas realizaciones de selección, las preparaciones de fagos de biblioteca se exponen al antígeno. En ciertas de estas realizaciones, los complejos de fago-antígeno se lavan, y los fagos no unidos se descartan. En ciertas de estas realizaciones, los fagos unidos se recuperan y amplifican posteriormente infectando *E. coli*. En ciertas de estas realizaciones, el fago productor de anticuerpos monoclonales puede clonarse recogiendo placas individuales. En algunas realizaciones, se repite el proceso anterior.

En algunas realizaciones, el antígeno utilizado en la selección es cualquiera de los inmunógenos descritos a continuación. En algunas realizaciones, el antígeno se inmoviliza sobre un soporte sólido para permitir la purificación del fago de unión al antígeno mediante cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, el antígeno está biotinilado, lo que permite la separación de fagos unidos a partir de fagos no unidos utilizando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. En algunas realizaciones, el antígeno puede inmovilizarse en las células (para la selección directa), en criosecciones de tejidos, o en membranas (por ejemplo, membranas de nailon o nitrocelulosa). Un experto en la materia puede determinar rutinariamente otras variaciones de ciertos procedimientos de selección.

En algunas realizaciones, se usa un sistema de presentación en levaduras para producir anticuerpos monoclonales. En ciertos sistemas de este tipo, un anticuerpo se expresa como una proteína de fusión con la totalidad o una porción de la proteína AGA2 de levadura, que se presenta en la superficie de la pared celular de la levadura. En ciertas de estas realizaciones, las células de levadura que expresan anticuerpos con la especificidad de unión deseada pueden identificarse exponiendo las células a un antígeno marcado de forma fluorescente. En ciertas de estas realizaciones, las células de levadura que se unen al antígeno se pueden aislar mediante citometría de flujo. Véase, por ejemplo, Boder et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:553-557.

5.2.3.3. Ciertos métodos de maduración de la afinidad

En algunas realizaciones, la afinidad de un anticuerpo por un antígeno particular aumenta al someter el anticuerpo a una maduración de la afinidad (o "evolución dirigida") *in vitro*. *In vivo*, los anticuerpos nativos experimentan una maduración de la afinidad a través de hipermutación somática seguida de selección. Algunos métodos *in vitro* imitan

ese proceso *in vivo*, lo que permite la producción de anticuerpos con afinidades iguales o superiores a la de los anticuerpos nativos.

En algunas realizaciones de maduración de la afinidad, se introducen mutaciones en una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Véanse, por ejemplo, Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Brekke et al. (2002) Nat. Reviews 2:52-62. En algunas realizaciones, las mutaciones se introducen en la región variable de la cadena pesada, de la cadena ligera, o de ambas. En algunas realizaciones, las mutaciones se introducen en una o más CDR. En ciertas de estas realizaciones, las mutaciones se introducen en H3, L3, o en ambas. En algunas realizaciones, las mutaciones se introducen en una o más FR. En algunas realizaciones, se crea una biblioteca de mutaciones, por ejemplo, en una biblioteca de presentación en fagos, ribosomas o levaduras, de modo que los anticuerpos con afinidad aumentada pueden identificarse mediante métodos de detección convencionales. Véanse, por ejemplo, Boder et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10701-10705; Foote et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10679-10681; Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien y Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ); y Hanes et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:14130-14135.

En algunas realizaciones, las mutaciones se introducen por mutagénesis específica de sitio basándose en la información sobre la estructura del anticuerpo, por ejemplo, el sitio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, las mutaciones se introducen utilizando mutagénesis combinatoria de CDR. En algunas realizaciones, la totalidad o una porción de la secuencia codificante de la región variable se mutageniza aleatoriamente, por ejemplo, usando células mutadoras de *E. coli*, reorganización de genes homólogos, o PCR propensa a errores. En algunas realizaciones, las mutaciones se introducen utilizando "reordenamiento de ADN". Véanse, por ejemplo, Crameri et al. (1996) Nat. Med. 2:100-102; Fermer et al. (2004) Tumor Biol. 25:7-13.

En algunas realizaciones, el "reordenamiento de cadenas" se utiliza para generar anticuerpos con afinidad aumentada. En algunas realizaciones del reordenamiento de cadenas, una de las cadenas, por ejemplo, la cadena ligera, se reemplaza con un repertorio de cadenas ligeras, mientras que la otra cadena, por ejemplo, la cadena pesada, no se modifica, proporcionando, de este modo, especificidad. En ciertas de estas realizaciones, se crea una biblioteca de anticuerpos de cadenas reordenadas, en donde la cadena pesada sin cambios se expresa en combinación con cada cadena ligera del repertorio de cadenas ligeras. En algunas realizaciones, tales bibliotecas pueden examinarse para detectar anticuerpos con afinidad incrementada. En algunas realizaciones, tanto las cadenas pesadas como las ligeras se reemplazan secuencialmente. En algunas realizaciones, solo se reemplazan las regiones variables de las cadenas pesadas y/o ligeras. En algunas realizaciones, solo se reemplaza una parte de las regiones variables, por ejemplo, las CDR, de las cadenas pesadas y/o ligeras. Véanse, por ejemplo, Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Brekke et al. (2002) Nat. Reviews 2:52-62; Kang et al. (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:11120-11123; Marks et al. (1992) Biotechnol. 10:779-83.

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales de ratón que se unen específicamente a NOTUM humana (incluidos los anticuerpos monoclonales de ratón producidos contra el NOTUM de ratón, pero que se unen específicamente (es decir, reaccionan de forma cruzada) con el NOTUM humana) están sujetos a reordenamiento secuencial de cadenas. En algunas realizaciones, por ejemplo, la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de ratón dado se combina con un nuevo repertorio de cadenas ligeras humanas, y se seleccionan los anticuerpos con la afinidad deseada. En ciertas de estas realizaciones, las cadenas ligeras de los anticuerpos seleccionados se combinan, a continuación, con un nuevo repertorio de cadenas pesadas humanas, y se seleccionan los anticuerpos con la afinidad deseada. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se seleccionan anticuerpos humanos que tienen la especificidad y afinidad de unión a antígeno deseadas.

Como alternativa, en algunas realizaciones, la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de ratón dado se combina con un nuevo repertorio de cadenas ligeras humanas, y se seleccionan los anticuerpos con la afinidad deseada de esta primera ronda de reordenamiento. En algunas realizaciones, la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal de ratón original se combina con un nuevo repertorio de cadenas pesadas humanas, y se seleccionan los anticuerpos con la afinidad deseada de esta segunda ronda de reordenamiento. En algunas realizaciones, las cadenas ligeras humanas de los anticuerpos seleccionados en la primera ronda de reordenamiento se combinan, a continuación, con cadenas pesadas humanas de los anticuerpos seleccionados en la segunda ronda de reordenamiento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se seleccionan anticuerpos humanos que tienen la especificidad y afinidad de unión a antígeno deseadas.

En algunas realizaciones, se utiliza un método de "presentación en ribosomas" que alterna la selección de anticuerpos con la maduración de la afinidad. En algunas realizaciones de un método de presentación en ribosomas, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se amplifica mediante RT-PCR entre las etapas de selección. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se pueden usar polimerasas propensas a errores para introducir mutaciones en el ácido nucleico. Un ejemplo no limitante de tal método se describe en detalle en Hanes et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:14130-14135.

5.2.3.4. Ciertos métodos recombinantes

En algunas realizaciones, se produce un anticuerpo monoclonal usando técnicas recombinantes. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567. En ciertas de estas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican cadenas de anticuerpos monoclonales se clonan y expresan en una célula hospedadora adecuada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARN puede prepararse a partir de células que expresan el anticuerpo deseado, tales como células B maduras o células de hibridoma, usando métodos convencionales. En algunas realizaciones, el ARN se puede usar para producir ADNc utilizando métodos convencionales. En algunas realizaciones, el ADNc que codifica un polipéptido de cadena pesada o ligera se amplifica, por ejemplo, mediante PCR, utilizando cebadores de oligonucleótidos específicos. En algunas realizaciones, el ADNc se clona en un vector de expresión adecuado. En algunas realizaciones, el vector de expresión se transforma o transfecta, a continuación, en una célula hospedadora adecuada, tal como una célula hospedadora que no produce anticuerpo de manera endógena. Ciertas células hospedadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, *E. coli*, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO) y células de mieloma. En algunas realizaciones, en donde las cadenas pesadas y ligeras se coexpresan en el mismo hospedador, se puede aislar el anticuerpo reconstituido.

En algunas realizaciones, se puede modificar el ADNc que codifica una cadena pesada o ligera. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región constante de una cadena pesada o ligera de ratón puede reemplazarse con la región constante de una cadena pesada o ligera humana. De esta manera, en algunas realizaciones, se puede producir un anticuerpo quimérico que posee regiones constantes de anticuerpo humano pero conserva la especificidad de unión de un anticuerpo de ratón.

En algunas realizaciones, una única molécula de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena pesada de un anticuerpo neutralizante de NOTUM y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo neutralizante de NOTUM. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando el anticuerpo es un Fv de cadena sencilla (scFv), la secuencia codificante de la cadena pesada y la secuencia codificante de la cadena ligera forman parte de una secuencia codificante continua de manera que se expresa un único polipéptido, que comprende tanto la cadena pesada como la cadena ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones, una única molécula de ácido nucleico que codifica tanto una cadena pesada como una cadena ligera es capaz de expresar las dos cadenas como polipéptidos separados. En algunas de dichas realizaciones, cada cadena está bajo el control de un promotor separado. En algunas realizaciones, las dos cadenas están bajo el control del mismo promotor. Un experto en la materia puede seleccionar una configuración adecuada y elementos de control adecuados para la cadena pesada y ligera del anticuerpo neutralizante de NOTUM de acuerdo con la aplicación prevista.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un vector, tal como un vector de expresión adecuado para expresar la cadena pesada y/o la cadena ligera en una célula hospedadora particular. Un experto en la materia puede seleccionar un vector de expresión adecuado, o vectores de expresión, de acuerdo con las células hospedadoras que se van a usar para la expresión. Muchos de tales vectores ejemplares son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena pesada de un anticuerpo neutralizante de NOTUM seleccionado de MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78, y versiones humanizadas de tales MAb. En algunas de dichas realizaciones, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 101, 103, 105, 107, 109, 115, 116, 119, 120, 123, 124, 127 y 128. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena ligera de un anticuerpo neutralizante de NOTUM seleccionado de MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78, y versiones humanizadas de tales MAb. En algunas de dichas realizaciones, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 102, 104, 106, 108, 110, 117, 118, 121, 122, 125, 126, 129 y 130. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena pesada y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena ligera, de un anticuerpo neutralizante de NOTUM seleccionado de MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.1029 y 2.78, y versiones humanizadas de dichos MAb.

En algunas realizaciones, los anticuerpos recombinantes pueden expresarse en ciertas líneas celulares. En algunas realizaciones, as secuencias que codifican anticuerpos particulares se pueden usar para la transformación de una célula hospedadora de mamífero adecuada. De acuerdo con determinadas realizaciones, la transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora. Ciertos métodos ejemplares incluyen, pero sin limitación, empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula hospedadora con el virus (o vector) y usar ciertos procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica por las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. En algunas realizaciones, el procedimiento de transformación utilizado puede depender del hospedador que a transformar. Ciertos métodos ejemplares para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del (de los) polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Ciertas líneas celulares ejemplares de mamíferos disponibles como hospedadores para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen, pero sin limitación, muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC), incluyendo células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y varias líneas celulares diferentes. En algunas realizaciones, las líneas celulares pueden seleccionarse determinando qué líneas celulares producen altos niveles de anticuerpos que se unen específicamente a NOTUM.

5.3 Anticuerpos monoclonales para su uso en tratamiento

Esta invención abarca un método para estimular la formación de hueso endocortical en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. También abarca un método para aumentar el espesor del hueso cortical, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención.

Esta invención abarca un anticuerpo monoclonal que se une a NOTUM humana y reduce la actividad de NOTUM humana en un ensayo OPTS *in vitro*, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la pérdida ósea. El método comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención. Ejemplos de enfermedades y trastornos incluyen osteoporosis (*p.ej.*, osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis inducida por esteroides o glucocorticoides, osteoporosis masculina y osteoporosis idiopática), osteopenia y enfermedad de Paget.

En el presente documento también se describe un método para tratar, gestionar o prevenir las fracturas óseas, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento. Las fracturas óseas particulares están asociadas con enfermedad ósea metastásica, es *decir*, cáncer que ha hecho metástasis en hueso. Ejemplos de cánceres que pueden hacer metástasis en hueso incluyen el cáncer de próstata, mama, pulmón, tiroides y riñón.

Esta invención también abarca un anticuerpo monoclonal que se une a NOTUM humana y reduce la actividad de NOTUM humana en un ensayo OPTS *in vitro*, para su uso en un método para tratar, gestionar o prevenir la pérdida ósea asociada con, o causada por, una enfermedad o trastorno. El método comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención. Ejemplos de enfermedades y trastornos incluyen enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, síndrome de Cushing, hiperparatiroidismo, enfermedad inflamatoria del intestino y colitis ulcerosa.

Pacientes ejemplares no limitantes que pueden beneficiarse de los anticuerpos y anticuerpos para su uso de acuerdo con esta invención incluyen hombres y mujeres de 55 años o más, mujeres postmenopáusicas y pacientes que padecen insuficiencia renal.

Los anticuerpos de la invención y los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se pueden administrar en combinación (por ejemplo, en el mismo momento o en momentos diferentes) con otros medicamentos que se sabe que son útiles en el tratamiento, gestión o prevención de enfermedades o afecciones que afectan el hueso. Los ejemplos incluyen: moduladores de los receptores de andrógenos; bisfosfonatos; calcitonina; antagonistas del receptor sensibilizante del calcio; anticuerpos contra RANKL, inhibidores de la cathepsina K; estrógenos y moduladores de los receptores de estrógenos; aglutinantes de integrinas, antagonistas de anticuerpos y receptores; hormona paratiroidea (PTH) y análogos y miméticos de la misma; y vitamina D y análogos de vitamina D sintéticos.

Ejemplos de moduladores de los receptores de andrógenos incluyen finasterida y otros inhibidores de la 5 α -reductasa, nilutamida, flutamida, bicalutamida, liarozol y acetato de abiraterona.

Ejemplos de bifosfonatos incluyen alendronato, cimadronato, clodronato, etidronato, ibandronato, incadronato, minodronato, neridronato, olpadronato, pamidronato, piridronato, risedronato, tiludronato y zoledronato, y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Ejemplos de inhibidores de la cathepsina K incluyen VEL-0230, AAE581 (balicatib), MV061194, SB-462795 (relacatib), MK-0822 (odanacatib) y MK-1256.

Ejemplos de estrógenos y moduladores de los receptores de estrógenos incluyen estrógenos de origen natural (*por ejemplo*, 7-estradiol, estrona y estriol), estrógenos conjugados (*por ejemplo*, estrógenos equinos conjugados), anticonceptivos orales, estrógenos sulfatados, progestágeno, estradiol, droloxifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, TSE-424, tamoxifeno, idoxifeno, LY353381, LY117081, toremifeno, fulvestrant, 4-[7-(2,2-dimetil-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopirán-3-il)-fenil]-2,2-dimetilpropanoato, 4,4'-dihidroxibenzofenona-2,4-dinitrofenilhidrazona y SH646.

Ejemplos de aglutinantes de integrinas, anticuerpos y antagonistas de receptores incluyen vitaxin (MEDI-522), cilengtida y L-000845704.

5.4. Formulaciones farmacéuticas

Esta invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la invención, y opcionalmente uno o más fármacos diferentes, tal como los descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, se puede usar un anticuerpo neutralizante de NOTUM como un anticuerpo terapéutico. Anticuerpos neutralizantes de NOTUM ejemplares a usar como anticuerpos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos. Los expertos en la materia están familiarizados con el uso de anticuerpos como agentes terapéuticos.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo contra NOTUM y un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo contra NOTUM y una cantidad eficaz de al menos, un agente terapéutico adicional, junto con un diluyente, transportador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, se selecciona al menos un agente terapéutico adicional de los descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, los materiales de formulación para composiciones farmacéuticas no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, tasa de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. En algunas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (por ejemplo, glicina, glutamina, asparagina, arginina y lisina); antimicrobianos; antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, sulfito de sodio y hidrogenosulfito de sodio), tampones (por ejemplo, borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos y otros ácidos orgánicos); agentes de carga (por ejemplo, manitol y glicina); agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)); agentes complejantes (por ejemplo, cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina e hidroxipropil-beta-ciclodextrina; cargas; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (por ejemplo, albúmina sérica, gelatina e inmunoglobulinas); agentes colorantes, saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (por ejemplo, polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (por ejemplo, sodio); conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno); disolventes (por ejemplo, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol); alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (por ejemplo, pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80), tritón, trometamina, lecitina, colesterol y tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (por ejemplo, sacarosa y sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (por ejemplo, haluros de metales alcalinos (por ejemplo, cloruro de sodio o potasio), manitol y sorbitol); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes; y adyuvantes farmacéuticos. (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM u otra molécula terapéutica está vinculado a un vehículo que prolonga la semivida. Vehículos que prolongan la semivida ejemplares no limitantes incluyen los conocidos en la técnica. Dichos vehículos incluyen, pero sin limitación, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Se describen tales vehículos ejemplares, por ejemplo, en la solicitud PCT publicada N.º WO 99/25044.

En algunas realizaciones, un experto en la materia determinará una composición farmacéutica óptima dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosis deseada. Véanse, por ejemplo, "*Remington's Pharmaceutical Sciences*", citado anteriormente. En algunas realizaciones, dichas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* o tasa de eliminación *in vivo* de un anticuerpo neutralizante.

En algunas realizaciones, un vehículo o transportador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un vehículo o transportador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Vehículos ejemplares incluyen, pero sin limitación, solución salina tamponada neutra y solución salina mezclada con albúmina sérica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En algunas realizaciones, una composición que comprende un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede prepararse para el almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tenga el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, citado anteriormente) en la forma de una masa liofilizada o una solución acuosa. En algunas realizaciones, una composición que comprende un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se

puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

En algunas realizaciones, se selecciona una composición farmacéutica para administración parenteral. En algunas realizaciones, se selecciona una composición farmacéutica para inhalación o para suministro a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. Diversas técnicas para preparar composiciones farmacéuticamente aceptables están dentro de la experiencia de un experto en la materia.

En algunas realizaciones, los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En algunas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, generalmente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

En algunas realizaciones, cuando se contempla la administración parenteral, una composición farmacéutica puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende el anticuerpo deseado para NOTUM, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, cuando se contempla la administración parenteral, una composición farmacéutica puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende el anticuerpo deseado contra NOTUM, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, un vehículo para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que el anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se formula como una solución isotónica estéril, conservada adecuadamente. En algunas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar el control o liberación sostenida del producto que a continuación puede suministrarse a través de una inyección de depósito. En algunas realizaciones, también se puede usar ácido hialurónico, y puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. En algunas realizaciones, pueden usarse dispositivos de suministro de fármacos implantables para introducir la molécula deseada.

En algunas realizaciones, puede formularse una composición farmacéutica para inhalación. En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse como un polvo seco para inhalación. En algunas realizaciones, una solución para inhalación que comprende un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse con un propelente para el suministro en aerosol. En algunas realizaciones, las soluciones se pueden nebulizar.

En algunas realizaciones, se puede administrar una formulación por vía oral. En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, que se administra de esta manera puede formularse con o sin transportadores usados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En algunas realizaciones, se puede diseñar una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. En algunas realizaciones, se puede incluir al menos un agente adicional para facilitar la absorción del anticuerpo contra NOTUM con o sin ningún agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, también pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de comprimidos y/o aglutinantes.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. En algunas realizaciones, las soluciones pueden prepararse en forma de dosis unitaria disolviendo los comprimidos en agua estéril u otro vehículo apropiado. Excipientes ejemplares incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes (por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, lactosa y fosfato de calcio); agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón, gelatina y goma arábica); y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico y talco).

Pueden ser evidentes para los expertos en la materia, composiciones farmacéuticas adicionales, incluyendo formulaciones que comprenden un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en formulaciones de suministro sostenido o controlado. Formulaciones ejemplares de suministro sostenido o controlado incluyen, pero sin limitación, transportadores de liposomas, micropartículas bioerosionables, perlas porosas e inyecciones de depósitos. Los expertos en la materia conocen diversas técnicas para preparar formulaciones. En algunas realizaciones, las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos con forma, *p. ej.*, películas o microcápsulas. Matrices de liberación sostenida ejemplares incluyen, pero sin limitación, poliésteres, hidrogeles, polilactidas (*véase, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos N.º 3.773.919 y EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (*véase, por ejemplo*, Sidman *et al.* (1983) *Biopolymers* 22: 547-556), poli (2-hidroxietilmetacrilato) (*véase, por ejemplo*, Langer *et al.* (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 y Langer (1982) *Chem. Tech.* 12:98-105), etileno vinil acetato (Langer *et al.*, *citado anteriormente*), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). En algunas realizaciones, las composiciones de liberación sostenida pueden incluir liposomas, que se pueden preparar, en algunas realizaciones, por cualquiera de los distintos métodos conocidos en la técnica. Véase, *por*

ejemplo, Eppstein *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; documento EP 036.676; documento EP 088.046; y documento EP 143.949.

5 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica para usarse para administración *in vivo* es generalmente estéril. En algunas realizaciones, esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En algunas realizaciones, cuando la composición está liofilizada, la esterilización utilizando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. En algunas realizaciones, la composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. En algunas realizaciones, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

15 En algunas realizaciones, una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. En algunas realizaciones, dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar o en una forma (*por ejemplo*, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

20 En algunas realizaciones, se proporcionan kits para producir una unidad de administración de dosis única. En algunas realizaciones, los kits pueden contener cada uno un primer recipiente que tiene una proteína seca y un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En algunas realizaciones, se incluyen kits que contienen jeringas precargadas de una o varias cámaras (*por ejemplo*, jeringas líquidas y liojeringas).

25 En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, para emplearse de manera terapéutica dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos del tratamiento. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, de acuerdo con algunas realizaciones, variarán, de este modo, dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación para la cual el anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se está utilizando, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y el estado general de salud) del paciente. En algunas realizaciones, el médico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. En algunas realizaciones, una dosis típica puede variar desde aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal del paciente, hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, la dosis puede variar desde 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, incluyendo todos las comas(incluyendo fracciones) entre cualquiera de los puntos finales anteriores. En algunas realizaciones, la dosis está entre aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal.

45 En algunas realizaciones, una dosis humana de un anticuerpo neutralizante contra NOTUM se determina basándose en la dosis eficaz del mismo anticuerpo en otra especie, tales como ratones, perros, monos, etc. En algunas realizaciones, una dosis humana de un anticuerpo neutralizante contra NOTUM se determina utilizando la "Guía para la industria: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers," Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, Administración de Alimentos y Medicamentos, y Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER), Julio de 2005 (Pharmacology and Toxicology).

50 En algunas realizaciones, una dosificación adecuada puede determinarla un experto en la materia, por ejemplo, basándose en estudios animales.

55 En diversas realizaciones, se administra un anticuerpo neutralizante contra NOTUM a un paciente dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses o incluso con menos frecuencia.

60 En algunas realizaciones, la frecuencia de la dosificación tendrá en cuenta los parámetros farmacocinéticos de un anticuerpo contra NOTUM y, si procede, cualquier agente terapéutico adicional en la formulación utilizada. En algunas realizaciones, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. En algunas realizaciones, por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. En algunas realizaciones, el refinamiento adicional de la dosis apropiada se realiza rutinariamente por los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas que rutinariamente realizan. En algunas realizaciones, las dosis apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de dosis respuesta apropiados. En algunas realizaciones, un paciente recibe

una dosis de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra NOTUM. En algunas realizaciones, un paciente recibe una, dos, tres o cuatro dosis por día de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra NOTUM. En algunas realizaciones, un paciente recibe una, dos, tres, cuatro, cinco o seis dosis por semana de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra NOTUM. En algunas realizaciones, un paciente recibe una, dos, tres o cuatro dosis por mes de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra NOTUM.

En algunas realizaciones, la vía de administración de la composición farmacéutica de la invención está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral, a través de inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, o intralesional; por sistemas de liberación sostenida o por dispositivos de implantación. En algunas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o continuamente mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación.

En algunas realizaciones, la composición puede administrarse localmente a través de la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En algunas realizaciones, cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede realizarse mediante difusión, bolo de liberación programada o administración continua.

En algunas realizaciones, un anticuerpo contra NOTUM, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se suministra mediante la implantación de ciertas células que se han modificado genéticamente, utilizando métodos como aquellos descritos en el presente documento, para expresar y segregar los polipéptidos. En algunas realizaciones, tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En algunas realizaciones, las células pueden ser inmortalizadas. En algunas realizaciones, para reducir la posibilidad de una respuesta inmunitaria, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración en los tejidos circundantes. En algunas realizaciones, los materiales de encapsulación son, por lo general, cerramientos o membranas poliméricas semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación de los productos proteicos, pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

6. Ejemplos

6.1. Ratón Knock-out

Los ratones homocigotos para una mutación genéticamente modificada en el ortólogo murino del gen NOTUM humano se generaron utilizando los correspondientes clones de células madre embrionarias mutadas (ES) de la colección OMNIBANK de clones de células ES murinas mutadas (véase en general, la patente de EE.UU. N° 6.080.576). En resumen, los clones de células ES que contenían una inserción viral mutagénica en el locus NOTUM murino se microinyectaron en blastocistos que, a su vez, se implantaron en hospedadores femeninos pseudopreñados y se llevaron a término. Las crías quiméricas resultantes se criaron posteriormente en ratones C57 black 6 hembra y se comprobó la descendencia para la transmisión de la línea germinal del alelo NOTUM eliminado. Los animales heterocigotos para el alelo NOTUM mutado se criaron posteriormente para producir descendientes que eran homocigotos para el alelo NOTUM mutado, heterocigotos para el alelo NOTUM mutado, o descendientes de tipo silvestre en una relación aproximada de 1: 2: 1.

Los ratones homocigotos (-/-) para la alteración del gen NOTUM se estudiaron junto con ratones, compañeros de camada, heterocigotos (+/-) para la alteración del gen NOTUM y de tipo silvestre (+/+). Durante este análisis, los ratones se sometieron a un tratamiento médico utilizando un conjunto integrado de procedimientos de diagnóstico médico diseñados para evaluar la función de los sistemas de órganos principales en un sujeto mamífero. Al estudiar los ratones "knockout" homocigotos (-/-) en los números descritos y en conjunto con compañeros de camada heterocigotos (+/-) y de tipo silvestre (+/+), se obtuvieron datos más confiables y repetibles.

Como se muestra en la Figura 1, los ratones machos con alteración homocigótica del gen NOTUM ("hom") mostraron mayores espesores corticales en varios sitios de huesos, en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre a las 16 semanas de edad (número de ratones N = 10 para ambos grupos). Estas diferencias, que se midieron por medio de microCT (Scanco μ CT40), fueron: 28% (p < 0,001) en la diáfisis del fémur; 19% (p < 0,001) en la diáfisis del húmero; 17% (p < 0,001) en la diáfisis de la tibia; y 11 % (p < 0,001) en la unión de la tibia con el peroné. Como se muestra en la Figura 2, a las 16 semanas de vida, el espesor del hueso cortical de la diáfisis del fémur de ratones heterocigotos para la mutación NOTUM ("het") también fue mayor que el de sus compañeros de camada de tipo silvestre: los machos het (N = 50) mostraron un aumento del 6% (p = 0,007) en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre (N = 23); y las hembras het (N = 57) mostraron un aumento del 9% (p < 0,001) en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre (N = 22).

Las manifestaciones prácticas de la redistribución observada de la formación ósea en animales NOTUM se reflejan en las Figuras 3 y 4, que muestran los resultados de las pruebas de resistencia a la rotura del fémur (realizadas por

SkeleTech, ahora Ricerca Biosciences) utilizando una prueba de flexión convencional de 4 puntos. Como se muestra en la Figura 3, que proporciona resultados obtenidos para ratones macho a las 16 semanas de edad, los het (N = 20) mostraron un aumento del 5% ($p = 0,54$) en la resistencia a la rotura del fémur en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre (N = 23), mientras que los hom (N = 17) exhibieron un aumento del 28% ($p < 0,001$). Por otro lado, las pruebas de compresión de la columna vertebral de los hom y het para NOTUM no mostraron una reducción significativa en los cargas máximas de compresión de la columna vertebral en comparación con los controles de tipo silvestre. Se obtuvieron resultados similares para ratones hembra a las 16 semanas de edad. Como se muestra en la Figura 4, las het (N = 20) mostraron un aumento del 12% ($p = 0,04$) en la resistencia a la rotura del fémur en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre (N = 21), mientras que las hom (N = 18) mostraron un 28% ($p < 0,001$) aumento. El análisis de estos y otros datos reveló una fuerte correlación entre el espesor cortical y la resistencia a la rotura del fémur.

6.2. Producción y purificación de proteínas NOTUM recombinantes

Se subclonaron las secuencias codificantes de longitud completa para NOTUM humana, catalíticamente inactiva humana (S232A), de ratón, catalíticamente inactiva de ratón (S239A), de rata, de cobaya, de mono cynomolgus, y de mono rhesus, cada una con una etiqueta de epítipo 6XHis C-terminal, en el vector de expresión pIRESpuro2 (Clontech). Las construcciones de expresión se pueden usar para generar un medio condicionado que contenga la proteína NOTUM secretada por transfección transitoria, o para establecer transfectantes estables para la generación de mayores cantidades de medio condicionado, por ejemplo, para la purificación posterior de la proteína NOTUM.

Las células HEK293F se transfectaron utilizando Lipofectamine2000 (Invitrogen) y se cultivaron en cultivo en suspensión en medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen) en matraces de agitación. Para las transfecciones transitorias, el medio condicionado se recolectó cuatro días después de la transfección, se filtró de forma estéril y se almacenó a 4 °C. Para la generación de líneas celulares que expresan de forma estable la proteína NOTUM, se seleccionó la integración genómica del plásmido de expresión en presencia de puromicina.

La expresión y secreción de la proteína NOTUM se confirmó mediante transferencia Western de lisados celulares y/o medio condicionado, usando un anticuerpo anti-His. La subclonación de transfectantes estables a granel que producen NOTUM mediante dilución limitante permitió la identificación mediante transferencia Western anti-His de clones individuales que expresan NOTUM a niveles relativamente altos.

Para producir proteínas NOTUM de ratón y humanas purificadas a escala de 10-20 mg, se expandieron las líneas celulares HEK293F clonales que expresaban NOTUM de ratón o humana en cultivo en suspensión hasta un volumen de 3 l. Cuando la densidad celular en este volumen alcanzó 1×10^6 células viables por ml, las células se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en medio de expresión Freestyle 293 fresco y se mantuvieron en cultivo durante otras 96 horas sin cambios de medio adicionales. Después de 96 horas, los cultivos se recolectaron, las células se sedimentaron por centrifugación y el medio condicionado se filtró de forma estéril y se almacenó a 4 °C para su posterior procesamiento.

Inmediatamente antes de la purificación, el medio condicionado que contenía NOTUM se concentró de 3 l a 1 l y a continuación, se intercambió el tampón en un tampón de cromatografía de afinidad de metal (IMAC) inmovilizado con níquel (Tris-HCl 20 mM, imidazol 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4) por filtración de flujo tangencial utilizando una membrana con un límite de peso molecular nominal de 10 kDa. El medio condicionado concentrado, con tampón intercambiado se aplicó a continuación a una columna de quelato de metal equilibrada, cargada con níquel. La proteína unida se lavó y se eluyó utilizando un gradiente de concentración de imidazol. Las fracciones de elución que contenían proteína NOTUM pura se agruparon y se dializaron frente a solución salina tamponada con fosfato para eliminar el tampón de elución. La proteína dializada purificada se dividió en partes alícuotas y se congeló a -80 °C.

Para cada lote de proteínas, se utilizó una alícuota para determinar la concentración de proteínas mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific, Rockford, IL), la pureza por SDS PAGE seguida de tinción con Coomassie o de plata, la actividad tanto en el ensayo enzimático OPTS libre de células (descrito en el Ejemplo 6.4.1 a continuación) como en el ensayo de señalización Wnt basado en células (descrito en el Ejemplo 6.4. 2, a continuación), y la concentración de endotoxinas mediante el ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) (Lonza, Basel, Suiza).

6.3. Generación de Anticuerpos Monoclonales de Ratón contra NOTUM

Se generaron anticuerpos contra proteínas NOTUM humana y de ratón recombinantes purificadas en dos campañas de inmunización separadas.

En la campaña 1, se inmunizaron ratones homocigotos para una inserción de trampa génica en el gen NOTUM y, por lo tanto, carentes de proteína NOTUM endógena, con la proteína NOTUM humana de la siguiente manera. Los ratones se cebaron con 20 µg de proteína NOTUM humana en adyuvante completo de Freund inyectado por vía intraperitoneal. Los ratones se reforzaron con 20 µg de proteína NOTUM humana en adyuvante incompleto de Freund inyectado por vía intraperitoneal cada dos a tres semanas. Los ratones que mostraron un título de suero

fuerte contra NOTUM humana según lo determinado por ELISA recibieron un refuerzo final de 10 µg de proteína NOTUM humana en PBS inyectado por vía intravenosa (i.v.).

En la campaña 2, se inmunizaron ratones homocigotos para una inserción de trampa génica en el gen NOTUM a través de las patas traseras con una inmunización de cebado de 10 µg de proteína NOTUM de ratón en adyuvante TiterMax con ADN CpG seguido de diez refuerzos de 10 µg de proteína NOTUM de ratón en adyuvante de alumbre con ADN CpG a intervalos de tres o cuatro días. Los ganglios linfáticos inguinales y poplíteos se recolectaron de ratones de título alto después de un refuerzo final de la pata con 10 µg de proteína NOTUM de ratón en PBS.

Se recogieron los bazo de ratones reforzados i.v. o los ganglios linfáticos de los ratones inmunizados en las patas, cuatro días después del refuerzo final y se trituraron y se estiraron para producir una suspensión celular. Los glóbulos rojos se lisaron y la suspensión de células se enriqueció para determinar las células B mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos para poblaciones de células no B. Los hibridomas se generaron mediante fusión electrocelular de células B enriquecidas con células de mieloma NS1 de ratón y se sembraron en placas de 96 pocillos en medio de hibridoma que contenía hipoxantina y aminopterina para seleccionar hibridomas de células B viables/células de mieloma.

Los hibridomas se seleccionaron para la producción de anticuerpos específicos de NOTUM mediante el ensayo del medio condicionado de hibridoma para determinar la inmunoreactividad con la proteína NOTUM adsorbida pasivamente en un formato ELISA. Se encontraron cientos de hibridomas que secretaban anticuerpos específicos para NOTUM de ratón y/o humana en ambas campañas de inmunización.

6.4. Ensayos de Neutralización de NOTUM

6.4.1. Ensayo OPTS

En el ensayo OPTS, se utiliza, para medir la actividad de NOTUM, 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trisulfonato trisódico (OPTS), un sustrato enzimático soluble en agua para los ensayos fluorimétricos de esterasas y lipasas. La escisión enzimática del enlace éster en OPTS produce un producto fluorescente.

Se encontró que el medio condicionado para hibridomas en general interfería en el ensayo de OPTS, tal vez debido a la liberación de hidrolasas de las células moribundas que también podrían escindir el OPTS. Por esta razón, se generó medio condicionado adicional para hibridomas para aquellas líneas que originalmente mostraban el nivel más alto de actividad de unión por ELISA y el anticuerpo se purificó en un formato de 96 pocillos mediante cromatografía de afinidad usando perlas de proteína A. Estos anticuerpos purificados se probaron, a continuación, en el ensayo OPTS a una dilución de cuatro veces sin cuantificación previa.

Los anticuerpos se probaron por cuadruplicado en placas de 384 pocillos. Se añadieron 12,5 µl que contenían 125 ng de NOTUM purificada en tampón de reacción 4X (CaCl₂ 20 mM, MgCl₂ 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) a 12,5 µl de anticuerpo purificado. Después de la mezcla, el anticuerpo y NOTUM se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, seguido de la adición de 25 µl de OPTS 1,25 µM (Sigma, número de catálogo 74875) en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Después de la mezcla, la reacción enzimática se dejó proceder a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de detenerse mediante la adición de 25 µl de SDS al 3%. Las placas se leyeron en un lector de placas Envision con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm para cuantificar la cantidad de producto de escisión.

La selección de 1.135 hibridomas inmunoreactivos de NOTUM humana de la Campaña 1 produjo tres anticuerpos que mostraron una inhibición superior al 70% de NOTUM humana. Estos tres, junto con cinco hibridomas adicionales que mostraron cierto grado de neutralización en el ensayo OPTS, se seleccionaron para la subclonación mediante dilución limitante y para la producción de anticuerpos purificados a pequeña escala mediante cromatografía de afinidad con proteína A utilizando 50 ml de medio condicionado de hibridomas clonales.

El análisis del ensayo OPTS de 1.056 hibridomas inmunoreactivos de NOTUM de ratón identificados de la campaña 2 produjo seis anticuerpos que mostraron una inhibición superior al 50% de NOTUM de ratón. Estos seis junto con otros seis hibridomas que muestran cierto grado de neutralización en el ensayo OPTS se seleccionaron para la subclonación mediante dilución limitante y para la producción de anticuerpos purificados a pequeña escala mediante cromatografía de afinidad con proteína A utilizando 50 ml de medio condicionado de hibridomas clonales.

6.4.2. Ensayo de señalización Wnt

NOTUM puede actuar como un regulador negativo de la señalización Wnt. La actividad neutralizante de los anticuerpos, determinada por el efecto en la señalización Wnt, se determinó en un ensayo de señalización Wnt, que utiliza la tecnología CellSensor® y los medios condicionados preparados de la siguiente manera. Se transfectó el plásmido que contenía NOTUM humana en el vector pcDNA3.1(+) en células HEK293 y los clones se seleccionaron mediante el crecimiento en presencia de 400 µg/ml de G418. Se usaron medios de condición para estas células para el ensayo. Las células L que sobreexpresan y secretan Wnt3a en los medios condicionados se adquirieron de ATCC.

El protocolo de ensayo fue el siguiente. Se cultivaron células 293F de CellSensor®LEF/TCF-bla Freestyle™ (Invitrogen) hasta casi la confluencia en placas de 15 cm en DMEM con FBS dializado al 10%, 5 µg/ml de Blasticidina (Invitrogen, R210-01), NEAA 0,1 mM, HEPES 25 mM y 1x de GPS. Las células se tripsinizaron primero enjuagándolas con PBS, seguido de la adición de 5 ml de tripsina y la incubación de las placas a temperatura ambiente durante dos minutos. Se añadió a continuación, un total de 10 ml de medio de ensayo (Opti-MEM, más FBS dializado al 0,5%, NEAA 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM, 1x GPS), por placa de 15 cm. Las células se contaron y se suspendieron a 50.000 células por ml. Las células se sembraron en placas de 384 pocillos Biocoat (Fisher, n.º de catálogo 356663) a una densidad de 10000 células por 20 µl por pocillo. Después de incubación de las células a 37 °C durante 3 horas, se añadieron 10 µL de LiCl 30 mM en medio de ensayo por pocillo, seguido de incubación a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se incubaron conjuntamente 15 µl de anticuerpo y 15 µl de NOTUM purificada, ambos en medio de ensayo, en un volumen total de 45 µl de medio de ensayo a temperatura ambiente durante 30 minutos en una placa de 96 pocillos. NOTUM se usó en una concentración determinada previamente para proporcionar una inhibición del 50% en el ensayo, generalmente 25 nM. Después de la incubación de 30 minutos, se agregaron 15 µl de medio condicionado L-Wnt3a no diluido a la mezcla de 45 µl de anticuerpo/NOTUM, y se agregaron 10 µl de la mezcla resultante a los pocillos de la placa de 384 pocillos que contiene las células CellSensor®, por cuadruplicado. Los controles incluyeron pocillos que carecían de células, pocillos que carecían de NOTUM y pocillos que carecían de medio condicionado L-Wnt3a. La placa de ensayo se incubó durante 5 horas a 37 °C para permitir la regulación positiva de beta-lactamasa mediada por Wnt, y a continuación, se agregaron 8 µl de sustrato LiveBLazer™ -FRET B/G (CCF4-AM, Invitrogen) a cada pocillo y la placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 3 horas. Las placas se leyeron, a continuación, en un lector de placas Envision utilizando una longitud de onda de excitación de 400 nm y unas longitudes de onda de emisión de 460 nm y 535 nm.

6.5. Caracterización de anticuerpos neutralizantes de NOTUM

Los anticuerpos purificados a partir de hibridomas clonales se caracterizaron con respecto a la reactividad cruzada de sus especies mediante ELISA, su capacidad para reconocer la proteína NOTUM desnaturalizada reducida mediante transferencia Western y su potencia neutralizadora en el ensayo OPTS sin células y el ensayo de señalización Wnt basado en células, los cuales se describen, ambos, anteriormente en el Ejemplo 6.4.

Las pruebas funcionales de anticuerpos monoclonales de la Campaña 1 revelaron tres anticuerpos, 1.802, 1.815, 1.846, que neutralizan la NOTUM humana en los ensayos tanto OPTS como de señalización Wnt con una IC₅₀ en el intervalo de 1 a 10 nM. Estos anticuerpos no tienen ningún efecto sobre la actividad de NOTUM de ratón y el ELISA demostró que se unen al NOTUM humana pero no a NOTUM de ratón. Asimismo, estos anticuerpos reconocieron NOTUM humana solo débilmente cuando la proteína NOTUM se adsorbió pasivamente a la placa de ensayo y fue mucho más sensible a la proteína NOTUM humana presentada anti-His.

La Tabla 1 muestra los resultados de varios experimentos de caracterización para ciertos anticuerpos de la Campaña 1. Los datos en la columna "Bin" se generaron utilizando el método descrito en el Ejemplo 6.6, a continuación.

Tabla 1: Caracterización de ciertos anticuerpos producidos contra NOTUM humana

Anticuerpo	Isotipo	Bin	IC ₅₀ de OPTS (nM; NOTUM humana)	IC ₅₀ de señalización Wnt (nM; NOTUM humana)	IC ₅₀ de OPTS (nM; NOTUM de ratón)	IC ₅₀ de señalización Wnt (nM; NOTUM de ratón)	Unión a NOTUM de ratón	Unión de transferencia Western
1.802	IgG1	1	6,44	5,71	Sin inhibición	Sin inhibición	No	No
1.815	IgG1	1	7,62	6,88	Sin inhibición	nd	No	No
1.846	IgG2b	1	10,07	1,70	Sin inhibición	nd	No	No
1.731 *	IgG1	3	>166,67	15,52	196,74	Sin inhibición	Sí	Sí
1.655 *	IgG1	3	>166,67	nd	>166,67	nd	nd	Sí
1.168 *	IgG2a	4	56,61	Sin inhibición	Sin inhibición	nd	Sí	Sí
1.712 *	IgG2a	2	125,36	58,49	Sin inhibición	nd	Sí	Sí

Anticuerpo	Isotipo	Bin	IC ₅₀ de OPTS (nM; NOTUM humana)	IC ₅₀ de señalización Wnt (nM; NOTUM humana)	IC ₅₀ de OPTS (nM; NOTUM de ratón)	IC ₅₀ de señalización Wnt (nM; NOTUM de ratón)	Unión a NOTUM de ratón	Unión de transferencia Western
1.807 *	IgG2a	2	nd	Sin inhibición	Sin inhibición	nd	Sí	Sí
* = anticuerpo comparativo								

Las pruebas funcionales de anticuerpos monoclonales de la Campaña 2 revelaron perfiles de actividad interesantes. En particular, El MAb 2.78 neutralizó NOTUM tanto de ratón como humana en ambos ensayos de OPTS y de señalización Wnt con una IC₅₀ en el intervalo de 3 a 50 nM, mientras que el MAb 2.1029 neutralizó NOTUM tanto de ratón como humana en el ensayo OPTS con una IC₅₀ en el intervalo de 5 a 30 nM pero solo NOTUM humana en el ensayo de señalización Wnt con una IC₅₀ de 14 nM. Esta última observación se atribuyó a que había alguna diferencia en la calidad de las proteínas NOTUM de ratón y humana recombinantes. Una diferencia conocida entre las proteínas es que la NOTUM de ratón recombinante existe como multímeros/agregados en un grado mucho mayor que la NOTUM humana recombinante. Ni 2.78 ni 2.1029 reconocieron la proteína NOTUM reducida y desnaturizada mediante transferencia Western, y ambas fueron sustancialmente más inmunorreactivas con NOTUM presentada anti-His que con NOTUM adsorbida pasivamente.

La Tabla 2 muestra los resultados de varios experimentos de caracterización para ciertos anticuerpos de la Campaña 2. Los datos en la columna "Bin" se generaron utilizando el método descrito en el Ejemplo 6.6, a continuación.

Tabla 2: Caracterización de ciertos anticuerpos producidos contra NOTUM de ratón

Anticuerpo	Isotipo	Bin	IC ₅₀ de OPTS (nM; NOTUM de ratón)	IC ₅₀ de señalización Wnt (nM; NOTUM de ratón)	IC ₅₀ de OPTS (nM; NOTUM humana)	IC ₅₀ de señalización Wnt (nM; NOTUM humana)	Unión a NOTUM humana	Unión de transferencia Western
2.78	IgG2b	2	35,65	3,75	15,49	45,94	Sí	No
2.1029	IgG2a	3	29,19	Sin inhibición	5,77	14,02	Sí	No
2.816 *	IgG2a	3	31,70	Sin inhibición	Sin inhibición	39,11	Sí	No
2.856 *	IgG2b	3	37,70	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sí	No
2.1001 *	IgG2b	3	>166,67	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	No	Sí
2.55 *	IgG2a	1	26,13	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sí	Sí
2.1002 *	IgG2a	1	42,39	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sí	Sí
2.497 *	IgG2a	1	54,95	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sí	Sí
2.341 *	IgG2a	1	56,95	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sí	Sí
2.236 *	IgG2a	1	64,54	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sí	Sí
2.688 *	IgG2a	4	Sin inhibición	Sin inhibición	12,84 [‡]	Sin inhibición	Sí	No
2.1006 *	IgG2a	5	>166,67	Sin inhibición	>166,67 [‡]	Sin inhibición	Sí	Sí

[‡] Inhibición máxima = 50%.

* anticuerpo comparativo

6.6. Estudios de Competencia de Unión Utilizando Anticuerpos Neutralizantes de NOTUM

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos de ambas campañas de inmunización para interferir entre sí en la unión a la proteína NOTUM en un ensayo de unión a epítopos. Este ensayo se realizó en un formato ELISA utilizando proteína NOTUM capturada anti-His. La proteína NOTUM capturada se incubó con un exceso de un anticuerpo específico para NOTUM no marcado (el anticuerpo 'bloqueante') seguido de la adición de un anticuerpo específico para NOTUM biotinilado (el anticuerpo 'sonda'). La unión del anticuerpo sonda se midió utilizando HRP conjugado con estreptavidina. Si los dos anticuerpos compiten por la unión en el mismo espacio del epítipo o si el anticuerpo bloqueante afecta de otro modo la capacidad del anticuerpo de la sonda para unirse, por ejemplo, por interferencia

alostérica, no se genera ninguna señal. Si los dos anticuerpos no interfieren entre sí, se genera una señal similar a la del anticuerpo biotinilado probado en ausencia de anticuerpo bloqueante. Los anticuerpos se prueban en un formato de matriz recíproca. Generalmente, un par de anticuerpos mostrará el mismo nivel de interferencia independientemente de cuál de los dos sea el anticuerpo bloqueante y cuál sea el anticuerpo sonda. Los anticuerpos que muestran perfiles similares se asignan al mismo epítipo 'bin'.

Utilizando esta metodología, se demostró que los MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.78 y 2.1029 interfieren entre sí en la unión a NOTUM humana, mientras que no interfieren con la unión de otros neutralizantes o no neutralizantes menos potentes.

6.7. Mapeo de Epítomos de Anticuerpos Neutralizantes de NOTUM

En un esfuerzo por mapear los aminoácidos implicados en la unión de los MAb 1.802, 1.815 y 1.846 específicos de NOTUM humana, se produjeron proteínas NOTUM quiméricas humana/de ratón mediante transfección transitoria en HEK293F de construcciones de expresión que codificaban marcos de lectura abiertos de NOTUM con una mezcla de secuencias humanas y de ratón. Se demostró, por transferencia Western con anticuerpo anti-His y por ensayo OPTS, que los medios condicionados de estas transfecciones contenían quimeras NOTUM funcionales.

La Figura 5 muestra representaciones esquemáticas de las proteínas NOTUM quiméricas humana/de ratón utilizadas en este experimento. Las secuencias de esas proteínas se muestran en la Sección 7 (Tabla de Secuencias). Los medios condicionados se utilizaron en formato ELISA para determinar la especificidad del anticuerpo. Basándose en la pérdida de la unión de los MAb específicos humanos a quimeras particulares, se determinó que los MAb 1.802, 1.815 y 1.846 (que son anticuerpos "Bin 1") dependen de los aminoácidos entre Q47 y M177 de NOTUM humana para la unión. Véase la figura 5. Dentro de esta región, NOTUM de ratón y humana difieren en cinco posiciones (R115K, D141S, R150K, R154H y Y171H, basándose en la numeración de secuencias humanas). Se generaron mutantes puntuales de NOTUM humana por transfección transitoria de construcciones que expresaban NOTUM humana con el aminoácido de ratón en cada una de estas cinco posiciones y se demostró que todos los mutantes puntuales eran funcionales en el ensayo OPTS. Mediante ELISA, los MAb 1.802, 1.815 y 1.846 se unieron a todos los mutantes puntuales, excepto a NOTUM D141S humana, lo que indica que este aminoácido es importante para su unión a NOTUM humana. Se generó NOTUM de ratón con la mutación puntual recíproca, NOTUM S148D de ratón por transfección transitoria, se mostró activa en el ensayo OPTS y se demostró que confirma la unión de los MAb específicos para NOTUM humana. Por lo tanto, la especificidad de especie de los MAb 1.802, 1.815 y 1.846 parece depender del aminoácido en la posición 141 en NOTUM humana, que es ácido aspártico en la proteína NOTUM humana nativa.

El enfoque de quimera no se pudo usar para mapear los aminoácidos involucrados en la unión de los MAb 2.78 o 2.1029 porque estos reaccionan de forma cruzada con NOTUM tanto humana como de ratón. Basándose en el hallazgo de que los MAb 1.802, 1.815, 1.846, 2.78 y 2.1029 interfieren entre sí por la unión, se realizó una mutagénesis por barrido de alanina de restos de aminoácidos cargados en la proximidad de D141 humana. Se construyeron cinco mutantes de NOTUM humana, cada uno con un par de restos cargados mutados en alaninas: NOTUM N132A/R133A humana (SEQ ID NO: 96); NOTUM E134A/N135A humana (SEQ ID NO: 97); NOTUM D137A/R139A humana (SEQ ID NO: 98); NOTUM R144A/R145A humana (SEQ ID NO: 99); y NOTUM R150A/D151A humana (SEQ ID NO: 100). Los cinco mutantes humanos se expresaron y secretaron eficazmente después de la transfección transitoria. Cuatro de los cinco mutantes mostraron una actividad significativa en el ensayo OPTS, mientras que el quinto (NOTUM D137A/R139A humana) mostró poca o ninguna actividad. Se detectaron los cinco mutantes en formato ELISA por al menos algunos de los MAb de la Campaña 1 y Campaña 2. El MAb 2.78 no pudo unirse a NOTUM D137A/R139A humana y a NOTUM R144A/R145A humana, mientras que los MAb 1.802, 1.815 y 1.846 únicamente no se unieron a NOTUM R144A/R145A. El MAb 2.1029 fue inmunorreactivo con los cinco mutantes de alanina.

6.8. Afinidades de Unión de Anticuerpos Neutralizantes de NOTUM

Las afinidades de unión de ciertos MAb anti-NOTUM se determinaron utilizando un Biacore 3000. Con el fin de obtener valores de afinidad significativos para la unión a la proteína NOTUM de ratón multimérica, se generaron fragmentos Fab de anticuerpo mediante digestión de IgG completa con la proteasa Ficina, seguida de la eliminación de fragmentos de IgG y Fc no digeridos mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

Los valores de afinidad para la unión de Fab e IgG completa a NOTUM humana correspondieron, y sus valores de afinidad estuvieron en el intervalo nM de un solo dígito al bajo de dos dígitos, tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Afinidad de unión de ciertos anticuerpos producidos contra NOTUM humana y de ratón

Afinidad por NOTUM humana			
Anticuerpo o fragmento	K_D (nM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} ($M^{-1}s^{-1}$)
IgG 1.802	1,42	$2,57 \times 10^5$	$3,65 \times 10^{-4}$
Fab de 1.802	0,91	$8,99 \times 10^5$	$8,20 \times 10^{-4}$
IgG 2.78	17,6	$4,79 \times 10^4$	$8,41 \times 10^{-4}$
Fab de 2.78	15,4	$8,77 \times 10^4$	$1,36 \times 10^{-3}$
IgG 2.1029	5,99	$1,51 \times 10^5$	$9,08 \times 10^{-4}$
Afinidad por NOTUM de ratón			
Anticuerpo o fragmento	K_D (nM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} ($M^{-1}s^{-1}$)
Fab de 1.802	No se observa unión		
Fab de 2.78	4,99	$>3,91 \times 10^4$	$1,95 \times 10^{-4}$

6.9. Administración de los Anticuerpos Neutralizantes de NOTUM a ratones

6.9.1. Administración de Anticuerpos Neutralizantes de NOTUM Semanalmente durante 8 Semanas

Se administraron los anticuerpos neutralizantes de NOTUM 2.1029 o 2.78b, o un anticuerpo control, a ratones híbridos F1 machos de ocho semanas de edad (129 x C57), mediante inyección intraperitoneal a 30 mg/kg una vez por semana durante ocho semanas. Había 12 ratones por grupo. Al final del estudio, se sacrificó a los ratones. La masa ósea y la arquitectura se determinaron mediante microCT después de la necropsia, utilizando un Scanco μ CT40 con un valor umbral de 240, un tiempo de integración de 200 milisegundos y una tensión del tubo de rayos X de 55 keV.

Como se muestra en la Figura 6, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó un 12% ($P < 0,001$) con la administración del anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.1029 y el 16% ($P < 0,001$) con la administración del anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con el anticuerpo control.

6.9.2. Administración del Anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.1029 Semanalmente durante 4 Semanas

Se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.1029 a ratones híbridos F1 machos de ocho semanas de edad (129 x C57) mediante inyección intraperitoneal a 3 mg/kg, 10 mg/kg, o 30 mg/kg una vez por semana durante cuatro semanas. Había 10 ratones por grupo. Al final del estudio, se sacrificó a los ratones. La masa ósea y la arquitectura se determinaron mediante microCT después de la necropsia, utilizando un Scanco μ CT40 con un valor umbral de 240, un tiempo de integración de 200 milisegundos y una tensión del tubo de rayos X de 55 keV.

Como se muestra en la Figura 7, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó un 5% ($P = 0,12$) con la administración de 30 mg/kg de anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.1029, en relación con la administración del anticuerpo control.

6.9.3. Administración del Anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78b Semanalmente durante 4 Semanas

Se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b a ratones híbridos F1 machos de ocho semanas de edad (129 x C57) mediante inyección intraperitoneal a 3 mg/kg, 10 mg/kg, o 30 mg/kg una vez por semana durante cuatro semanas. Había 10 ratones por grupo en el primer experimento. En un segundo experimento, se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b por inyección intraperitoneal a 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, o 3 mg/kg una vez por semana durante cuatro semanas. Había 12 ratones por grupo en el segundo experimento. Al final de cada estudio, se sacrificó a los ratones. La masa ósea y la arquitectura se determinaron mediante microCT después de la necropsia, utilizando un Scanco μ CT40 con un valor umbral de 240, un tiempo de integración de 200 milisegundos y una tensión del tubo de rayos X de 55 keV.

Como se muestra en la figura 8A, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó un 13% ($P < 0,001$), 17% ($P < 0,001$) y 16% ($P < 0,001$) con la administración de 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente, del anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en relación con la administración del anticuerpo control, en el primer experimento.

Tal como se muestra en la Figura 8B, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó un 3% ($P = 0,46$), 7% ($P < 0,001$) y 10% ($P < 0,001$) con la administración de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg y 3 mg/kg, respectivamente, del anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en relación con la administración del anticuerpo control, en el segundo experimento.

6.9.4. Administración del Anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78b Semanalmente durante 4 Semanas con tratamiento previo con Zoledronato

Se administró una dosis única de 50 µg/kg de zoledronato a ratones híbridos F1 macho de 28 semanas de edad (129 x C57) mediante inyección intraperitoneal. Cuatro semanas después de la dosis de zoledronato, se administraron 10 mg/kg de anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b a los ratones por inyección i.p. semanalmente durante 4 semanas. Al final de cada estudio, se sacrificó a los ratones. Había 11 o 12 ratones por grupo. La masa ósea y la arquitectura se determinaron mediante microCT después de la necropsia, utilizando un Scanco µCT40 con un valor umbral de 240, un tiempo de integración de 200 milisegundos y una tensión del tubo de rayos X de 55 keV. Además, los niveles séricos de PINP, que es un marcador de formación ósea, se midieron utilizando un ensayo ELISA disponible comercialmente (Immunodiagnostic Systems, Scottsdale, AZ) el día 7 después de la primera dosis de Mab 2.78b.

Como se muestra en la figura 9A, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó en 10 µm, o 4% ($P = 0,31$), en ratones a los que se administró zoledronato y anticuerpo control, en relación con ratones a los que se administró solución salina y anticuerpo control. El espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó 23 µm, o 9% ($P < 0,001$), en ratones a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b sin tratamiento previo con zoledronato, en relación con los ratones a los que se administró solución salina y el anticuerpo control, y aumentó en 14 µm, o 5% ($P = 0,06$), en ratones a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b con tratamiento previo con zoledronato, en relación con los ratones a los que se administró zoledronato y el anticuerpo control. La Figura 9B muestra que los niveles séricos de PINP disminuyeron en 15 ng/ml, o 50% ($P < 0,001$) en ratones a los que se administró tratamiento con zoledronato y anticuerpo control, en relación con ratones a los que se administró solución salina y anticuerpo control. Los niveles de PINP aumentaron en 14 ng/, o 47% ($P < 0,001$), en ratones a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b sin tratamiento previo con zoledronato, en relación con los ratones a los que se administró solución salina y el anticuerpo control, y aumentó en 12 ng/ml, o 79% ($P < 0,001$), en ratones a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b con tratamiento previo con zoledronato, en relación con los ratones a los que se administró zoledronato y el anticuerpo control.

6.9.5. Administración del Anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78a Semanalmente durante 4 Semanas

Para este experimento, el Mab 2.78 (también conocido como "2.78b"), que es un anticuerpo IgG2b, se cambió de formato como un anticuerpo IgG2a (los anticuerpos IgG2a a menudo tienen semividas más largas que los anticuerpos IgG2b). El Mab 2.78 reformateado se conoce como "2.78a".

Se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78a a ratones híbridos F1 machos de 13 semanas de edad (129 x C57) mediante inyección intraperitoneal a 3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, o 10 mg/kg una vez por semana durante cuatro semanas. Había 10 o 12 ratones por grupo. Al final de cada estudio, se sacrificó a los ratones. La masa ósea y la arquitectura se determinaron mediante microCT después de la necropsia, utilizando un Scanco µCT40 con un valor umbral de 240, un tiempo de integración de 200 milisegundos y una tensión del tubo de rayos X de 55 keV.

Como se muestra en la Figura 10, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó un 3% ($P = 0,57$), 7% ($P = 0,02$), 9% ($P = 0,002$) y 10% ($P < 0,001$) con la administración de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente, de anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78a en ese experimento.

6.9.6. Administración del Anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78a Semanalmente o Quincenalmente durante 12 Semanas

Se administró un anticuerpo de control, 0,3 mg/kg de anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78a ratones híbridos F1 machos de diez semanas de edad (129 x C57) por inyección i.p. semanalmente durante 12 semanas, o 1 mg/kg de anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78a por inyección i.p. cada dos semanas (quincenalmente) durante 12 semanas o 24 semanas. Había doce ratones por grupo de administración. Al final de cada estudio, se sacrificó a los ratones. La masa ósea y la arquitectura se determinaron mediante microCT después de la necropsia, utilizando un Scanco µCT40 con un valor umbral de 240, un tiempo de integración de 200 milisegundos y una tensión del tubo de rayos X de 55 keV.

Como se muestra en la figura 11 A, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó un 6% ($P < 0,001$) y 9% ($P < 0,001$) en ratones a los que se administró 0,3 mg/kg semanalmente y 1 mg/kg quincenalmente, respectivamente, del

anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78a durante 12 Semanas. De manera similar, como se muestra en la Figura 11B, el espesor cortical de la diáfisis del húmero aumentó un 5% ($P < 0,007$) y 7% ($P < 0,001$) en ratones a los que se administró 0,3 mg/kg semanalmente y 1 mg/kg quincenalmente, respectivamente, del anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78a durante 12 Semanas.

Como se muestra en la figura 12A, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó un 7% ($P < 0,002$) y 9% ($P < 0,001$) en ratones a los que se administró 0,3 mg/kg semanalmente y 1 mg/kg quincenalmente, respectivamente, del anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78a durante 24 Semanas. Tal como se muestra en la Figura 12B, el espesor cortical de la diáfisis del húmero aumentó un 3% ($P < 0,09$) y 8% ($P < 0,001$) en ratones a los que se administró 0,3 mg/kg semanalmente y 1 mg/kg quincenalmente, respectivamente, del anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78a durante 24 Semanas. Por último, como se muestra en la Figura 12C, el espesor cortical de la novena costilla aumentó un 7% ($P < 0,02$) y 9% ($P < 0,003$) en ratones a los que se administró 0,3 mg/kg semanalmente y 1 mg/kg quincenalmente, respectivamente, del anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78a durante 24 Semanas.

6.10. Administración de Anticuerpos Neutralizantes de NOTUM a Ratones Ovariectomizados

6.10.1. Ovariectomía

Se ovariectomizaron o sometieron a cirugía simulada ratones hembra C57BL/6J albinos de dieciséis semanas de edad. Los niveles séricos de PINP, que es un marcador de formación ósea y CTX, que es un marcador de resorción ósea, se midieron utilizando un ensayo ELISA disponible comercialmente (Immunodiagnostic Systems, Scottsdale, AZ) en el intervalo después de la ovariectomía y antes de la administración del anticuerpo neutralizante de NOTUM, para confirmar que se estaba produciendo una mayor remodelación ósea después de la ovariectomía.

Después de la cirugía y antes del inicio del tratamiento, los ratones ovariectomizados mostraron una mayor remodelación ósea en comparación con los ratones sometidos a cirugía simulada, tal como se muestra en la Tabla 4. Debido a que el hueso trabecular contiene muchas más células óseas que el hueso cortical, es probable que estos datos reflejen principalmente una mayor remodelación del hueso trabecular.

Tabla 4: Niveles de marcadores óseos después de la cirugía

Marcador	Semanas después de la cirugía	Cirugía simulada (N=10)	Cirugía OVX (N=10)	Estadística
PINP (ng/ml)	1	36,4 ± 0,9	50,6 ± 5,3	$\Delta = 39\%$ $P = 0,02$
CTX (ng/ml)	2	10,5 ± 0,9	14,1 ± 0,9	$\Delta = 33\%$ $P = 0,01$
PINP (ng/ml)	4	41,2 ± 2,3	54,8 ± 2,5	$\Delta = 33\%$ $P = 0,001$

6.10.2. Administración del Anticuerpo Neutralizante de NOTUM 2.78b a ratones Ovariectomizados

Se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b o un anticuerpo control a 10 mg/kg mediante inyección intraperitoneal una vez por semana durante 4 semanas, comenzando 8 semanas después de la cirugía. El estudio incluyó los grupos de tratamiento que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Grupos de tratamiento en el estudio de ovariectomía (OVX)

Numero de ratones	Cirugía	Anticuerpo
13	Sim	Control
13*	Sim	NOTUM
10	OVX	Control
11	OVX	NOTUM

* Originalmente había 14 ratones en este grupo, pero un ratón murió durante el estudio.

Para evaluar la ubicación y el alcance de la formación de hueso nuevo, se administraron etiquetas óseas fluorocromáticas en los días 7, 14 y 21 del tratamiento (es decir, con los tratamientos 2º, 3º y 4º). La calceína, que presenta una fluorescencia verde, se administró el día 7; la alizarina, que presenta una fluorescencia roja, se administró el día 14; y la tetraciclina, que presenta una fluorescencia amarilla, se administró el día 21. Los ratones se

sacrificaron al final del tratamiento de 4 semanas. El peso uterino en la necropsia confirmó que la cirugía de ovariectomía fue exitosa. (No se muestran los datos).

6.10.3. Masa ósea y Arquitectura en Ratones Ovariectomizados Tratados con Anticuerpo Neutralizante de Notum

La masa ósea y la arquitectura se determinaron mediante microCT después de la necropsia, utilizando un Scanco μ CT40 con un valor umbral de 240, un tiempo de integración de 200 milisegundos y una tensión del tubo de rayos X de 55 keV. Se exploraron la diáfisis del fémur, el cuerpo vertebral de la VL5 y el cuello femoral.

Como se muestra en la figura 13A, el espesor cortical de la diáfisis del fémur aumentó en 22 μ m, o un 9%, en ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo control y aumentó en 26 μ m, o un 12%, en los ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo control. Tal como se muestra en la Figura 13B, área de hueso mineralizado de la diáfisis del fémur aumento en 0,1 mm², o un 11%, en ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo control y aumentó en 0,08 mm², o un 10%, en los ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo control.

Como se muestra en la figura 14A, la proporción en el volumen óseo total del cuerpo vertebral de la VL5 (cortical más trabecular) respecto al volumen total aumentó en un 9% en los ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo control, y aumentó un 3% en ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo control. Tal como se muestra en la Figura 14B, la proporción en el cuerpo vertebral de la VL5 de volumen del hueso cortical respecto al volumen total aumentó un 13% en los ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo control, y aumentó un 9% en ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo control. Tal como se muestra en la Figura 14C, la proporción en el cuerpo vertebral de la VL5 de volumen de hueso trabecular respecto al volumen total no se vio afectada significativamente por la administración del anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b en los ratones sometidos cirugía simulada o en los ratones ovariectomizados.

Por último, tal y como se muestra en la Figura 15, la proporción de volumen de hueso del cuello femoral respecto al volumen total aumentó un 4% en los ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones sometidos a cirugía simulada a los que se administró el anticuerpo control, y aumentó un 6% en ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b, en comparación con los ratones ovariectomizados a los que se administró el anticuerpo control:

6.10.4. Histomorfometría Ósea en Ratones Ovariectomizados Tratados con Anticuerpo Neutralizante de Notum

Los ejes del fémur se insertaron en metacrilato de metilo utilizando un protocolo de inserción rápida. Véase Brommage y Vafai, *Calcified Tissue Int'l* 67: 479 (2000). Se prepararon secciones transversales de la diáfisis con un espesor de aproximadamente 80 μ m utilizando una sierra para huesos Leica SP1600. A continuación, se examinaron las secciones con un microscopio fluorescente Olympus BX60. Se determinaron varios parámetros histomorfométricos de los huesos utilizando el software OsteoMeasure™ (OsteoMetrics, Decatur, GA). Tanto los parámetros estáticos (como el área y el grosor del hueso) como los parámetros dinámicos (como la superficie de marcador único (SLS), la tasa de aposición mineral (MAR) y la tasa de formación ósea (BFR)) se midieron con un aumento de 100x.

La Figura 16 muestra el porcentaje de la superficie endocortical de las secciones transversales de la diáfisis del fémur que se marcaron con calceína, que se administró el día 7, con alizarina, que se administró el día 14 y con tetraciclina, que se administró el día 21. La Tabla 6 muestra el análisis estadístico de los datos en la Figura 16. Los ratones a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b mostraron un porcentaje significativamente mayor de marcaje endocortical en los días 7 y 14 en comparación con los ratones a los que se administró el anticuerpo control.

Tabla 6: ANOVA con dos factores del % de superficie de marcador único

<u>ANOVA con dos factores</u>	<u>Día 7</u>	<u>Día 14</u>	<u>Día 21</u>
Efecto de la Ovariectomía	P = 0,16	P = 0,65	P = 0,28
Efectos del Tratamiento	P < 0,001	P < 0,001	P = 0,02
Efectos de la Interacción	P = 0,66	P = 0,74	P = 0,77

La Figura 17 muestra la tasa de aposición mineral (A) y la tasa de formación ósea referente al volumen (B) de los ratones sometidos a cirugía simulada y ovariectomizados a los que se les administró el anticuerpo control o el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b. La tasa de aposición mineral (Figura 17A) se determinó midiendo la distancia entre el marcador de calceína (día 7) y el marcador de alizarina (día 14) y dividiendo por 7 para obtener la "tasa de los días 7 a 14", y midiendo la distancia entre el marcador de alizarina (día 14) y el marcador de tetraciclina (día 21) y dividiendo por 7 para obtener la "tasa de los días 14 a 21". La Tabla 7 muestra el análisis estadístico de los datos en la Figura 17A. Los ratones a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b mostraron una mayor tasa de aposición mineral que los ratones a los que se administró el anticuerpo control durante el período de tiempo de los días 7 a 14.

Tabla 7: ANOVA con dos factores de la Tasa de Aposición Mineral

<u>ANOVA con dos factores</u>	<u>Días 7 a 14</u>	<u>Días 14 a 21</u>
Efecto de la Ovariectomía	P = 0,80	P = 0,70
Efectos del Tratamiento	P < 0,001	P = 0,82
Efectos de la Interacción	P = 0,86	P = 0,02

La tasa de formación ósea referente al volumen (Figura 17B) se determinó mediante cálculos convencionales que implican la multiplicación de la superficie de mineralización endocortical (porcentaje de superficie con doble marcador más la mitad de la superficie con marcador único, derivado de la Figura 16) por la tasa de aposición mineral (véase la Figura 17A). El resultado es la tasa de formación ósea dividida por el volumen óseo, expresada como un porcentaje por 7 días. La Tabla 8 muestra el análisis estadístico de los datos en la Figura 17B. Como es evidente en la Figura 17B, la tasa de formación ósea por volumen de hueso es significativamente mayor en ratones a los que se administró el anticuerpo neutralizante de NOTUM 2.78b que en los ratones a los que se administró el anticuerpo control.

Tabla 8: ANOVA con dos factores de la Tasa de Formación Ósea Referente al Volumen

<u>ANOVA con dos factores</u>	<u>Días 7 a 14</u>	<u>Días 14 a 21</u>
Efecto de la Ovariectomía	P = 0,95	P = 0,80
Efectos del Tratamiento	P < 0,001	P < 0,001
Efectos de la Interacción	P = 0,39	P = 0,30

6.11. Identificación de Especies Adecuadas para la Prueba de Anticuerpos Neutralizantes de NOTUM

Basándose en las alineaciones de secuencias de proteínas multiespecie tomadas del dominio público, se predijo que los MAb 1.802, 1.815 y 1.846 se unirían a NOTUM de cobaya y que, por lo tanto, esta especie podría ser adecuada para estudios preclínicos. Para analizar esta hipótesis, se clonó y expresó NOTUM de cobaya mediante transfección transitoria y se mostró activa en el ensayo OPTS. Se descubrió que los MAb 1.802, 1.815 y 1.846 se unen a NOTUM de cobaya mediante ELISA y se demostró que el MAb 1.802 neutraliza la actividad de NOTUM de cobaya en el ensayo OPTS. El MAb 2.78 se unió a NOTUM de cobaya con menor afinidad que el MAb 1.802, y tuvo una actividad inhibidora correspondientemente menor en el ensayo OPTS. El MAb 2.1029 se unió a NOTUM de cobaya solo débilmente y no lo inhibió significativamente en el ensayo OPTS.

Se clonaron NOTUM de macaco cangrejero y rhesus a partir de preparaciones de ADNc de esas especies. El análisis de las secuencias reveló que el aminoácido en la posición equivalente a NOTUM D141 humana es una asparagina, que es diferente del aminoácido en esa posición en NOTUM tanto de ratón como humana. Las NOTUM de macaco cangrejero y rhesus activas (según se determinó por el ensayo OPTS) se generaron mediante transfección transitoria, y se encontró que el MAb 1.802 no se une ni inhibe ninguna de las proteínas. Se generó un mutante puntual de NOTUM humana, NOTUM D141N humana, mediante transfección transitoria, y se encontró que el MAb 1.802 no se une al mutante puntual de NOTUM humana.

El MAb 2.78 se unió débilmente a NOTUM tanto de macaco cangrejero como de rhesus mediante ELISA, pero no inhibió ninguna de las proteínas significativamente en el ensayo OPTS. Por el contrario, el MAb 2.1029 se unió a NOTUM de mono tanto macaco cangrejero como rhesus mediante ELISA así como a NOTUM humana, y también inhibió ambas proteínas en el ensayo OPTS así como inhibió la NOTUM humana.

6.12. Secuenciación y Humanización de Anticuerpos

Las regiones variables de la cadena pesada y ligera se secuenciaron mediante RT-PCR específica utilizando el ARN total de la línea celular de hibridoma relevante, seguido de la secuenciación del producto de PCR. Se secuenciaron las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de cuatro anticuerpos de la Campaña 1: 1.731, 1.802, 1.815 y 1.846 y de tres anticuerpos de la Campaña 2: 2.1029, 2.55 y 2.78. Las secuencias de la región variable, sin secuencias señal, para cada uno de esos anticuerpos se muestran en la Sección 7 (Tabla de secuencias), a continuación. La Sección 7 también muestra las secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesada y ligera para cada uno de esos anticuerpos. La siguiente tabla muestra las SEQ ID NO correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, y las CDR1, CDR2 y CDR3, para cada uno de esos anticuerpos.

Tabla 9: SEQ ID NO para regiones variables y CDR de cadena pesada y ligera

Anticuerpo de ratón	SEQ ID NO de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO de CDR1, CDR2, CDR3)	SEQ ID NO de la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO de CDR1, CDR2, CDR3)
1.731 *	7(9, 10, 11)	8 (12, 13, 14)
1.802	15 (17, 18, 19)	16 (20,21,22)
1.815	23 (25, 26, 27)	24 (28, 29, 30)
1.846	31 (33, 34, 35)	32 (36, 37, 38)
2.1029	39 (41, 42, 43)	40 (44, 45, 46)
2.55*	47 (49, 50, 51)	48 (52, 53, 54)
2.78	55 (57, 58, 59)	56 (60, 61, 62)
* anticuerpo comparativo		

Se encontró que ciertas CDR de cadena pesada y ligera tienen una alta homología entre dos o más de los anticuerpos secuenciados. Los MAb 1.802 y 1.846 comparten una CDR1 de cadena pesada idéntica (GFTFSDYGMH; SEQ ID NO: 17 y 33), mientras que la CDR1 de la cadena pesada de MAb 1.815 (GFTFSDFGMH; SEQ ID NO: 25) difiere de las de MAb 1.802 y 1.846 en una sola sustitución de aminoácidos conservativa (Fenilalanina (F) en lugar de Tirosina (Y)). La secuencia consenso para la CDR1 de la cadena pesada para esos anticuerpos es, por lo tanto, GFTFSDX1GMH (SEQ ID NO: 90), en donde X₁ es F o Y. La CDR3 de la cadena pesada de los MAb 1.802 y 1.846 difiere en solo una sustitución de aminoácidos conservativa (histidina (H) frente a asparagina (N)). La secuencia consenso para la CDR3 de la cadena pesada para esos anticuerpos es, por lo tanto, KX₂YNGGYFDV (SEQ ID NO: 91), en donde X₂ es H o N. Los MAb 1.802 y 1.846 comparten una CDR2 de cadena ligera idéntica (LASNLES; SEQ ID NO: 21 y 37), mientras que la CDR2 de la cadena ligera de MAb 1.815 (LASDLES; SEQ ID NO: 29) difiere de las de MAb 1.802 y 1.846 por una sola sustitución de aminoácidos conservativa (ácido aspártico (D) en lugar de asparagina (N)). La secuencia consenso para la CDR2 de la cadena ligera para esos anticuerpos es, por lo tanto, LASX₆LES (SEQ ID NO: 93), donde X₆ es D o N. Finalmente, una secuencia consenso para la CDR1 de la cadena ligera para los tres anticuerpos de la Campaña 1, 1.802, 1.846 y 1.815, es RASKX₃VSX₄SGYSYX₅H (SEQ ID NO: 92), en donde X₃ es I o S, X₄ es T o E y X₅ es M o L.

La búsqueda de BLAST se realizó en bases de datos públicas para identificar las secuencias de la región variable de la línea germinal humana con la mayor similitud con cada una de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de ratón. Utilizando la definición AbM, las CDR de las regiones variables de ratón se injertaron luego in silico en

estas secuencias variables de la línea germinal humana en lugar de las CDR de la línea germinal humana. Las regiones variables humanizadas resultantes para cinco de los anticuerpos de ratón (2.78, 2.1029, 1.802, 1.815 y 1.846) se sintetizaron con una secuencia líder 5' que codifica un péptido señal en el marco y se clonaron cadena arriba de la secuencia que codifica las regiones constantes de IgG2 humana en el caso de las secuencias variables de cadena pesada o región constante kappa humana en el caso de las secuencias variables de cadena ligera. Las secuencias para cada una de las regiones variables humanizadas se muestran en la Sección 7 (Tabla de Secuencias), a continuación, junto con las secuencias para las cadenas pesada y ligera humanizadas de longitud completa (sin el péptido señal).

Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras humanizadas de longitud completa se subclonaron en vectores de expresión de mamíferos y las correspondientes construcciones de cadenas pesadas y ligeras se cotransfectaron en células CHO-S. Los medios condicionados resultantes se comprobaron mediante transferencia Western con un anticuerpo secundario antihumano para confirmar la expresión y la secreción del anticuerpo humanizado intacto. Los medios condicionados se probaron a continuación, en formato ELISA para determinar si los anticuerpos humanizados conservaban la capacidad de unirse a la proteína NOTUM humana. Los MAb humanizados 1.802, 1.815, 1.846 y 2.1029 se unieron a NOTUM humana, mientras que el MAb humanizado 2.78 mostró poca o ninguna unión con NOTUM tanto humana como de ratón.

7. Tabla de Secuencias

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	NOTUM humana	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRMLSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFDEAQLTVDNVH LTGQPQVEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSPCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
2	NOTUM de ratón	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QQPPQPPPPF PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFIPIYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
3	NOTUM S232A humana	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRMLSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SAAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFDEAQLTVDNVH LTGQPQVEGL RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSPCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
4	NOTUM S239A mutante de ratón	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QQPPQPPPPF PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFIPIYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFFGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPWP HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
5	NOTUM de cobaya	MGRGVRVLF LGLLHWAGG EGRKTWRRRG QQPAPAPLPP QRTEAAPGTG QPVESFPLDF TAVEGNMDSF MAQVKSLAQS LYPCSAQQLN EDLRLHLLLN TSVTCNDGSP AGYYLKESKG SRRWLLFLEG GWYCFRENC DSRYDTMRRL MSSKDWPQTR TGTGILSSQP EENPYWNNAN MVFIPYCSD VWSGASSKSE KNEYVFMGAL IIREVVQELL GRGLSGAKVL LLAGSSAGGT GVLLNVDRVA EQLEQLGYPA IQVRGLADSG WFLDNKQYRR TDCVDVTICA PTEAIRRGIR YWNMGVPERC RSQFKEGEEW NCFLGYKVYP TLRCPVFVVO WLFDEAQLTA DNAHLTGQPV QEGQWLYIQN LGHELRLTLK DVPASFAPAC ASSHEIIRSH WTDVQVKGTS LPRALHCWDR SLHDSHKASK TPLKGCPIHL VDSCPWPHCN PSCPTIRDQF TGQEMNVAQF LMHMGFDVQT VAQQQGLEPS KLLGMLSSGS
	NOTUM de macaco cangrejero	MGRGVRVLLL LGLLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY NTMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWNNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE ELGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKIYPTLRC PVFVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQESQ RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKTSKTPLK GCPVHLVDSC PWPCHNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAAQ QGPEPSKLLG LPSDGS
6	NOTUN de macaco rhesus	MGRGVRVLLL LGLLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY NTMRRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWNNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE ELGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKIYPTLRC PVFVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQESQ RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKNSKTPLK GCPVHLVDSC PWPCHNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAAQ QGPEPSKLLG LPSDGS
7	Región variable de la cadena pesada del Mab 1.731	EVQLQQSGPE LVKPGASVKV SCKASGYPFT DYFIHWKQT HGKSLEWIGY FFPKNGANGY NQKFEGKVTI TVDKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARRY GNYYSMDYWG QGTSVTVSSA KTHPP
8	Región variable de la cadena ligera del Mab 1.731	SFVMTQTPKF LLVSAGDRVT ITCKASQSVG DDVAWYQKP QGSPTLLIYR VSNRYTGVPD RFTGSGYGTD FTFTINTVQA EDLAVYFCQQ DYSSPYTFGG GTQLEVVRAD AAP
9	CDR1 de la cadena pesada del Mab 1.731	GYPFTDYFIH
10	CDR2 de la cadena pesada del Mab 1.731	YFFPKNGANG
11	CDR3 de la cadena pesada del Mab 1.731	RYGNYYSMDY
12	CDR1 de la cadena ligera del Mab 1.731	KASQSVGDDVA
13	CDR2 de la cadena ligera del Mab 1.731	RVSNNRYT
14	CDR3 de la cadena ligera del Mab 1.731	QQDYSSPYT
15	Región variable de la cadena pesada del Mab 1.802	EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGMHWFRQA PEKGLEWVAY ISSGSRTVYY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLS LQMTSLRSED TAMYYCARKH YNGGYFDVWG TGTTVTVSSA KTHPP
16	Región variable de la cadena ligera del Mab 1.802	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKIVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEBDAATY YCQHSRELPP TFGSGTKLEI KRADAAP

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
17	CDR1 de la cadena pesada del Mab 1.802	GFTFSDYGMH
18	CDR2 de la cadena pesada del Mab 1.802	YISSGSRTVY
19	CDR3 de la cadena pesada del Mab 1.802	KHYNGGYFDV
20	CDR1 de la cadena ligera del Mab 1.802	RASKIVSTSGYSYM
21	CDR2 de la cadena ligera del Mab 1.802	LASNLES
22	CDR3 de la cadena ligera del Mab 1.802	QHSRELPPT
23	Región variable de la cadena pesada del Mab 1.815	DVQLLESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS DFGMHWRQA PEKGLEWVAY SSSGGTTVYY ADTVKGRLL SRDNSKNTLF LEMTSLRSED TAMYICARAS YDGGYFDCWG QGTSLTVSSA KTHPP
24	Región variable de la cadena ligera del Mab 1.815	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYIHVY QOKPGQPPKL LIYLASDLES GVPARFSGSG SGAFTLNLIH PVEEEDAATY YCHHSRELPF TFGSGTKLEI KRADAAP
25	CDR1 de la cadena pesada del Mab 1.815	GFTFSDFGMH
26	CDR2 de la cadena pesada del Mab 1.815	YSSSGGTTVY
27	CDR3 de la cadena pesada del Mab 1.815	ASYDGGYFDC
28	CDR1 de la cadena ligera del Mab 1.815	RASKSVSTSGYSYIH
29	CDR2 de la cadena ligera del Mab 1.815	LASDLES
30	CDR3 de la cadena ligera del Mab 1.815	HHSRELPFT
31	Región variable de la cadena pesada del Mab 1.846	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DYGMHWLRQA PEKGLEWVAY ISSGSTTSLY ANTMKGRFTI SRDNAKKTLS LQMTSLRSED TAIYYCARKN YNGGYFDVWG TGTTVTVSSA KTHPP
32	Región variable de la cadena ligera del Mab 1.846	DIVLTQSPAS LVVSLGQRAT ISCRASKSVS ESGYSYMHVY QOKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEGDATTY YCQHSRVLPF TFGSGTKLEI KRADAAP
33	CDR1 de la cadena pesada del Mab 1.846	GFTFSDYGMH
34	CDR2 de la cadena pesada del Mab 1.846	YISSGSTTSL
35	CDR3 de la cadena pesada del Mab 1.846	KNYNGGYFDV
36	CDR1 de la cadena ligera del Mab 1.846	RASKSVSESGYSYM
37	CDR2 de la cadena ligera del Mab 1.846	LASNLES
38	CDR3 de la cadena ligera del Mab 1.846	QHSRVLPPT

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
39	Región variable de la cadena pesada del Mab 2.1029	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SYGVHWVRQP PGKGLEWLG IWAGGSTNYN SALMSRLSIS KDNSKQVFL KMNSLQTTDDT AIYFCARDGD YGTIYAMDYW QGTSVTVSS AKTTAPS
40	Región variable de la cadena ligera del Mab 2.1029	DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKQ DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFTGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GKTLPRTFGG GTMLEIKRAD AAP
41	CDR1 de la cadena pesada del Mab 2.1029	GFSLTSYGVH
42	CDR2 de la cadena pesada del Mab 2.1029	VIWAGGSTN
43	CDR3 de la cadena pesada del Mab 2.1029	DGDYGTIYAMDY
44	CDR1 de la cadena ligera del Mab 2.1029	RASQDISNYLN
45	CDR2 de la cadena ligera del Mab 2.1029	YTSRLHS
46	CDR3 de la cadena ligera del Mab 2.1029	QQGKTLPRT
47	Región variable de la cadena pesada del Mab 2.55	EVQLQQSGTV LARPGALVKM SCKASGYTFT SYWMHWVKQR PGQGLEWIGA IYPGKSDTRY NQKFQDKAKL TAVTSTSTAY MDLSSLTDED SAVYYCSRRY GNFYAMDYWG QGTSVTVSSA KTTAPS
48	Región variable de la cadena ligera del Mab 2.55	SIVMTQTPKF LLVSAGDRVT MTCKASQSVS NDVAWYQQKQ QGSPPELLIYY ASDRYTGVPD RFTGSGYGTG FTLTISTVQA EDLAVYPCQQ DYSSPYTFGG GTKLETKRAD AAP
49	CDR1 de la cadena pesada del Mab 2.55	GYTFTSYWMH
50	CDR2 de la cadena pesada del Mab 2.55	AIYPGKSDTR
51	CDR3 de la cadena pesada del Mab 2.55	AIYPGKSDTR
52	CDR1 de la cadena ligera del Mab 2.55	KASQSVSNDVA
53	CDR2 de la cadena ligera del Mab 2.55	YASDRYT
54	CDR3 de la cadena ligera del Mab 2.55	QQDYSSPYT
55	Región variable de la cadena pesada del Mab 2.78	DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWRQA PEKGLEWVAY ITSGSGAIYY ADTVRGRFTI SRDTPKNTLF LQMTSLRSED TAMYYCARSA DGLDYWGQGT SVTVSSAKTT PPS
56	Región variable de la cadena ligera del Mab 2.78	DIQMTQSPAS LYVSGETVT ITCRASENIY SNLAWYQQKQ GKSPQLLVYG ATNLADGVPS RFTGSGSGTQ YSLKINSLKS EDFGSYYCQH FWGTPFTFGS GTKLEIKRAD AAP
57	CDR1 de la cadena pesada del Mab 2.78	GFTFSSFGMH
58	CDR2 de la cadena pesada del Mab 2.78	YITSGSGAIY

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
59	CDR3 de la cadena pesada del Mab 2.78	SADGLDY
60	CDR1 de la cadena ligera del Mab 2.78	RASENIYSNLA
61	CDR2 de la cadena ligera del Mab 2.78	GATNLAD
62	CDR3 de la cadena ligera del Mab 2.78	QHFWGTPFT
63	Región variable de la cadena pesada del Ab 2.78 humanizado (HumAb)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWRQA PGKGLEWVS ITSGSGAIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSA DGLDYWGQGT TVTVSS
64	Cadena pesada de HumAb 2.78	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWRQA PGKGLEWVS ITSGSGAIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARSA DGLDYWGQGT TVTVSSDVWG QGTTTVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTISW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSSTVTV TSSNFGTQTY TCNVDPKPSN TKVDKTVRK CCVECPPEFA PPVAGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGM EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV VSFLTVVHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPMQLDSDG SFFLYSKLTV DKSRRWQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL LSPGK
65	Región variable de la cadena ligera del HumAb 2.78	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SNLAWYQQKP GKAPKLLIYG ATNLADGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH FWGTPFTFGQ GTKVEI
66	Cadena ligera del HumAb 2.78	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SNLAWYQQKP GKAPKLLIYG ATNLADGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH FWGTPFTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
67	Región variable de la cadena pesada del HumAb 2.1029	QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGFSLT SYGVHWIRQP PGKGLEWIGV IWAGGSTNIN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGD YGTIYAMDYWG QGTLTVTVSS
68	Cadena pesada de HumAb 2.1029	QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGFSLT SYGVHWIRQP PGKGLEWIGV IWAGGSTNIN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGD YGTIYAMDYWG QGTLTVTVSS DVWGQGTITV VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLS VTVTSSNFG TQTYTCNVDP KPSNTKVDKT VERKCCVECP PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMIKRTPE VTCVVDVSH EDPEVQFNWY VDGMEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVSLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSV MEALHNHYTQ KSLSLSPGK
69	Región variable de la cadena ligera del HumAb 2.1029	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQK GKTLPRTFGG GTKVEI
70	Cadena ligera del HumAb 2.1029	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSRLHSGVPS RFGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQK GKTLPRTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
71	Región variable de la cadena pesada del HumAb 1.802	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSRTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKH YNGGYFDVWG QGTLVTVSS
72	Cadena pesada de HumAb 1.802	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSRTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKH YNGGYFDVWG QGTLVTVSSD VWGQGTTTVV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDPK PSNTKVDKTV ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
73	Región variable de la cadena ligera del HumAb 1.802	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRELPP TFGQGTKLEI
74	Cadena ligera del HumAb 1.802	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKIVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRELPP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCCL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
75	Región variable de la cadena pesada del HumAb 1.815	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFGMHWRQA PGKGLEWVSY SSSGGTTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS YDGGYFDCWG QGTTVTVSS
76	Cadena pesada de HumAb 1.815	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFGMHWRQA PGKGLEWVSY SSSGGTTVYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS YDGGYFDCWG QGTTVTVSSD VWGQGTTTVV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDPK PSNTKVDKTV ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
77	Región variable de la cadena ligera del HumAb 1.815	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS TSGYSYIHVY QQKPGQPPKL LIYLASDLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHSRELPP TFGQGTKLEI
78	Cadena ligera del HumAb 1.815	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS TSGYSYIHVY QQKPGQPPKL LIYLASDLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHSRELPP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCCL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
79	Región variable de la cadena pesada del HumAb 1.846	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSTTLYS ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKN YNGGYFDVWG QGTLVTVSS
80	Cadena pesada de HumAb 1.846	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYGMHWVRQA PGKGLEWVSY ISSGSTTLYS ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARKN YNGGYFDVWG QGTLVTVSSD VWGQGTTTVV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVTSSNFGT QTYTCNVDPK PSNTKVDKTV ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGMVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
81	Región variable de la cadena ligera del HumAb 1.846	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS ESGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRVLP TFGQGTKLEI
82	Cadena ligera del HumAb 1.846	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASKSVS ESGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQHSRVLP TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREKAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
90	CDR1 consenso de la cadena pesada de la Campaña 1	GFTFSDX ₁ GMH
91	CDR3 consenso de la cadena pesada de la Campaña 1	KX ₂ YNGGYFDV
92	CDR1 consenso de la cadena ligera de la Campaña 1	RASKX ₃ VSX ₄ SGYSYX ₅ H
93	CDR2 consenso de la cadena ligera de la Campaña 1	LASX ₆ LES
83	NOTUM quimérica humana-de ratón	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRRSDCI DTINCAPTDA IRRGIRYWSG MVPERCQRQF KEGEENWNCFF GYKVYPTLRC PVFVQWLFDEAQLTVDNVH LTGQPVQEGQ WLYIQNLGRE LRGTLDKDVQA SFAPACLSHE IIRSYWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSFHD SHKASKTPMK GCPFHLDVSC PWPHCNPSCP TIRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ QGMEPSKLLG MLSNGN
84	NOTUM quimérica de ratón-humana	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QQPPQPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVEFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKS LQAQSLYPCSAQ QLNEEDLRHL LLNNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSTRYST RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFIQYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLLIQEVVR ELLGKGLSGA KVLVLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRHTDCVDTI TCAPTEAIRR GIRYWNGVVP ERCRRQFQEG EEWNCFQGYK VYPTLRCVPF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGRLRY IQNLGRELRLH TLKDVPAFSA PACLSHEIII RSHWTDVQVK GTSPLRALHC WDRSLHDSHK ASKTPLKGCP VHLVDSCPWP HCNPSCPTVR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD MQTVAQPGQL EPSELLGMLS NGS
85	NOTUM quimérica humana-de ratón-humana	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASPKSDKNEY AFMGSLIIQE VVRELLGKGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAELLE ELGYPYQVR GLADSGWFLD NKQYRRSDCI DTINCAPTDA IRRGIRYWSG MVPERCQRQF KEGEENWNCFF GYKVYPTLRC PVFVQWLFDEAQLTVDNVH LTGQPVQEGQ RLYIQNLGRE LRHTLDKDVPA SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDVQTVAQQ QGLEPSELLG MLSNGS

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
86	NOTUM quimérica de ratón- humana- de ratón	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QQPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYSTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFIPIYC SSDVWSGASS KSEKNEYAFM GALIIQEVVR ELLGRGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAEQLEKLG YPAIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRHTDCVDTI TCAPTEAIRR GIRYWNGVVP ERCRRQFQEG EEWNCFEGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPPW HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN
87	NOTUM humana (Δ 1-46); Péptido señal CD33 en cursiva	MPLLLLLPLL WAGALAQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFDEAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVP SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
88	NOTUM N96D humana	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLDTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFDEAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVP SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
89	NOTUM Q47-M177 humana	QPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANM
94	NOTUM D141S humana	MGRGVRVLLL LSLHCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLDTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRLMSSR DWPRTRTGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFDEAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVP SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
95	NOTUM S148D de ratón	MGGEVRVLLL LGLLHWVGGS EGRKTWRRRG QQPPQPPPPP PLPQRAEVEP GAGQPVESFP LDFTAVEGNM DSFMAQVKSL AQSLYPCSAQ QLNEDLRLHL LLNTSVTCND GSPAGYYLKE SKGSRRWLLF LEGGWYCFNR ENCDSRYDTM RRLMSSKDWP HTRTGTGILS SQPEENPHWW NANMVFIPIYC SSDVWSGASP KSDKNEYAFM GSLIIQEVVR ELLGKGLSGA KVLLLAGSSA GGTGVLLNVD RVAELLEELG YPSIQVRGLA DSGWFLDNKQ YRRSDCIDTI NCAPTDAIRR GIRYWSGMVP ERCQRQFKEG EEWNCFEGYK VYPTLRCPVF VVQWLFDEAQ LTVDNVHLTG QPVQEGQWLY IQNLGRELRG TLKDVQASFA PACLSHEIII RSYWTDVQVK GTSLPRALHC WDRSFHDSHK ASKTPMKGCP FHLVDSCPPW HCNPSCPTIR DQFTGQEMNV AQFLMHMGFD VQTVAQQQGM EPSKLLGMLS NGN

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
96	NOTUM N132A/R133A humana	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FAAENCDSRY DTMRRMLMSSR DWPRTTRGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
97	NOTUM E134A/N135A humana	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRAACDSRY DTMRRMLMSSR DWPRTTRGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
98	NOTUM D137A/R139A humana	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCASAY DTMRRMLMSSR DWPRTTRGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
99	NOTUM R144A/R145A humana	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMAALMSSR DWPRTTRGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
100	NOTUM R150A/D151A humana	MGRGVRVLLL LSLHLCAGGS EGRKTWRRRG QQPPPPPRTE AAPAAGQPVE SFPLDFTAVE GNMDSFMAQV KSLAQSLYPC SAQQLNEDLR LHLLLNNTSVT CNDGSPAGYY LKESRGSRRW LLFLEGGWYC FNRENCDSRY DTMRRMLMSSA AWPRTTRGTG ILSSQPEENP YWWNANMVFI PYCSDVWSG ASSKSEKNEY AFMGALIIQE VVRELLGRGL SGAKVLLLAG SSAGGTGVLL NVDRVAEQLE KLGYPAIQVR GLADSGWFLD NKQYRHTDCV DTITCAPTEA IRRGIRYWNG VVPERCRRQF QEGEEWNCFF GYKVYPTLRC PVFVVQWLFD EAQLTVDNVH LTGQPVQEGE RLYIQNLGRE LRHTLKDVPF SFAPACLSHE IIRSHWTDV QVKGTSLPRA LHCWDRSLHD SHKASKTPLK GCPVHLVDSC PWPHCNPSCP TVRDQFTGQE MNVAQFLMHM GFDMQTVAQP QGLEPSELLG MLSNGS
101	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 1.802	ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCTT GTCCTTATTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTA TGAAGCCTG GAGGGTCCCT GAAACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTCAC TTTCAGTGAC TATGGAATGC ACTGGTTTCG TCAGGCTCCA GAGAAGGGGC TGGAGTGGGT TGCATATATT AGTAGTGGCA GTAGAACCCT CTACTATGCA GACACAGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTCCCTG CAAATGACCA GTCTGAGGTC TGAGGACACG GCCATTGATT ACTGTCCGAG GAAACATTAC AACGGTGGAT ACTTCGATGT CTGGGGCACA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGCCAAA ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC CCTGGATCTG CTGCCCCAAC TAACTCCATG GTGACCCTGG GATGTC

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
102	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena la ligera de 1.802	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTTCC AGGTTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGCTG TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAATTGTC AGTACATCTG GCTATAGTTA TATGCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCGCCCAA CTCCTCATCT ATCTTGATC CAACCTAGAA TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGAGGA TGCTGCAACC TATTACTGTC AGCACAGTAG GGAGCTTCCT CCCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GT
103	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 1.815	TCTGACAGAG GAGCCAAGCC CTGGATTCCC AGGTCCTCAC ATTCAGTGAT CAGCACTGAA CACAGACCAC TCACCATGGA CTCCAGGCTC AATTTAGTTT TCCTTGTCCT TATTTTAAAA GGTGTCCAGT GTGATGTGCA ACTGCTGGAA TCTGGGGGAG GCTTAGTGCA GCCTGGAGGG TCCCGAAAAC TCTCCTGTGC AGCCTCTGGA TTCACCTTCA GTGACTTTGG AATGCACTGG GTTCGTCAGG CTCCAGAGAA GGGGCTGGAG TGGGTGCGAT ACAGTAGTAG TGGCGTACT ACCGTCTACT ATGCAGACAC GGTGAAGGGC CGACTCACCC TCTCCAGAGA CAATTCCAAG AACACCTGT TCCTGGAAAT GACCAGTCTA AGGTCTGAGG ACACGGCCAT GTATTACTGT GCAAGAGCGT CCTATGATGG AGGGTACTTT GACTGCTGGG GCCAAGGCAC CTCTCTCACA GTCTCCTCAG CCAAAACGAC ACCCCATCT GTCTATCCAC TGGCCCCTGG ATCTGCTGCC CAAACTAACT CCATGGTGAC CCTGGGATGC
104	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 1.815	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTTCC AGGTTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGCTG TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAAGTGTC AGTACATCTG GCTATAGTTA TATCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCACCCAAA CTCCTCATCT ATCTTGATC CGACCTAGAA TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGTCTGGGG CAGCCTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGAGGA TGCTGCAACC TATTACTGTC ACCACAGTAG GGAGCTTCCA TTCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGCCTCAGT CGTGTGC
105	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 1.846	AGAGGAGCCA AACCTGGAT TCCCAGGTCC TCACATTAG TGATCAGCAC TGAACACAGA CCACTCACCA TGGACTCCAG GCTCAATTTA GTTTTCCTTG TCCTTATTTT AAAAGGTGTC CAGTGTGAGG TGCACTGGT GGAGTCTGGG GGAGACTTAG TGAAGCCTGG AGGGTCCCTG AAACCTCTCT GTGCAGCCTC TGGATTCACT TTCAGTGAAT ATGGAATGCA CTGGCTTCGT CAGGCTCCAG AGAAGGGGCT GGAGTGGGTT GCATATATTA GTAGTGGCAG TACTACCCTC TCCTATGCAA ACACAATGAA GGGCCGATTC ACCATCTCCA GAGACAATGC CAAGAAAACC CTGTCCCTGC AAATGACCAG TCTGAGGTCT GAGGACACGG CCATTATTA CTGTGCGCGG AAAAATTACA ACGGTGGTTA CTTCGATGTC TGGGGCACAG GGACCACGGT CACCGTCTCC TCAGCCAAA CAACACCCCC ATCAGTCTAT CCACTGGCCC CTGGGTGTGG AGATACAACT GGTTCCTCTG TGACTCTGGG ATGCCTGGTC AAGGG
106	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena la ligera de 1.846	ATCCTCTCTT CCAGCTCTCA GAGATGGAGA CAGACACACT CCTGTTATGG GTACTGCTGC TCTGGGTTCC AGGTTCCACT GGTGACATTG TGCTGACACA GTCTCCTGCT TCCTTAGTTG TATCTCTGGG GCAGAGGGCC ACCATCTCAT GCAGGGCCAG CAAAAGTGTC AGTGAATCTG GCTATAGTTA TATGCACTGG TACCAACAGA AACCAGGACA GCCACCCAAA CTCCTCATCT ATCTTGATC CAACCTAGAG TCTGGGGTCC CTGCCAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CAGACTTCAC CCTCAACATC CATCCTGTGG AGGAGGGGGA TGCTACAACC TATTACTGTC AGCACAGTAG GGTCTTCCT CCCACGTTCC GCTCGGGGAC AAAGTTGGAA ATAAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGC

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
107	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 2.78	GACAGAGGAG CCAAGCCCTG GATTCCCAGG TCCTCACATT CAGTGATCAG CACTGAACAC AGACCACTCA CCATGGACTC CAGGCTCAAT TTAGTTTTC TTGTCTTAT TTTAAAAGGT GTCCAGTGTG ATGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCT TAGTGACGCC TGGAGGGTCC CGGAACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATT ACTTTCAGTA GCTTTGGCAT GCACTGGGTT CGTCAGGCTC CAGAGAAGGG ACTGGAGTGG GTCGCATACA TTACTAGTGG CAGTGGTGCC ATCTACTATG CAGACACAGT GAGGGGCCGA TTCACCATCT CCAGAGACAC TCCCAAGAAC ACCCTGTTCC TGCAGATGAC CAGTCTAAGG TCTGAGGACA CGGCCATGTA TTACTGTGCA AGATCGGCTG ATGGTTTGGA CTACTGGGGT CAAGGAACCT CAGTCACCGT CTCCTCAGCC AAAACAACAC CCCCATCAGT CTATCCACTG GCCCTGGGT GTGGAGATAC AACTG
108	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 2.78	CAGCCTCACA CTGATCACAC ACAGACATGA GTGTGGCCAC TCAGGTCCTG GGGTGCTGC TGCTGTGGCT TACAGATGCC AGATGTGACA TCCAGATGAC TCAGTCTCCA GCCTCCCTAT ATGTATCTGT GGGAGAACT GTCAACATTA CATGTGAGC AAGTGAGAAT ATTTACAGTA ATTTAGCATG GTATCAGCAG AAACAGGGAA AATCTCCTCA GCTCCTGGTC TATGGTGCAA CAACTTAGC AGATGGTGTG CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGATCAGGC ACACAGTATT CCCTCAAGAT CAACAGCCTG AAGTCTGAAG ATTTTGGGAG TTATTACTGT CAACATTTTT GGGGTACTCC ATTCACGTTT GGCTCGGGGA CAAAGTTGGA AATAAACGG GCTGATGCTG CACCAACTGT ATCCATCTTC CCACCATCCA GTGAGCAGTT AACATCTGGA GGTGCCTCAG TCGTGTGC
109	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de 2.1029	ATCTCTCAC TAGAGCCCC ATCAGAGCAT GGCTGTCTCT GTGCTGTTC TCTGCCTGGT TGCAATTTCCA AGCTGTGTCC TGTCCCAGGT GCAGCTGAAG GAGTCAGGAC CTGGCCTGGT GGCGCCCTCA CAGAGCCTGT CCATCACTTG CACTGTCTCT GGGTTTTCAT TAACCAGCTA TGGTGACAC TGGGTTCGCC AGCCTCCAGG AAAGGGTCTG GAGTGGCTGG GAGTAATATG GGCTGGTGGA AGCACAATT ATAATTCGGC TCTCATGTCC AGACTGAGCA TCAGCAAAGA CAACTCCAAG AGCCAAGTTT TCTTAAAAAT GAACAGTCTG CAACTGATG ACACAGCCAT CTACTTCTGT GCCAGAGATG GCGACTACGG TACTATCTAC GCTATGGACT ACTGGGGTCA AGGAACCTCA GTCACCGTCT CCTCAGCCAA AACAAACAGC CCATCGGTCT ATCCACTGGC CCCTGTGTGT GGAGATACAA CTGGCTCTC GGTGACTCTA GGATGCCTGG TCAAGG
110	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de 2.1029	ATTGAAGTCA AGACTCAGCC TGGACATGAT GTCCTCTGCT CAGTTCCTTG GTCTCCTGTT GCTCTGTTT CAAGGTACCA GATGTGATAT CCAGATGACA CAGACTACAT CCTCCCTGTC TGCTCTCTG GGAGACAGAG TCACCATCAG TTGCAGGGCA AGTCAGGACA TTAGCAATTA TTTAACTGG TATCAGCAGA AACCAGATGG AACTGTTAAA CTCCTGATCT ACTACACATC AAGATTACAC TCAGGAGTCC CATCAAGGTT CACTGGCAGT GGGTCTGGAA CAGATTATTC TCTCACCATT AGCAACCTGG AGCAAGAAGA TATTGCCACT TACTTTTGCC AACAGGGTAA AACGCTTCCT CGGACGTTTG GTGGAGGCAC CATGCTGGAA ATCAAACGGG CTGATGCTGC ACCAACTGTA TCCATCTTCC CACCATCCAG TGAGCAGTTA ACATCTGGAG GTGCCTCAGT CGTGTGC
111	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de Ab 2.78 humanizado (HumAb)	gaggtgcagc tgggtggagag cggcgggcggc ctgggtgcagc ccggcgggcag cctgagactg agctgcggcg ccagcggtt cacttcagc agcttcggca tgactgggt gagacaggcc cccggcaagg gctggagtg ggtgaggtac atcaccagcg gcagcgggcg catctactac gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgctgtg actactgcg cagaagcgcc gacggcctgg actactgggg ccagggcacc accgtgaccg tgagcagc

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
112	secuencia de polinucleótidos de la cadena pesada de HumAb 2.78	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTGT CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCTTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGGCGCCGCA GCGGCTTCAC CTTACAGAGC TTCCGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC ACCAGCGGCA GCGGCGCCAT CTACTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AAGCGCCGAC GGCCTGGACT ACTGGGGCCA GGGCACCACC GTGACCGTGA GCAGCGATGT GTGGGGCCAG GGCACCACCG TGACCGTGAG CAGCGCGTCG ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG CCCTGCTCCA GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCGCGG CGTGACACAC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGACC TCCAGCAACT TCGGCACCCA GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA AGACAGTTGA GCGCAAATGT TGTGTGAGT GCCCACCCTG CCCAGCACCA CCTGTGGCAG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCCAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCATGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT CCGTGTGGTC AGCGTCTCTA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAAGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCTT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACAC CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGA
113	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de HumAb 2.78	gacatccaga tgacccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgaac atcacctgca gagccagcga gaacatctac agcaacctgg cctggtacca gcagaagccc ggcaaggccc ccaagctgct gatctacggc gccaccaacc tggccgacgg cgtgcccagc agattcagcg gcagcgccag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc gaggacttcg ccacctacta ctgccagcac ttctggggca ccccttccac cttcggccag ggcaccaagg tggagate
114	secuencia de polinucleótidos de la cadena ligera de HumAb 2.78	ATGAAATCC TGATCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCCAGATGA CCCAGAGCCC CAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGCGACAG AGTGACCATC ACCTGCAGAG CCAGCGAGAA CATCTACAGC AACCTGGCCT GGTACCAGCA GAAGCCCGGC AAGGCCCCCA AGCTGCTGAT CTACGGCGCC ACCAACCCTGG CCGACGGCGT GCCCAGCAGA TTCAGCGGCA GCGGCAGCGG CACCGACTTC ACCCTGACCA TCAGCAGCCT GCAGCCCGAG GACTTCGCCA CTTACTACTG CCAGCACTTC TGGGGCACCC CCTTCACCTT CGGCCAGGGC ACCAAGGTGG AGATCAAACG TACGGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCCTC GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCAGGAG AGTGTACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCAACCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGT GA
115	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de HumAb 2.1029	caggtgcagc tgcaggagag cggccccggc ctggtgaagc ccagcgagac cctgagcctg acctgcaccg tgagcggctt cagcctgacc agctacggcg tgactggat cagacagccc cccggcaagg gcctggagtg gatcggcggtg atctgggccc gggcgagcac caactacaac cccagcctga agagcagagt gaccatcagc gtggacacca gcaagaacca gttcagcctg aagctgagca gcgtgaccgc cggcgacacc gccgtgtact actgcgccag agacggcgac tacggcacca tctacgccat ggactactgg ggccagggca ccctgggtgac cgtgagcagc

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
116	secuencia de polinucleótidos de la cadena pesada de HumAb 2.1029	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTGTG CACTGCAGGC TCAAGCGCAG GTGCAGCTGC AGGAGAGCGG CCCCAGCCTG GTGAAGCCCA GCGAGACCCCT GAGCCTGACC TGCACCGTGA GCGGCTTCAG CCTGACCAGC TACGGCGTGC ACTGGATCAG ACAGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGAT CGGCGTGATC TGGGCCGCGG GCAGCACCAA CTACAACCCC AGCCTGAAGA GCAGAGTGAC CATCAGCGTG GACACCAGCA AGAACCCAGT CAGCCTGAAG CTGAGCAGCG TGACCGCCGC CGACACCGCC GTGTACTACT GCGCCAGAGA CGGCGACTAC GGCACCATCT ACGCCATGGA CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT GAGCAGCGAT GTGTGGGGCC AGGGCACCAC CGTGACCGTG AGCAGCGCGT CGACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCTGCTC CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCTGTGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCGTGACACA CCTTCCCGGC TGTCTTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGA CCTCCAGCAA CTTCCGCCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTGCA GTGCCACCG TGCCACAGC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCGTGG TGGTGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCATGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTT CAACAGCAGC TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCGGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACACAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA
117	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de HumAb 2.1029	gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgcac atcacctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc ggcaagggccc ccaagctgct gatctactac accagcagac tgcacagcgg cgtgcccagc agattcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcacettca ccacatcagc cctgcagccc gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag ggcaagacccc tgcccagaac cttcggcggc ggcaccaagg tggagatc
118	secuencia de polinucleótidos de la cadena ligera de HumAb 2.1029	ATGAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTGTGT CTAATCCAGC TTGGGCAGAC ATCCAGATGA CCCAGAGCCC CAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGCGACAG AGTGACCATC ACCTGCAGAG CCAGCCAGGA CATCAGCAAC TACCTGAACCT GGTACCAGCA GAAGCCCCGC AAGGCCCCCA AGCTGCTGAT CTACTACACC AGCAGACTGC ACAGCGGCGT GCCCAGCAGA TTCAGCGGCA GCGGCAGCGG CACCGACTTC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT GCAGCCGAG GACATCGCCA CCTACTACTG CCAGCAGGGC AAGACCCCTG CCAGAACCTT CGGCGGCGGC ACCAAGGTGG AGATCAAACG TACGGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCTGCG AAGTACCCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT GA
119	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de HumAb 1.802	gaggtgcagc tgggtggagag cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcgggcag cctgagactg agctgcgcgc ccagcggcctt cacttcagc gactacggca tgactgggt gagacaggcc cccggcaagg gcctggagt ggtgagctac atcagcagcg gcagcagaac cgtgtactac gccagcagcg tgaaggcgag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agacgaggac accgcccgtgt actactgcgc cagaaagcac tacaacggcg gctacttcga cgtgtggggc cagggaaccc tggtagccgt gagcagc

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
120	secuencia de polinucleótidos de la cadena pesada de HumAb 1.802	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTGT CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTTCAGCGAC TACGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC AGCAGCGGCA GCAGAACCGT GTACTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AAAGCACTAC AACGGCGGCT ACTTCGACGT GTGGGGCCAG GGCACCCCTGG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAAC TCAAGGACCT CTCTATGATCT GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CCGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCACT CTGTGGCAGG ACCGTGAGTC TTCTCTTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCCG TGAGGTACAG TCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCGGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCAGCTTC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA
121	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de HumAb 1.802	gacatcgtaga tgaccagag ccccgacagc ctggccgtga gctggggcga gagagccacc atcaactgca gagccagcaa gatcgtagc accagcggt acagctacat gacttggtac cagcagaagc cgggagcgc ccccaagctg ctgatctacc tggccagcaa cctggagagc ggcgtgccc acagattcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc agcctgcagg ccgaggacgt ggcggtgtac tactgcccgc gctgcccccc accttcggcc agggcaccaa gctggagatc
122	secuencia de polinucleótidos de la cadena ligera de HumAb 1.802	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC AACTGCAGAG CCAGCAAGAT CGTGAGCACC AGCGGCTACA GCTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGCCCG GCCAGCCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCAACCT GGAGAGCGGC GTGCCGACA GATTAGCGG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGTACTAC TGCCAGCACA GCAGAGAGCT GCGCCCCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA
123	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de HumAb 1.815	caggtgcagc tggtggagag cggcgccggc ctgggtgaagc ccggcgccag cctgagactg agctgcgccg ccagcggtt caccctcagc gacttcggca tgcactggat cagacaggcc cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac agcagcagcg gcggcaccac cgtgtactac gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgcccgtg actactgcgc cagagccagc tacgacggcg gctacttcga ctgctggggc caggggacca ccgtgaccgt gagcagc
124	secuencia de polinucleótidos de la cadena pesada de HumAb 1.815	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTGT CACTGCAGGC TCAAGCGCAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGAAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTTCAGCGAC

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		TTTCGGCATGC ACTGGATCAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACAGC AGCAGCGGCG GCACCACCGT GTACTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AGCCAGCTAC GACGGCGGCT ACTTCGACTG CTGGGGCCAG GGCACCACCG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAAC T CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CGGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCCAC CTGTGGCAGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCAGTTTC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAG CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA
125	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de HumAb 1.815	gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctggggcga gagagccacc atcaactgca gagccagcaa accagcggct accagcggct acagctacat ccaactggtac cagcagaagc cccggccagcc ccccaagctg ctgatctacc tggccagcga cctggagagc ggcgtgcccg acagattcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccacc acagcagaga gctgcccttc accttcgggc agggcaccaa gctggagatc
126	secuencia de polinucleótidos de la cadena ligera de HumAb 1.815	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC AACTGCAGAG CCAGCAAGAG CGTGAGCACC AGCGGCTACA GCTACATCCA CTGGTACCAG CAGAAGCCCC GCCAGCCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCGACCT GGAGAGCGGC GTGCCCCGACA GATTTCAGCG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGTACTAC TGCCACCACA GCAGAGAGCT GCCCTTCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACCGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGAGAGTG TTGA
127	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena pesada de HumAb 1.846	gaggtgcagc tgggtggagag cggcgggcggc ctgggtgcagc ccggcgggcag cctgagactg agctgcgccg ccagcggcct caccctcagc gactacggca tgactgggt gagacaggcc cccggcaagg gcctggagtg ggtgagctac atcagcagcg gcagaccac cctgagctac gccgacagcg tgaagggcag attcaccatc agcagagaca acgccaagaa cagcctgtac ctgcagatga acagcctgag agacgaggac accgcccgtg actactgcgc cagaaagaac tacaacggcg gctacttcga cgtgtggggc cagggcacc cgggtgaccgt gagcagc

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
128	secuencia de polinucleótidos de la cadena pesada de HumAb 1.846	ATGCGTACTC TGGCTATCCT TGCAGCTATT CTGCTTGTG CACTGCAGGC TCAAGCGGAG GTGCAGCTGG TGGAGAGCGG CGGCGGCCTG GTGCAGCCCG GCGGCAGCCT GAGACTGAGC TGCGCCGCCA GCGGCTTCAC CTTGAGCGAC TACGGCATGC ACTGGGTGAG ACAGGCCCCC GGCAAGGGCC TGGAGTGGGT GAGCTACATC AGCAGCGGCA GCACCACCCT GAGCTACGCC GACAGCGTGA AGGGCAGATT CACCATCAGC AGAGACAACG CCAAGAACAG CCTGTACCTG CAGATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG AAAGAACTAC AACGGCGGCT ACTTCGACGT GTGGGGCCAG GGCACCCTGG TGACCGTGAG CAGCGATGTG TGGGGCCAGG GCACCACCGT GACCGTGAGC AGCGCGTCGA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCC GAGAGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG TCGTGGAAC CAGGCGCTCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGACCT CCAGCAACTT CCGCACCCAG ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GACAGTTGAG CGCAAATGTT GTGTCGAGTG CCCACCGTGC CCAGCACCACT CTGTGGCAGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TCGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCATGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTTT CGTGTGGTCA GCGTCTCTAC CGTCGTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCAGCC CCAAGGACAG AAACCATCTC CAAAACCAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CACCTCCCAT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGA
129	secuencia de polinucleótidos de la región variable de la cadena ligera de HumAb 1.846	gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcca gagagccacc atcaactgca gagccagcaa gagcgtgagc gagagcggct acagctacat gcactggtac cagcagaagc cgggccagcc ccccaagctg ctgactctacc tggccagcaa cctggagagc ggcgtgcccg acagattcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc acagcagagt gctgcccccc accttcggcc agggcaccac gctggagatc
130	secuencia de polinucleótidos de la cadena ligera de HumAb 1.846	ATGAAAATCC TGATTCTCGG TATCTTCCTG TTTCTCTGTT CTACTCCAGC TTGGGCAGAC ATCGTGATGA CCCAGAGCCC CGACAGCCTG GCCGTGAGCC TGGGCGAGAG AGCCACCATC AACTGCAGAG CCAGCAAGAG CGTGAGCGAG AGCGGCTACA GCTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGCCCG GCCAGCCCCC CAAGCTGCTG ATCTACCTGG CCAGCAACCT GGAGAGCGGC GTGCCCGACA GATTCAAGCG CAGCGGCAGC GGCACCGACT TCACCCTGAC CATCAGCAGC CTGCAGGCCG AGGACGTGGC CGTGTAATAC TGCCAGCACA GCAGAGTGCT GCCCCCACC TTCGGCCAGG GCACCAAGCT GGAGATCAAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTGA

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une a notum pectinacetilesterasa humana (NOTUM) y reduce la actividad de NOTUM humana en un ensayo con 8-octanoiloxipireno-1,3,6-trisulfonato trisódico (OPTS) *in vitro*, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno caracterizado por la pérdida ósea en un paciente.
2. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis, osteopenia y enfermedad de Paget.
3. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la osteoporosis se selecciona del grupo que consiste en osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis inducida por esteroides o glucocorticoides, osteoporosis masculina y osteoporosis idiopática.
4. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde tras la administración a un sujeto, el anticuerpo aumenta los niveles séricos de PINP *in vivo*, aumenta la densidad mineral ósea *in vivo*, aumenta el espesor cortical de la diáfisis del fémur *in vivo*, aumenta el área ósea de la diáfisis del fémur *in vivo*, aumenta el espesor cortical de la diáfisis del húmero *in vivo*, aumenta la formación ósea endocortical *in vivo*, aumenta la proporción de volumen de hueso cortical en el cuerpo vertebral de la vértebra VL5 *in vivo*, y/o aumenta la proporción de volumen de hueso de cuello femoral a volumen total de cuello femoral *in vivo*.
5. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con KD de menos de 50 nM, preferentemente menos de 20 nM o más preferentemente menos de 10 nM.
6. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo tiene al menos una característica de unión seleccionada de:
 - a) se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83 con una afinidad de unión que es al menos 5 veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84;
 - b) se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 con una afinidad de unión que es al menos 5 veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86;
 - c) se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con una afinidad de unión que es al menos 5 veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94;
 - d) se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con una afinidad de unión que es al menos 5 veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99;
 - e) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16;
 - f) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;
 - g) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32;
 - h) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;
 - i) compite por unirse a NOTUM con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.
7. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo humano.
8. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde:
 - a) la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, y en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, una CDR2 que tiene la secuencia de

11. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 10, en donde

5 a) en el anticuerpo de la reivindicación 10, parte (a): la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; o la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:67 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:69; o la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:68 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:70; o

10 b) en el anticuerpo de la reivindicación 10, parte (b): la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.

12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.

15 13. Una molécula de ácido nucleico que comprende la primera y la segunda secuencias de polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera respectivas del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.

14. Una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.

20 15. Un método para producir un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 que comprende incubar la célula hospedadora de la reivindicación 14 en condiciones suficientes para expresar el anticuerpo.

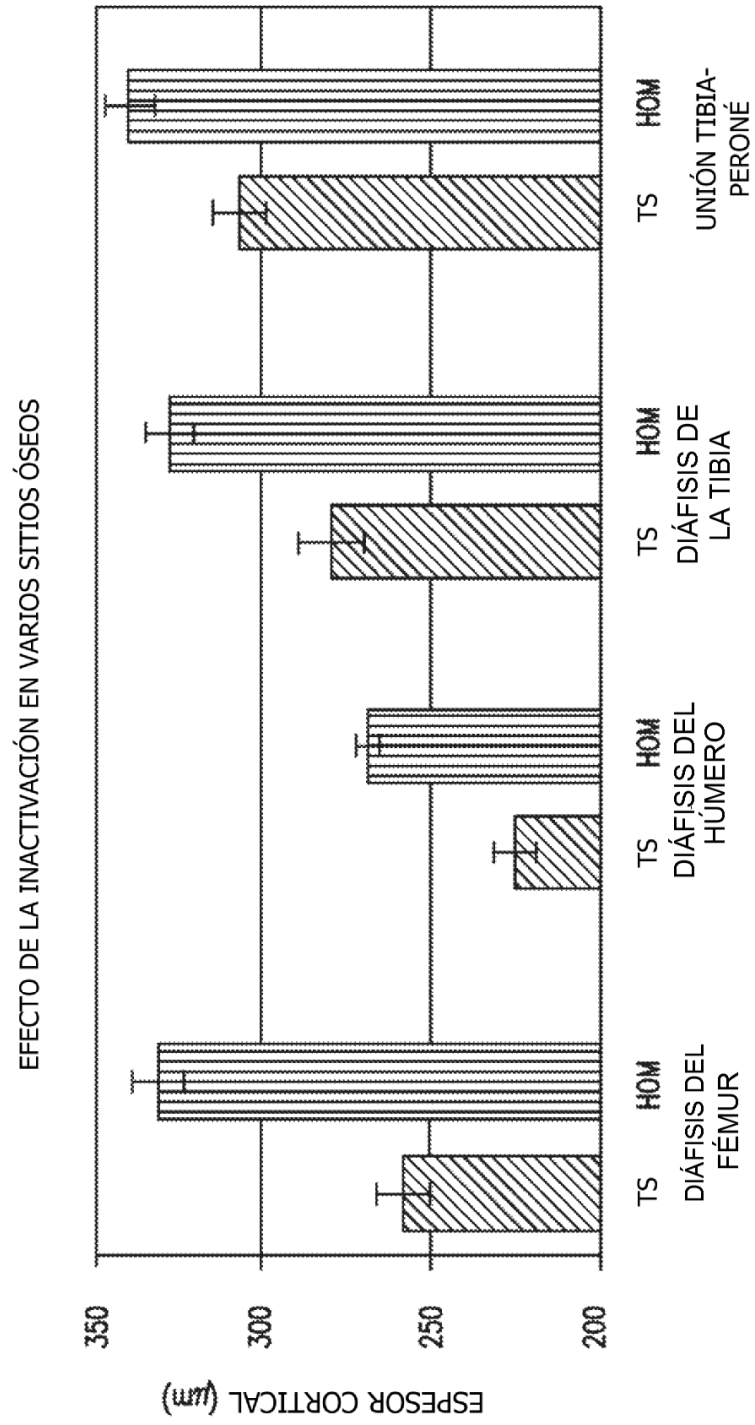


FIG. 1

AUMENTO DEL ESPESOR CORTICAL OBSERVADO EN RATONES HETEROCIGOTOS

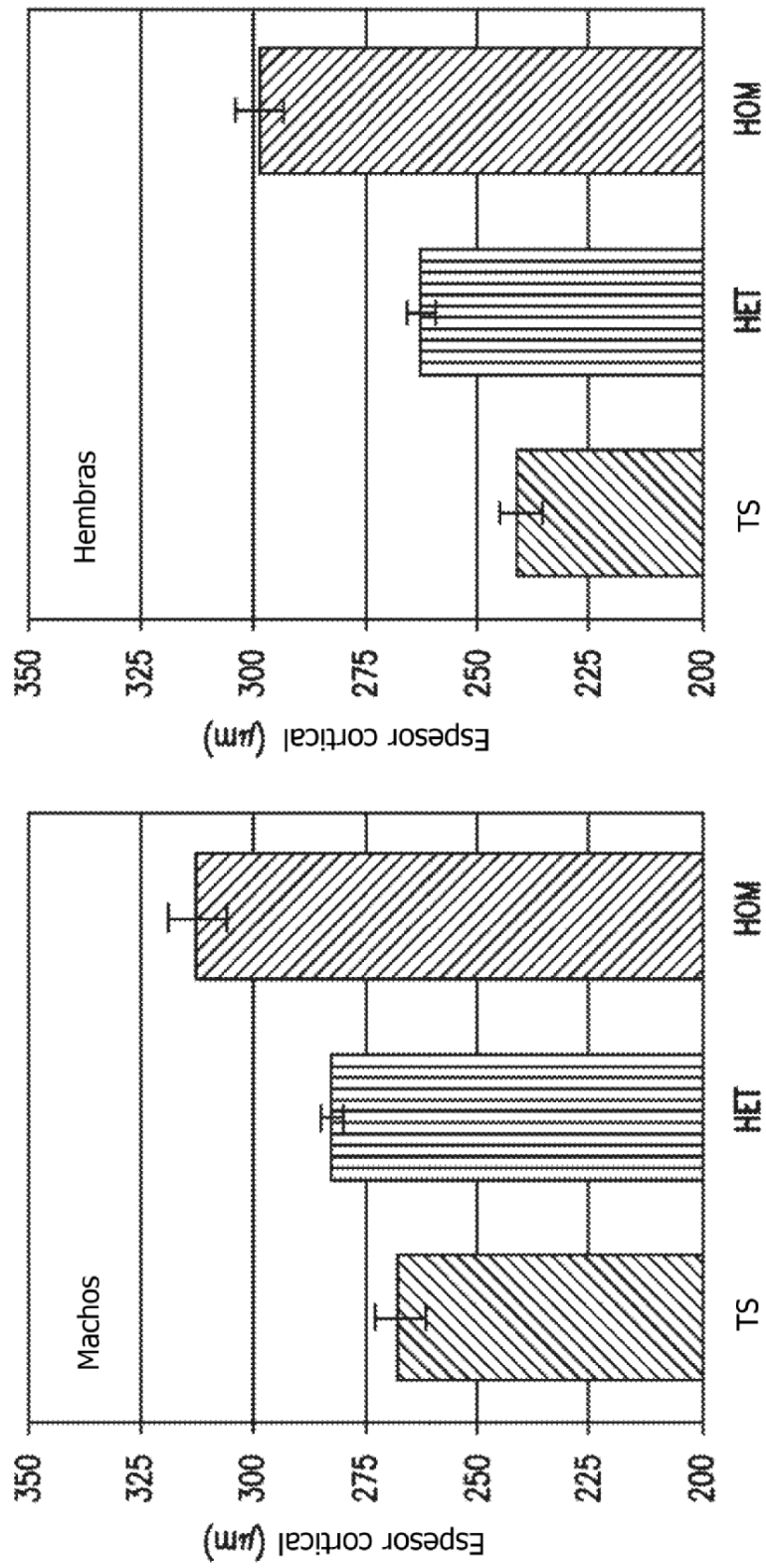


FIG. 2

LOS RATONES MACHO MUESTRAN UNA MAYOR RESISTENCIA A LA ROTURA DEL FÉMUR

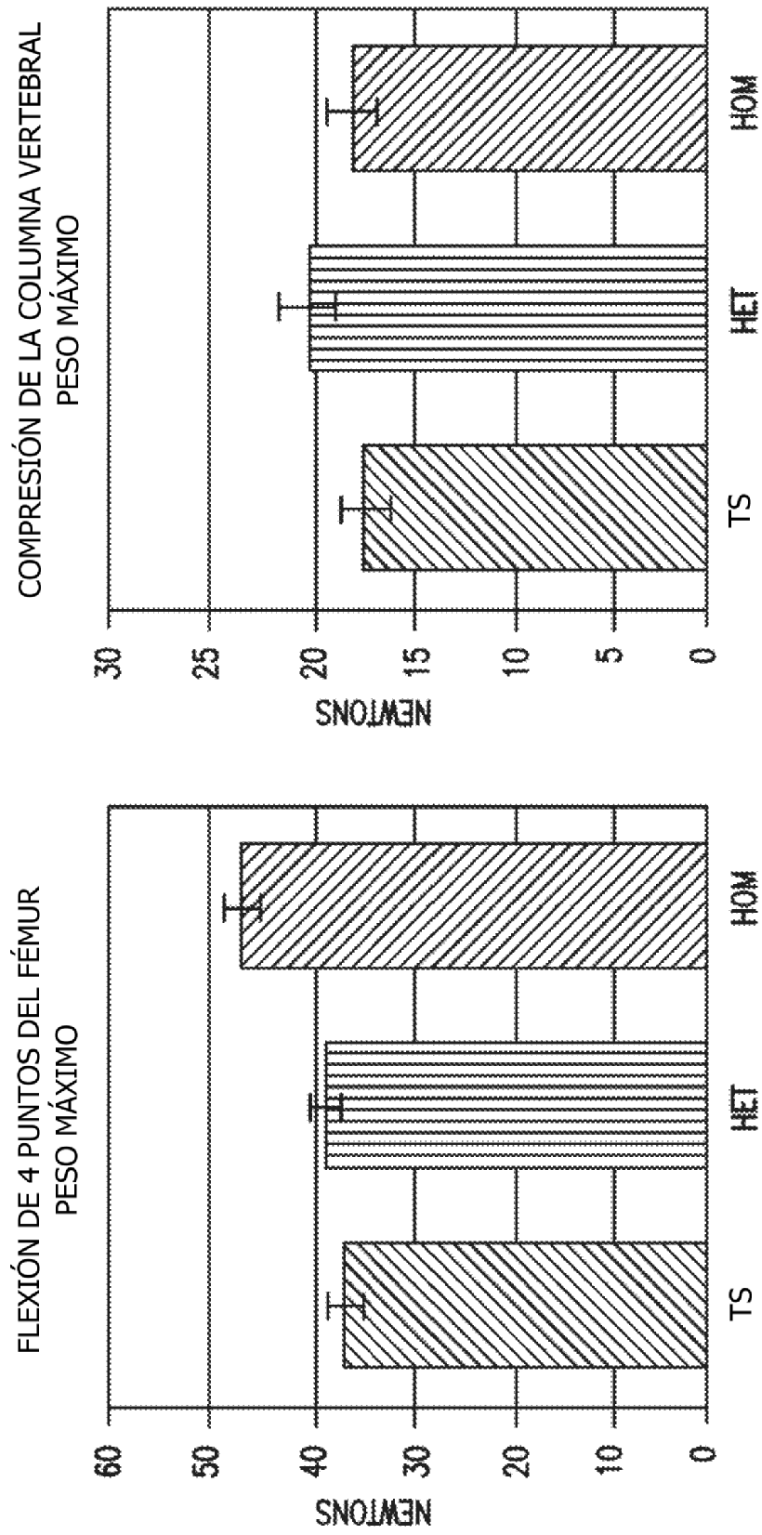


FIG. 3

LOS RATONES HEMBRA MUESTRAN UNA MAYOR RESISTENCIA A LA ROTURA DEL FÉMUR

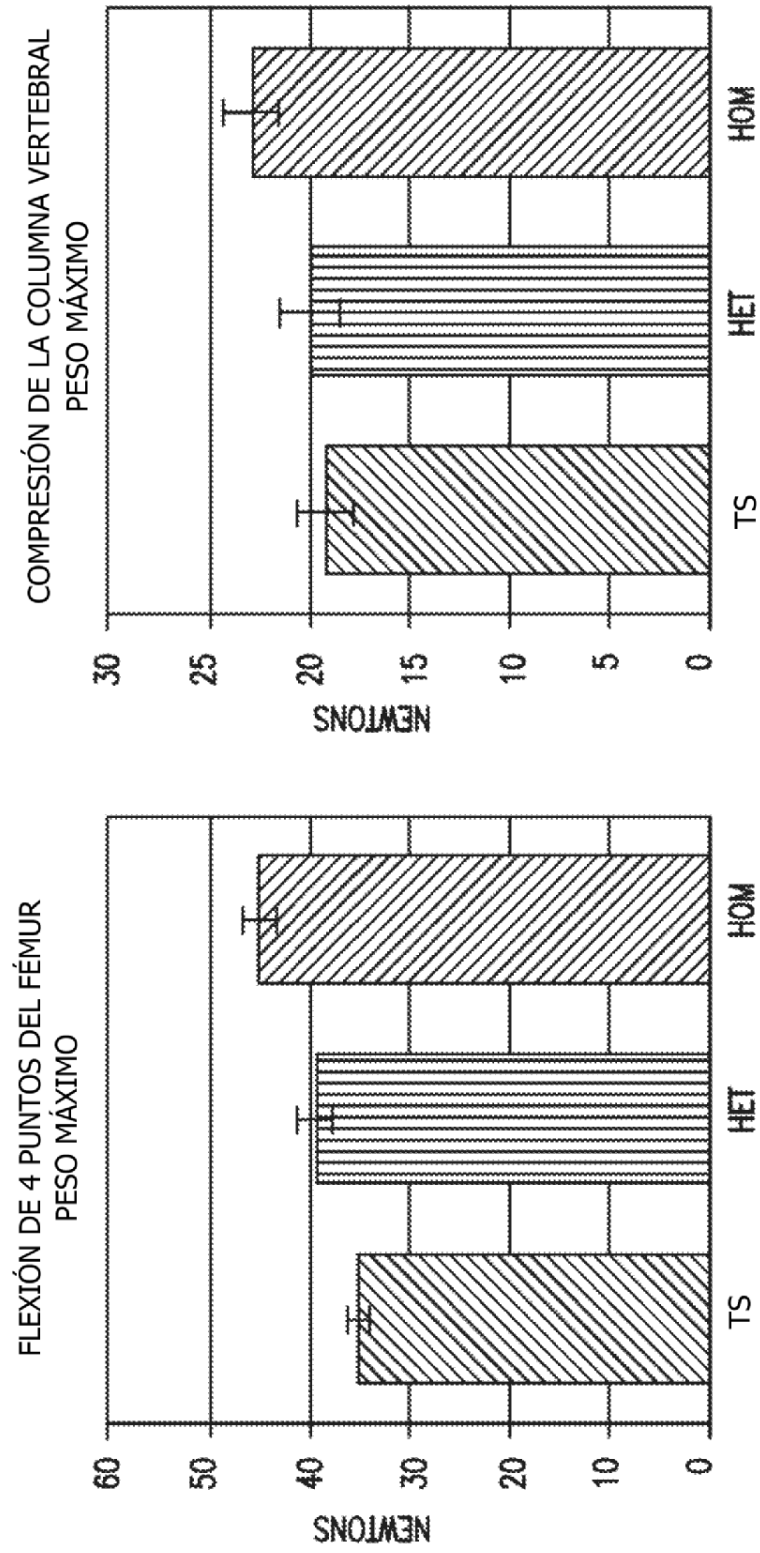


FIG. 4

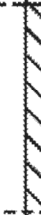
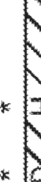
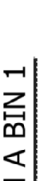
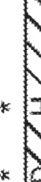
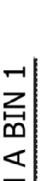
	UNIÓN A BIN 1		
NOTUM HUMANA			
NOTUM DE RATÓN			
H-R			
R-H			
H-R-H			
R-H-R			
H(Q47)			
H(S232A)			
H(N96D)			
	Q47	M177	* TRIADA CATALÍTICA

FIG. 5

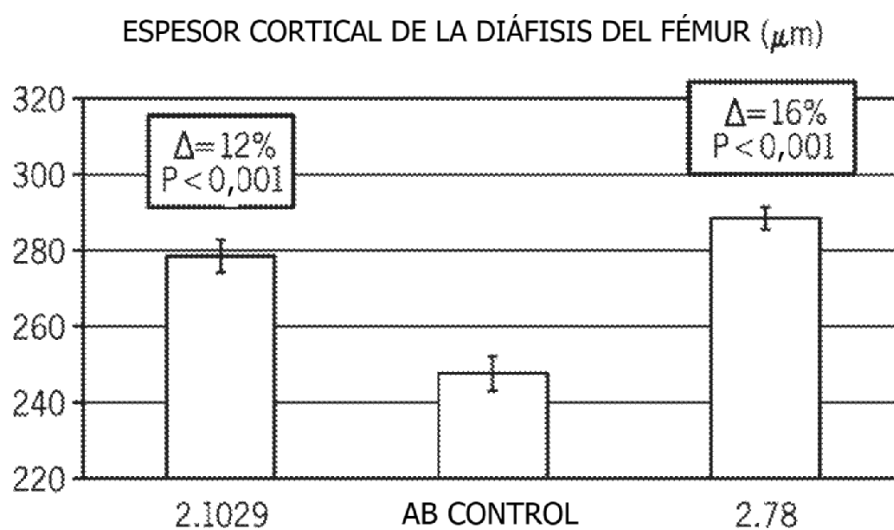


FIG. 6

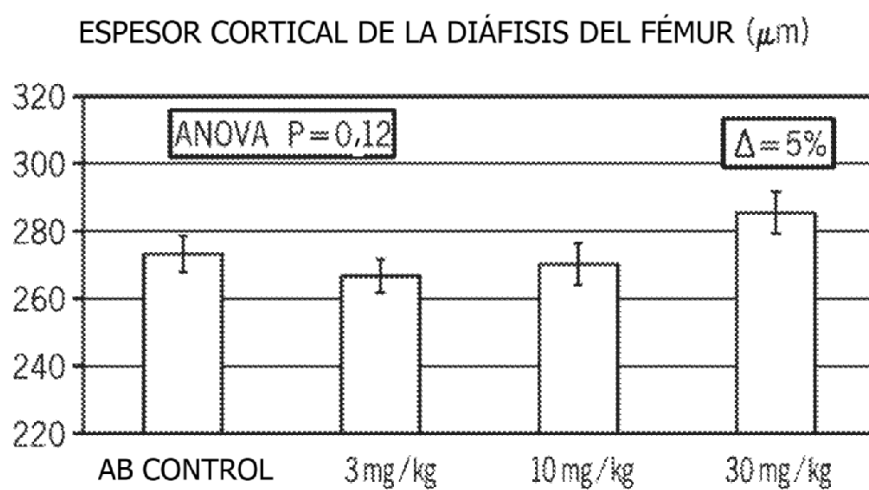


FIG. 7

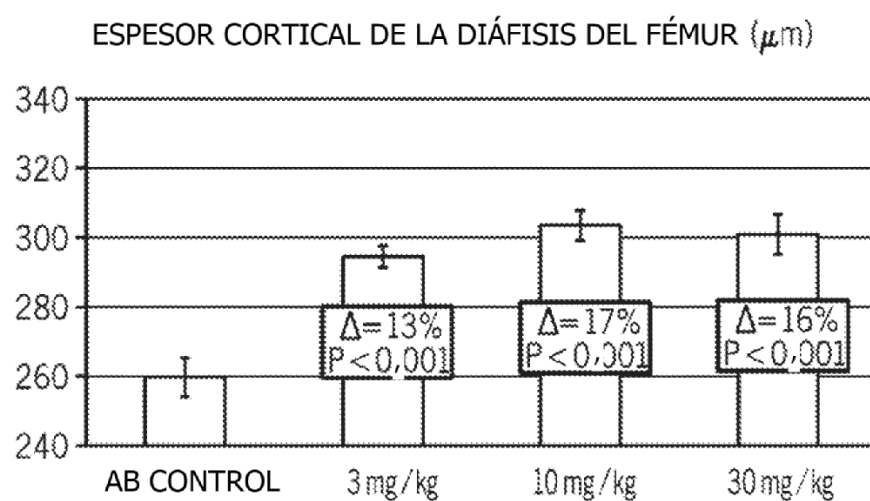


FIG. 8A

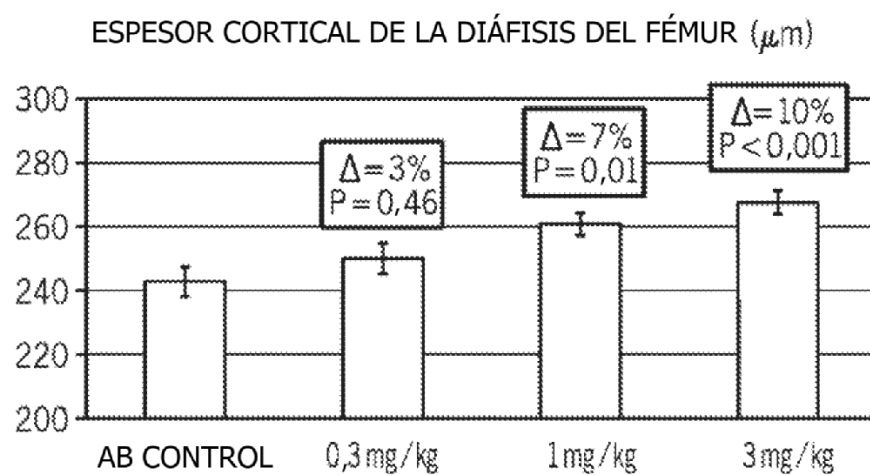
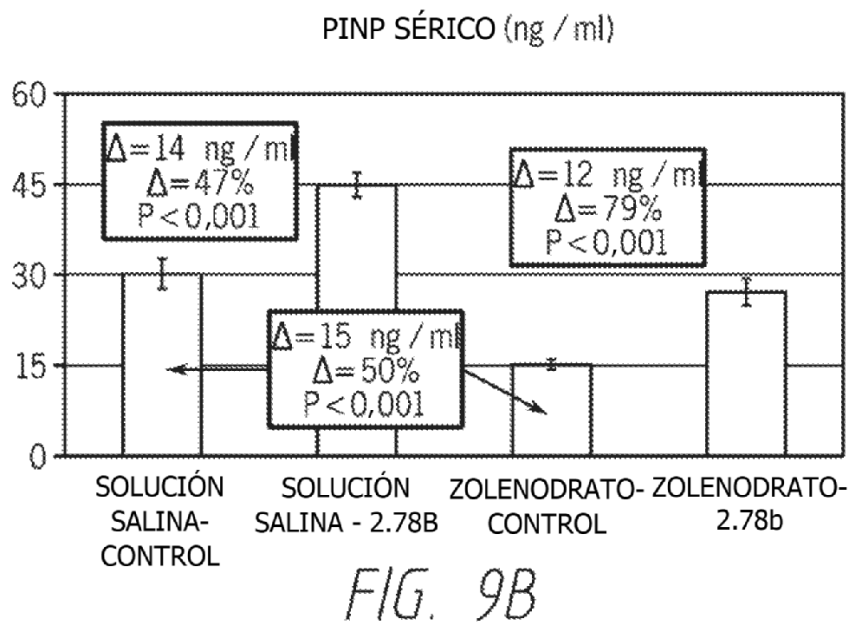
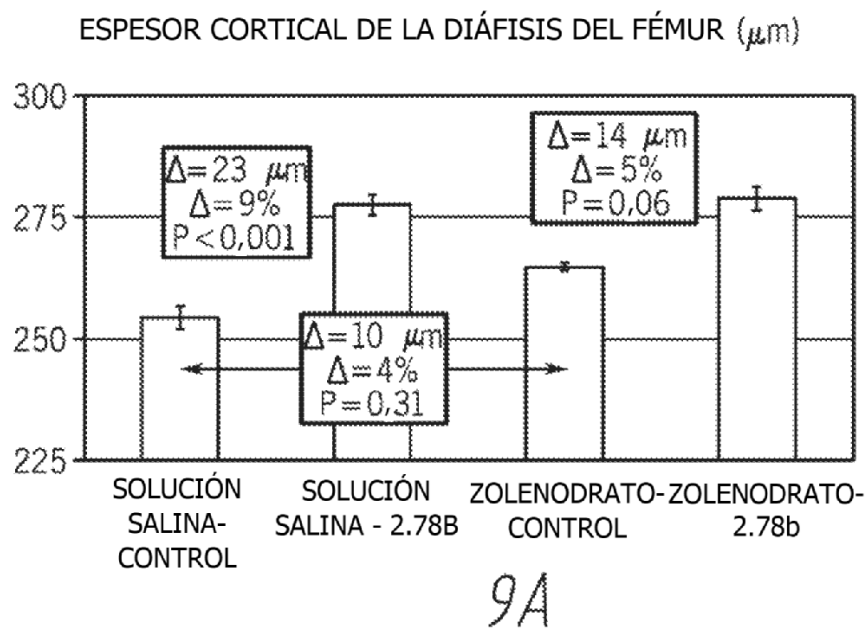


FIG. 8B



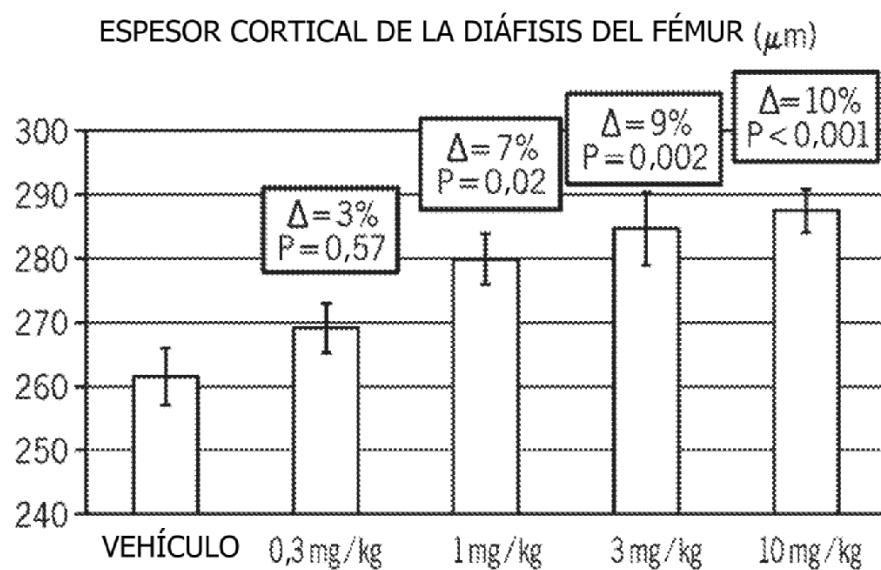


FIG. 10

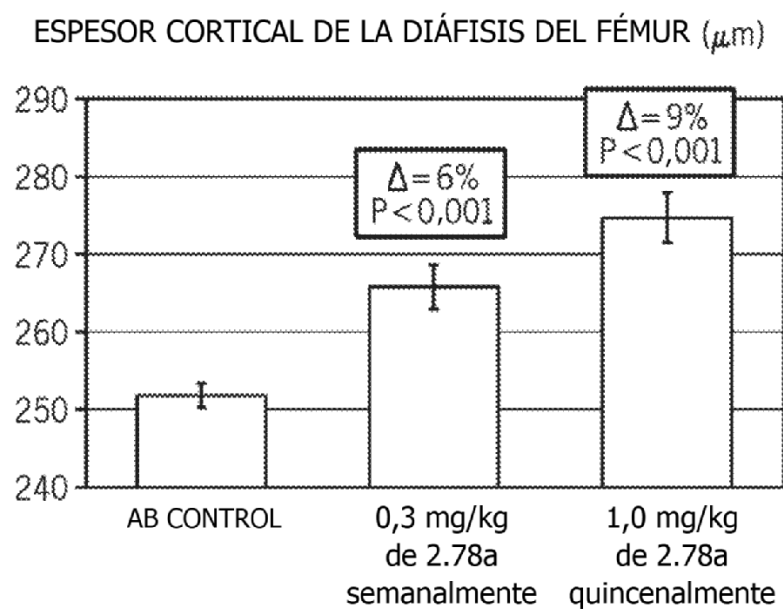


FIG. 11A

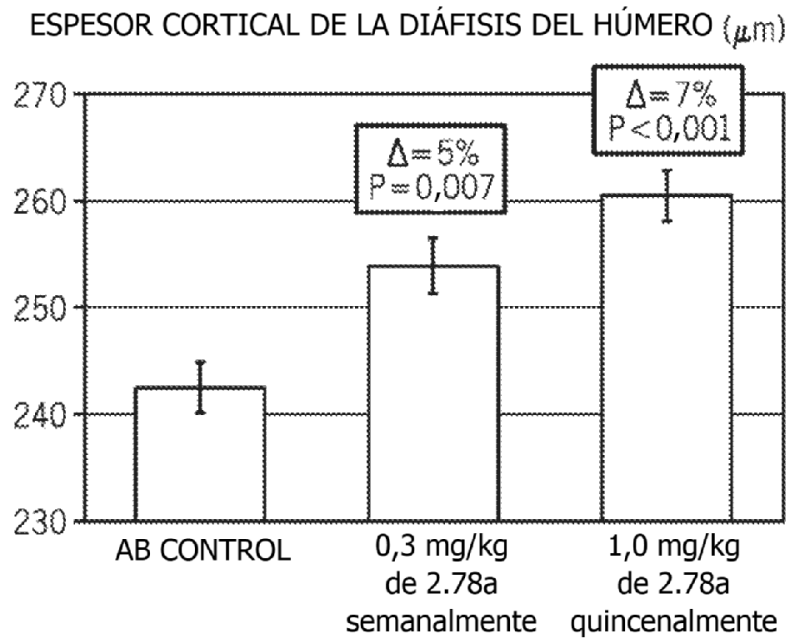


FIG. 11B

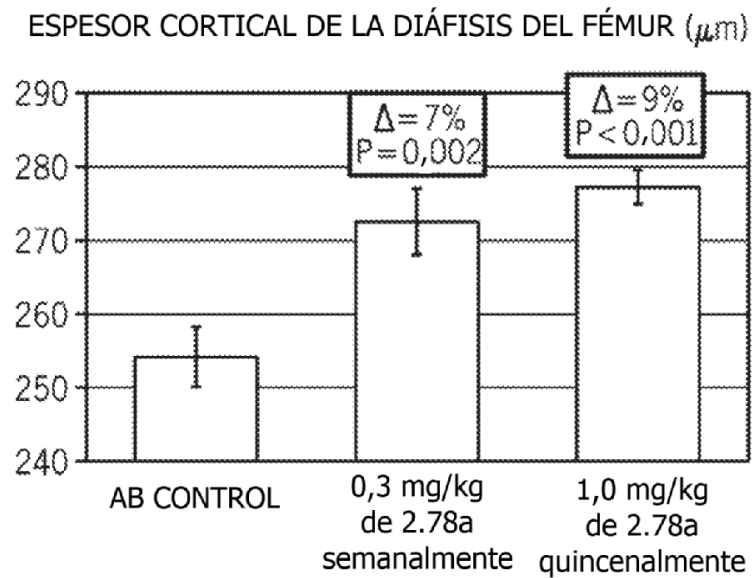


FIG. 12A

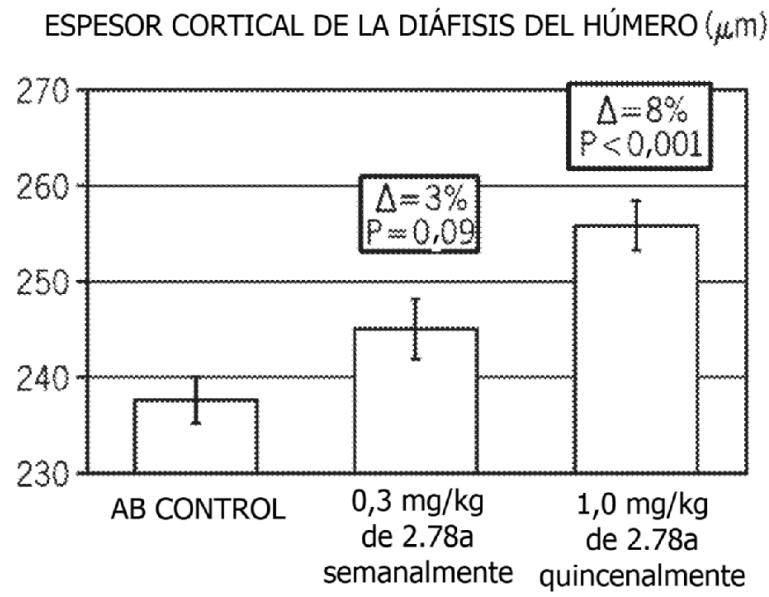


FIG. 12B

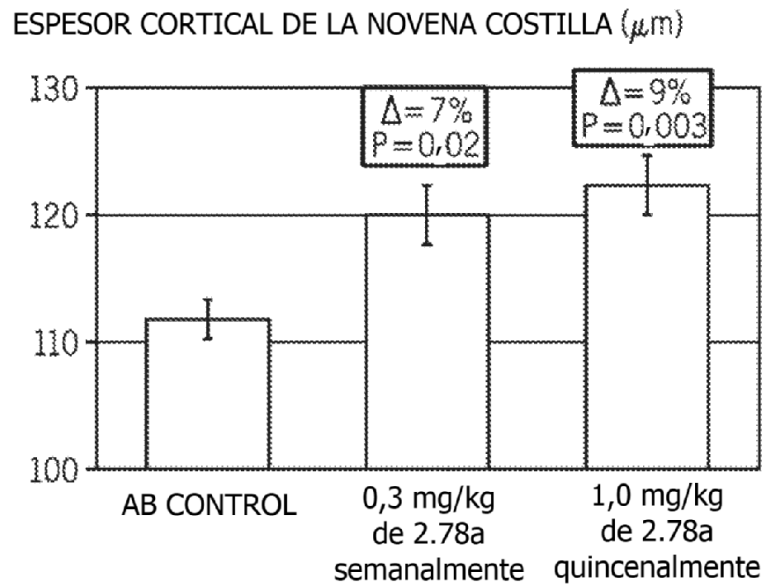


FIG. 12C

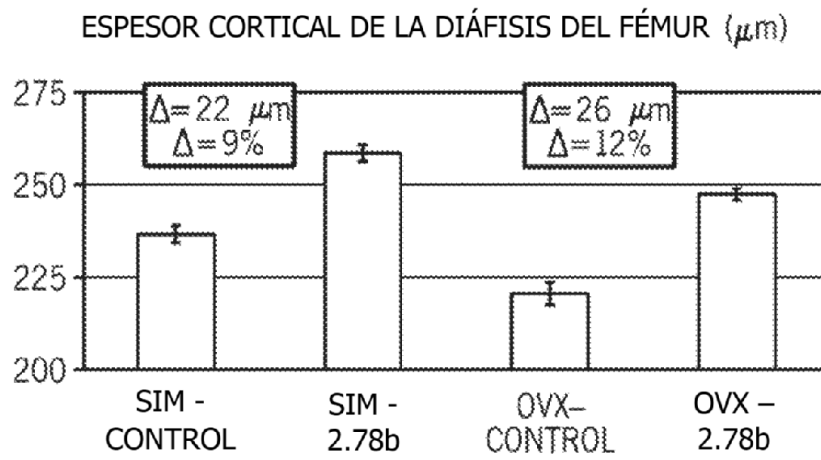


FIG. 13A

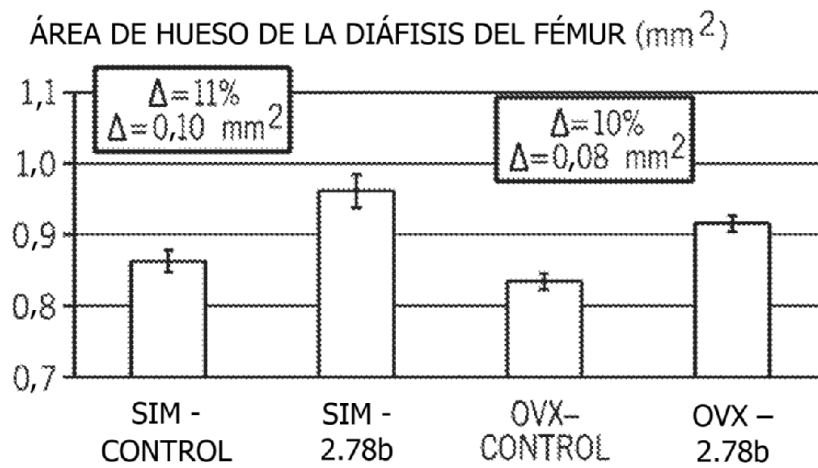


FIG. 13B

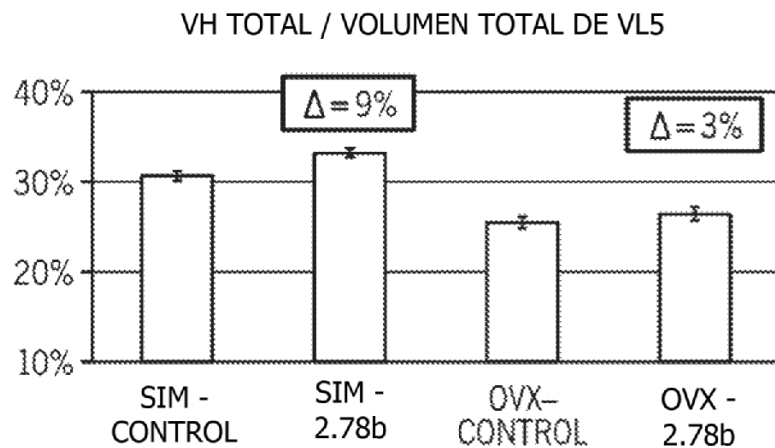


FIG. 14A

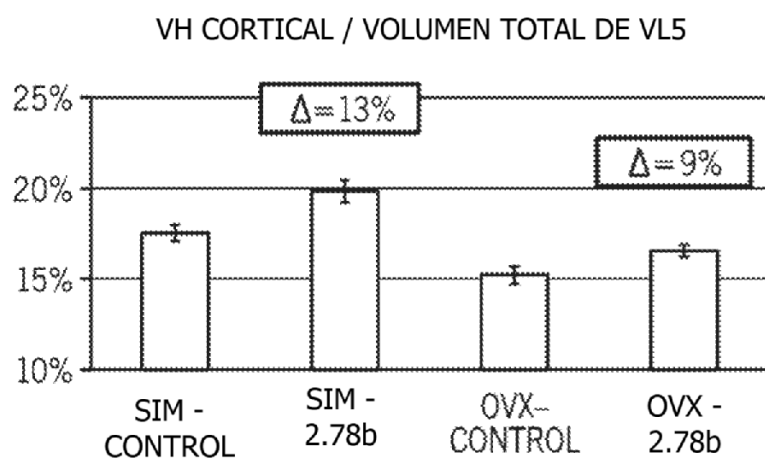


FIG. 14B

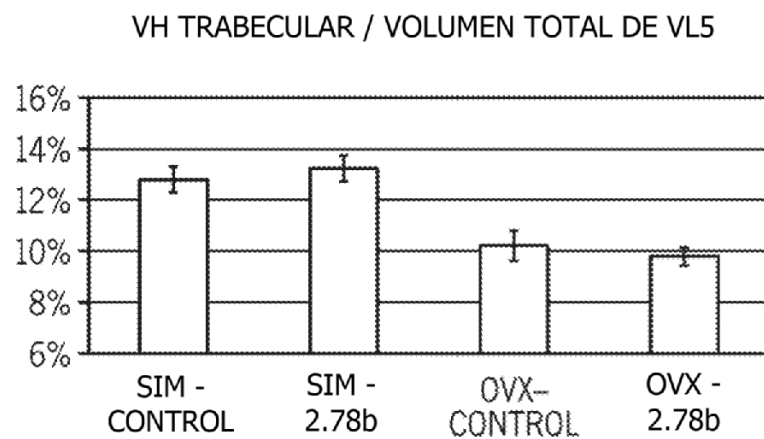


FIG. 14C

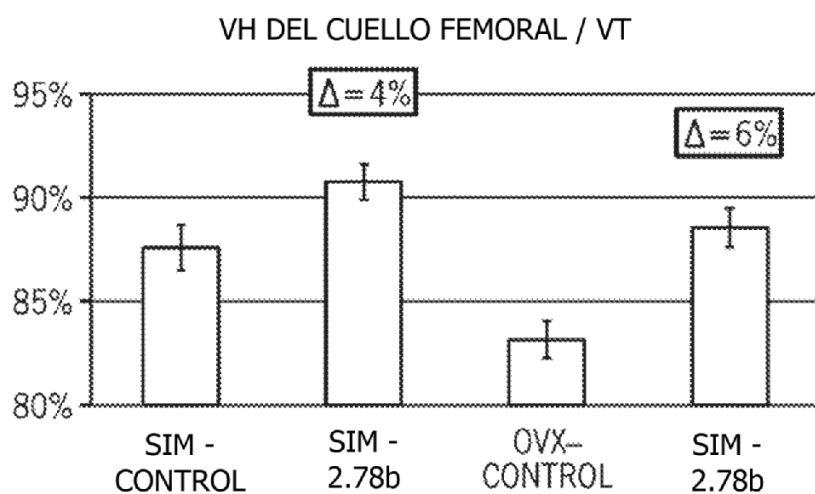


FIG. 15

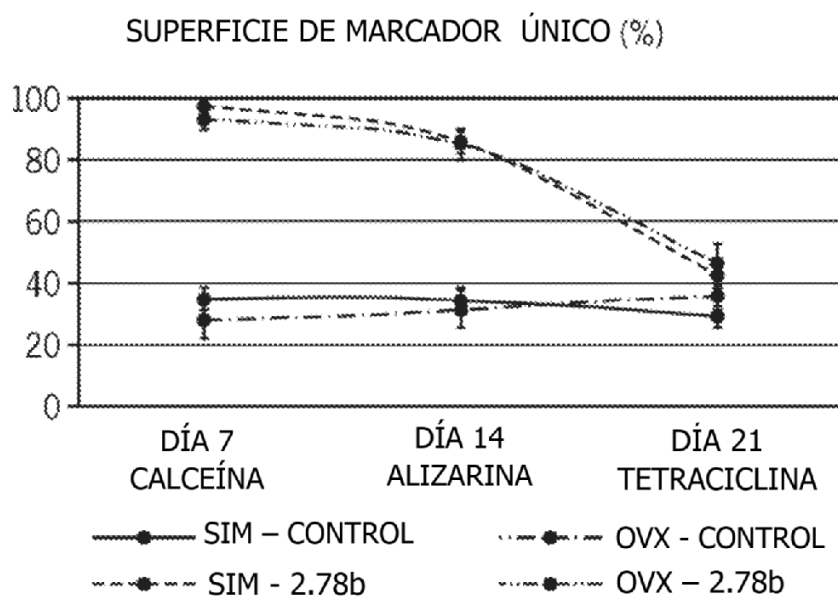


FIG. 16

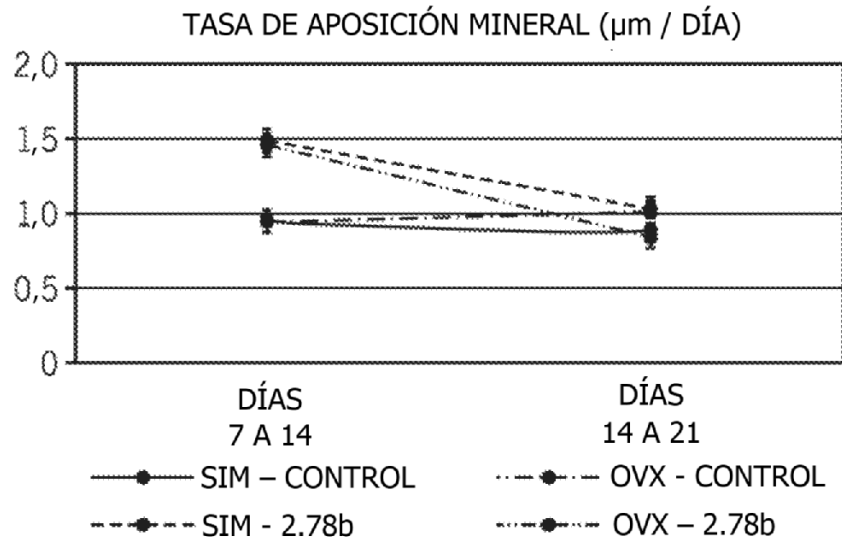


FIG. 17A

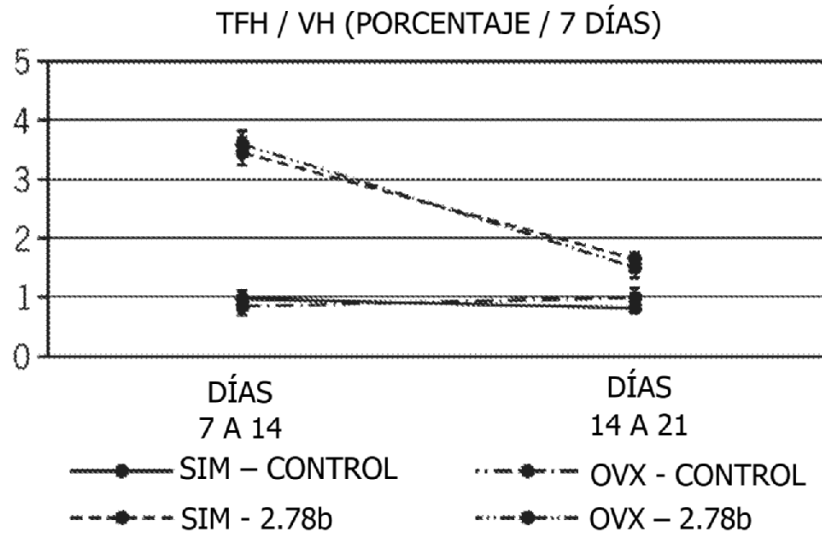


FIG. 17B