

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 798**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2001 E 08010991 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2105449**

54 Título: **Agentes antagonistas de unión selectivos de la proteína de unión a osteoprotegerina**

30 Prioridad:

23.02.2000 US 511139

22.02.2001 US 791153

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

27.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DESHPANDE, RAJENDRA V.;
HITZ, ANNA;
BOYLE, WILLIAM J. y
SULLIVAN, JOHN K.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

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

ES 2 738 798 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

Agentes antagonistas de unión selectivos de la proteína de unión a osteoprotegerina

5 Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos monoclonales y dominios de unión a antígeno que se unen selectivamente a OPGbp y que se pueden utilizar para prevenir o tratar estados patológicos relacionados con la pérdida de masa ósea.

10

Antecedentes de la invención

El tejido óseo vivo presenta un equilibrio dinámico entre el depósito y la resorción del huesos. Dichos procesos están mediados principalmente por dos tipos de células: osteoblastos, que segregan moléculas que comprenden la matriz orgánica del hueso; y osteoclastos que promueven la disolución de la matriz ósea y la solubilización de las sales del hueso. En los individuos jóvenes con los huesos en crecimiento, la velocidad de depósito óseo excede a la velocidad de resorción ósea, en cambio, en los individuos maduros la velocidad de resorción puede exceder a la de depósito. En ésta última situación, la mayor descomposición del hueso lleva a una reducción de la masa y la resistencia del hueso, a un mayor riesgo de fracturas y a una recuperación lenta o incompleta de los huesos rotos.

15

20

Los osteoclastos son unas células multinucleadas fagocíticas grandes que se forman a partir de células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea. Si bien el crecimiento y la formación de osteoclastos funcionales maduros no se comprende completamente, se cree que los osteoclastos maduran junto con el linaje celular monocito/macrófago como respuesta a la exposición a varios factores que favorecen el crecimiento. Se cree que el primer desarrollo de células precursoras de médula ósea en preosteoclastos está mediado por factores solubles como factor- α de necrosis de tumor (TNF- α), factor- β de necrosis de tumor (TNF- β), interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6) y factor inhibidor de leucemia (LIF). En cultivo, los preosteoclastos se forman en presencia de factor de estimulación de colonia de macrófagos añadido (M-CSF). Estos factores actúan principalmente en las primeras etapas del desarrollo del osteoclasto.

25

30

Se ha descrito un factor de polipéptido, proteína de unión a osteoprotegerina (OPGbp), que estimula la formación de osteoclasto y la resorción ósea que, según parece, actúa en un último estadio del desarrollo. Ver PCT WO 98/46751. OPGbp estimula la formación de osteoclasto desde las células precursoras de la médula ósea sin que sea necesario un co-cultivo en presencia de una línea celular de estromas. La estimulación de la resorción ósea a través de OPGbp requiere la interacción con su receptor cognado, receptor de diferenciación y activación de osteoprotegerina (ODAR), y la inhibición de la interacción ODAR/OPGbp a través de osteoprotegerina (OPG) también inhibe la resorción ósea. En consecuencia, la regulación de la unión de OPGbp a ODAR afecta a la formación de osteoclasto y la pérdida de hueso.

35

40

Uno de los objetos de la presente invención consiste en identificar agentes de unión selectivos que regulan la interacción de OPGbp y ODAR, especialmente los agentes que bloquean la interacción de OPGbp y ODAR y/o inhiben al menos una actividad de OPGbp, como la resorción ósea. Otro objeto más de la presente invención consiste en la identificación de agentes de unión selectivos que pueden utilizarse para prevenir y tratar la pérdida de masa ósea. Otro objeto más de la presente invención consiste en la identificación de un anticuerpo, o un dominio de unión a antígeno, o un fragmento o variante del mismo, que regula la interacción de OPGbp y ODAR y neutraliza al menos una actividad de OPGbp. Los anticuerpos pueden utilizarse para prevenir y tratar la pérdida de masa ósea.

45

Tsukii y cols., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2646, 1998, 337-341 divulgan anticuerpos policlonales anti-ODF de conejo y actividades de los mismos.

50

Compendio de la invención

La invención proporciona

55

1. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Figura 9 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 como se muestra en la Figura 5, donde el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno se unen selectivamente a OPGbp humana con una constante de disociación de 1 nM o menos e inhibe la resorción ósea

60

2. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 1, donde la cadena ligera comprende una cadena ligera kappa o lambda.

65

3. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una región

Fc humana.

4. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 1 que reconoce un epítipo en OPGbp humana reconocido por un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Figura 9 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 45 como se muestra en la Figura 5.

5. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende una cadena ligera variable (V_L) y una pesada variable (V_H), donde

a) la cadena V_L comprende una CDR1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 01 RASQSI SRYLN, una CDR2 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 05 GASSLQS y una CDR3 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 09 QHTRA, y

b) la cadena V_H comprende una CDR1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 13 NYAIH, una CDR2 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 16 WINAGNGNTKFSQKFQG y una CDR3 que tiene una o más sustituciones de aminoácido en la secuencia de la SEQ ID NO: 19 DSSNMV RGI IIA YYFDY,

donde CDR1, CDR2 y CDR3 en las cadenas V_L y V_H están separadas por secuencias de aminoácidos estructurales, y donde el anticuerpo o dominio de unión a antígeno se une selectivamente a OPGbp humana con una constante de disociación de 1 nM o menos e inhibe la resorción ósea

6. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 5, donde la cadena V_H comprende una CDR3 que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID NO: 80: XSSNMV RGI IIA YYFDY;

SEQ ID NO: 81: DXSNMVRGI IIA YYFDY;

SEQ ID NO: 82: DSXNMVRGI IIA YYFDY;

SEQ ID NO: 83 DSSXMVRGI IIA YYFDY;

SEQ ID NO: 84: DSSNXVRGI IIA YYFDY;

SEQ ID NO: 85: DSSNMVRGI IIA YYFDY;

SEQ ID NO: 86: DSSNMVXGI IIA YYFDY;

SEQ ID NO: 87: DSSNMVRXIIA YYFDY;

SEQ ID NO: 88: DSSNMVRGXIIA YYFDY;

SEQ ID NO: 89: DSSNMVRGIXIIA YYFDY;

SEQ ID NO: 90: DSSNMVRGIIA YYFDY;

SEQ ID NO: 91: DSSNMVRGIIIXYYFDY;

SEQ ID NO: 92: DSSNMVRGIIIXYFDY;

SEQ ID NO: 93: DSSNMVRGIIIXYFDY;

SEQ ID NO: 94: DSSNMVRGIIIXYDY;

SEQ ID NO: 95: DSSNMVRGIIIXYFX y

SEQ ID NO: 96: DSSNMVRGIIIXYFDX;

donde X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición.

7. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 5, donde la cadena V_H comprende una CDR3 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 19 DSSNMV RGI IIA YYFDY.

8. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
- 5 11. La célula huésped de la reivindicación 10, que es una célula CHO.
12. Un método para producir un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 11 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo o dominio de unión a antígeno.
- 10 13. Un método para producir un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende cultivar una célula huésped en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 15 14. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende un isotipo seleccionado de IgG, IgM, IgA, IgE e IgD.
15. El anticuerpo de la reivindicación 14, donde el isotipo es IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.
- 20 16. Una composición que comprende el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la inhibición de la formación o activación de osteoclastos.
- 25 18. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la inhibición de la resorción ósea.
19. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida de masa ósea.
- 30 20. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en la reivindicación 19, donde la pérdida de masa ósea es el resultado de osteoporosis, metástasis de cáncer al hueso; artritis reumatoide, hipercalcemia de malignidad y osteoporosis inducida por esteroides.
- 35 21. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que se va a administrar junto con una composición que comprende al menos un agente anti-resortivo del hueso adicional.
- 40 22. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en la reivindicación 21, donde el agente anti-resortivo es un estrógeno, un bisfosfonato o un modulador selectivo del receptor de estrógeno.
- 45 23. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que se va a administrar junto con una composición que comprende un agente anabólico para el hueso.
24. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en la reivindicación 23, donde el agente anabólico es hormona paratiroides o un complejo de factor de crecimiento de tipo insulina y proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina.
- 50 25. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que se va a administrar junto con un inhibidor de interleucina-1 o un inhibidor del factor alfa de necrosis de tumor.
- 55 26. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la prevención o el tratamiento del crecimiento de células de tumor en el hueso.
27. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 19, donde la pérdida de masa ósea está asociada con cáncer de pecho, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esófago, rectal, vejiga, cuello uterino, ovario, hígado y gastrointestinal.
- 60 28. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 26 para su uso en la prevención o el tratamiento del mieloma múltiple.
- 65 29. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como en las reivindicaciones 20 o 26, que se va a administrar en combinación con un agente de terapia contra el cáncer.

30. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 29, donde el agente de terapia contra el cáncer es radioterapia o quimioterapia.

5 31. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como en las reivindicaciones 20 o 26, que se va a administrar con anticuerpos que se unen a células de tumor e inducen un efecto citotóxico o citostático sobre el crecimiento tumoral.

10 Un anticuerpo se puede preparar por inmunización de un animal con OPGbp, tal como OPGbp murina o humana, o con un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo. Por otra parte, se puede inmunizar a un animal con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica OPGbp, de manera que OPGbp es expresada y asociada con la superficie de las células transfectadas. Alternativamente, se pueden obtener agentes de unión selectivos que son anticuerpos por detección selectiva de una biblioteca que comprende secuencias de anticuerpo o dominio de unión a antígeno para la unión con OPGbp. Dicha biblioteca se prepara convenientemente en bacteriófago como fusiones de proteína o péptido con una proteína de recubrimiento de bacteriófago que se expresan en la superficie de las partículas en fagos ensambladas y las secuencias de ADN de codificación contenidas dentro de las partículas en fagos (denominada "biblioteca de despliegue en fagos"). En uno de los ejemplos, una biblioteca de fago desplegado contiene secuencias de ADN que codifican anticuerpos humanos, como cadenas pesadas y ligeras variables.

20 Los agentes de unión selectivos que son anticuerpos y dominios de unión a antígeno pueden ser glucoproteínas tetraméricas similares a los anticuerpos nativos o pueden ser anticuerpos de cadena simple; fragmentos Fv, Fab, Fab' o F(ab)', anticuerpos biespecíficos, heteroanticuerpos u otros fragmentos, variantes o derivados de los mismos, que se pueden unir a OPGbp y neutralizar parcial o completamente la actividad de OPGbp. Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno se pueden producir en líneas celulares de hibridoma (células de producción de anticuerpos como células de bazo fusionadas con células de mieloma de ratón, por ejemplo) o se pueden producir en líneas celulares heterólogas transfectadas con moléculas de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o dominio de unión a antígeno.

30 Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno como se define en la reivindicación 1 puede comprender:

- (a) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada Fab tal como se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 51) o figura 10 (SEQ ID NO: 53);
 - 35 (b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácido conservadoras de la secuencia del punto (a);
 - (c) una secuencia de aminoácido de cadena pesada que es idéntica en al menos aproximadamente un 80 % a la secuencia del punto (a); o
 - (d) un fragmento o derivado de (a), (b) o (c);
- 40 uniéndose selectivamente el anticuerpo o dominio de unión a antígeno a OPGbp.

45 En otro modo de realización, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno, tal como se define en la reivindicación 1 o 5, reconoce un epítipo en OPGbp humana reconocido por un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada Fab tal como se muestra en la figura 9 (SEQ ID NO: 51) o la figura 10 (SEQ ID NO: 53) y una secuencia de aminoácido ligera Fab, tal como se muestra en la figura 5 (SEQ ID NO: 43) o la figura 6 (SEQ ID NO: 45). Además se proporciona un anticuerpo o dominio de unión a anticuerpo anti-OPGbp que reconoce un epítipo DE en OPGbp.

50 En otro modo de realización, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno como se define en la reivindicación 1 o 5 comprende una cadena V_L y V_H :
donde cada una de las cadenas V_L comprende secuencias de aminoácidos de CDR designadas CDR1(V_L), CDR2(V_L) y CDR3(V_L), separadas por secuencias de aminoácidos estructurales, seleccionándose CDR1(V_L) del grupo que consiste en:

- 55 RASQSI SRYLN (SEQ ID NO: 01);
- RASQSVGSYLA (SEQ ID NO: 02);
- RASQSVSSSLA (SEQ ID NO: 03) y
- SGDALPKQY (SEQ ID NO: 04);

60 seleccionándose CDR2(V_L) del grupo que consiste en:

- 65 GASSLQS (SEQ ID NO: 05);
- DATNRAT (SEQ ID NO: 06);
- GASSRAT (SEQ ID NO: 07) y
- EDSERPS (SEQ ID NO: 08);

y seleccionándose CDR3(V_L) del grupo que consiste en:

QHTRA (SEQ ID NO: 09);
 QHRRT (SEQ ID NO: 10);
 QQYGA (SEQ ID NO: 11) y
 QSTDSSGTYVV (SEQ ID NO: 12);

donde CDR1(V_i), CDR2(V_i) y CDR3(V_i) se seleccionan independientemente entre sí; y
 donde cada cadena V_h comprende secuencias de aminoácidos de CDR designadas CDR1(V_h), CDR2(V_h) y
 CDR3(V_h), separadas por secuencias de aminoácido estructurales, seleccionándose CDR1(V_h) del grupo que
 consiste en:

NYAIH (SEQ ID NO: 13);
 NYPMH (SEQ ID NO: 14); y
 DYAMH (SEQ ID NO: 15)

seleccionándose CDR2(V_h) del grupo que consiste en:

WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16);
 VISYDGNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 17); y
 GISWNSGRIGYADSVKG (SEQ ID NO: 18)

seleccionándose CDR3(V_h) del grupo que consiste en:

DSSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);
 GGGGFDY (SEQ ID NO: 20); y
 GGTSARYSSGWYY (SEQ ID NO: 21)

donde CDR1(V_h), CDR2(V_h) y CDR3(V_h) se seleccionan independientemente entre sí.

En otro modo de realización, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno como se define en la reivindicación 5
 comprende una cadena V_i y V_h, donde:

la cadena V_i comprende una CDR1 que tiene la secuencia ASQSIERYLN (SEQ ID NO: 01), una CDR2 que tiene
 la secuencia GASSLQS (SEQ ID NO: 05) y CDR3 que tienen la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09) y
 comprendiendo la cadena V_h CDR1 que tiene la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13), CDR2 que tiene la
 secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16) y CDR3 que tiene la secuencia DSSNMVRGBIIIAYYFDY
 (SEQ ID NO: 19); estando cada CDR1, CDR2 y CDR3 en cada cadena V_i y V_h separados por secuencias de
 aminoácido estructurales.

Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno de la invención se derivan de secuencias de ácido nucleico de línea
 germinal presentes en ADN genómico que codifica secuencias de aminoácido de cadena pesada y ligera. Los
 anticuerpos están codificados por secuencias de ácido nucleico que son los productos del reordenamiento de la
 secuencia de línea germinal y mutación somática.

En un modo de realización, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la invención comprende una cadena V_i y
 V_h comprendiendo la cadena V_i una variante reordenada o somática de los genes de línea germinal V_h1, tal como se
 representa en la figura 19 (SEQ ID NO: 66); comprendiendo la cadena V_h comprende una variante reordenada o
 somática de genes de línea germinal V_h1, tal como se representa en la figura 16 (SEQ ID NO: 59); y uniéndose el
 anticuerpo selectivamente a un polipéptido OPGbp.

En otro modo de realización, la cadena V_i comprende una variante reordenada o somática de genes de línea
 germinal Vk3 tal como se representa en la figura 20 (SEQ ID NO: 68) y la cadena V_h comprende una variante
 reordenada o somática de genes de línea germinal V_h1 tal como se representa en la figura 16 (SEQ ID NO: 59).

En otro modo de realización, la cadena V_i comprende una variante reordenada o somática de un gen de línea
 germinal Vk3 tal como se representa en la figura 21 (SEQ ID NO: 70) y la cadena V_h comprende una variante
 reordenada o somática de genes de línea germinal V_h3 tal como se representa en la figura 17 (SEQ ID NO: 62).

En otro modo de realización, la cadena V_i comprende una variante reordenada o somática de un gen de línea
 germinal VI3 tal como se representa en la figura 22 (SEQ ID NO: 72) y la cadena V_h comprende una variante
 reordenada o somática de genes de línea germinal V_h3 tal como se representa en la figura 18 (SEQ ID NO: 64).

Los agentes de unión selectivos de la invención (anticuerpo o dominio de unión a antígeno) inhiben parcial o
 completamente al menos una actividad de OPGbp, como por ejemplo la unión de OPGbp a ODAR, la formación o
 activación de osteoclastos, o la resorción ósea mediada por OPGbp, y se utilizan para prevenir y/o tratar estados
 patológicos de los huesos. En un modo de realización, se administra un antagonista de OPGbp, como por ejemplo

un anticuerpo o dominios de unión a antígeno, a un animal que experimenta una pérdida de masa ósea, o que se encuentra en riesgo de pérdida de masa ósea con el fin de prevenir o tratar la pérdida de masa ósea. Se puede utilizar un antagonista de OPGbp para prevenir y/o tratar osteoporosis, pérdida de masa ósea como consecuencia de metástasis de cáncer al hueso; pérdida de masa ósea como consecuencia de artritis reumatoide, hipercalcemia de malignidad y osteoporosis inducida por esteroide.

Asimismo, se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos o dominios de unión a antígeno según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Descripción de las figuras

La figura 1 presenta un ensayo ELISA de patrones Fab predominantes para reactividad con OPGbp (143-317) humana. Se llevaron a cabo valoraciones utilizando un máximo de 50 µl de solución de fago por pocillo para dar un intervalo típico de 10^9 - 10^{11} fagos/pocillo en el ensayo ELISA. Se prepararon reservas de fagos para ELISA tal como se describe en el ejemplo 1. Los valores fueron de determinaciones en un solo punto. Los patrones "AB" y "X" fueron superpuestos en la misma línea.

En la figura 2 se muestra la inhibición de la unión de OPGbp a ODAR mediante Fabs "AT" e "Y". Se purificaron Fabs tal como se ha descrito en el ejemplo 4 y se añadieron a concentraciones de pocillo finales, que se muestran en la figura. Los detalles del ensayo de unión OPGbp/ODAR se exponen en el ejemplo 1. Los valores fueron las medias de determinaciones por duplicado.

La figura 3 muestra los ensayos de la médula ósea de Fabs "AT" "Y" y "P". Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada Fabs "AT", "Y" y "P". Se purificaron las Fabs tal como se describe en el ejemplo 4 y se añadieron a las diluciones de pocillo finales que se indican en la figura (las soluciones de reserva de Fab fueron de 750 µg/ml a 1 mg/ml). El formato de ensayo incluye una incubación previa de 1 hora del Fab anti-hu-OPGbp con 10 ng/ml de concentración final de células por pocillo de OPGbp [143-317] humana. Los valores fueron las medias de determinaciones por triplicado.

La figura 4 muestra los ensayos de célula RAW de Fabs "AT", "Y" y "P". Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada Fabs "AT", "Y" y "P". Se purificaron los Fabs tal como se describe en el ejemplo 4. Se incubaron previamente las Fabs con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de una dilución 1/20 hasta la concentración final de células por pocillo que se muestra en el gráfico. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml. La concentración de células fue 1×10^5 /ml. Los valores fueron de determinaciones por triplicado con barras de error que designan 2 desviaciones típicas (2 STD).

La figura 5 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido de Fab "AT" de cadena ligera.

La figura 6 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "Y" de cadena ligera.

La figura 7 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "P" de cadena ligera.

La figura 8 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "S" de cadena ligera.

La figura 9 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "AT" de cadena pesada.

La figura 10 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "Y" de cadena pesada.

La figura 11 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "P" de cadena pesada.

La figura 12 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácido Fab "S" de cadena pesada.

La figura 13 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido Fab que se presentan en las figuras 5-12. Se compararon las secuencias de aminoácido previstas de Fabs de cadena ligera y pesada "AT", "Y", "P" y "S" en cuanto a la identidad y la similitud. Las cadenas pesadas "AT" e "Y" difieren solamente en una posición de aminoácido. Como biblioteca designada, las cuatro Fabs tienen regiones CH1 de cadena pesada idénticas que comprendían la mitad carboxi de la cadena pesada que se incluyen en los cálculos de identidad y similitud. Las cadenas ligeras "AT", "Y" y "P" comparten las mismas familias V kappa, o similares, y por lo tanto difieren solamente en 1 a 2 aminoácidos en la mitad carboxilo de la cadena, que se incluye en los cálculos.

La figura 14 muestra una comparación de las regiones que determinan complementaridad (CDRs) de cadena pesada y ligera previstas de Fabs "AT", "Y", "P" y "S". Para las comparaciones de cadena pesada, CDR1 incluye radicales de aminoácido 32-36 inclusive para todas las Fabs; CDR2 incluye radicales de aminoácido 51-67 inclusive para todas las Fabs; y CDR3 incluye radicales de aminoácido 100-116 inclusive para todas las Fabs "AT" e "Y", 100-106 inclusive para Fab "P" y 100-113 inclusive para Fab "S". Para las comparaciones de cadena

ligera, CDR1 incluye radicales de aminoácido 29-39 inclusive para Fabs "AT" e "Y", 28-39 inclusive para Fab "P" y 27-35 inclusive para Fab "S"; CDR2 incluye radicales de aminoácido 55-61 inclusive para Fabs "AT", "Y" y "P" y 53-59 inclusive para Fab "S"; y CDR3 incluye radicales de aminoácido 94-98 inclusive para Fabs "AT", "Y" y "P" y 92-102 inclusive para Fab "S".

5 La figura 15 muestra una comparación de las clases de Fab. La comparación de clases de Fab se obtuvo a partir de un análisis PLOT ADN Base-V. El símbolo (*) indica que la región (D) de diversidad de emparejamiento más cercana, aunque relacionada con las secuencias de líneas germinales conocida no pudo determinarse. El símbolo (**) indica que la secuencia de la región (V) variable de línea germinal de la pareja más próxima ha sido
10 identificada pero no denominada formalmente hasta la fecha, siendo de la familia lambda más rara.

15 La figura 16 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada Fab "AT" e "Y" previstas (radicales 2-127 inclusive en las figuras 9 y 10, respectivamente) con una secuencia de la línea germinal de la familia VH1. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 1-03, la secuencia de la región D 3-10 y la secuencia de la región J JH4 (SEQ ID NO: 44). FR1, FR2 y FR3 designan las tres regiones estructurales, y CDR1, CDR2, y CDR3 designan las tres regiones de determinación de complementariedad, y H1, H2 y H3 designan las secuencias de unión correspondientes entre las regiones estructurales y CDRs. Las diferencias entre "AT", "Y" y las secuencias de línea germinal V, D o J están en negrita. El número de radicales de aminoácido de línea germinal en las figuras 16-22 es como se describe en
20 Kabat y cols., Sequences of Proteins of Immunological Interest. U.S. Department of Health and Human Services, 4ª ed. (1991).

25 La figura 17 muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada "P" previstas (radicales 2-117) inclusive en la figura 11) con una secuencia de línea germinal de la familia VH3. La secuencia comprende la secuencia de la región V 3-30 y La secuencia JH4 de la región J. La secuencia de la región D es desconocida.

30 En la figura 18 se muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de cadena pesada Fab "S" previstas (radicales 2-124 inclusive en la figura 12) con una secuencia de la línea germinal de la familia VH3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 3-09, la secuencia de la región D 6-19 y la secuencia de las regiones J JH4.

35 La figura 19 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab "AT" prevista (radicales 6-108 inclusive en la figura 5) con una secuencia de línea germinal de la familia Vkappa1. La secuencia de línea germinal comprende la secuencia de la región V 012 y la secuencia de la región J JK1.

40 La figura 20 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab "Y" prevista (radicales 6-108 inclusive en la figura 6) con una secuencia de la línea germinal de la familia Vkappa3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V L6 y la secuencia de la región J JK2.

45 La figura 21 muestra una comparación de la secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab "P" prevista (radicales 5-108 inclusive en la figura 7) con una secuencia de línea germinal de la familia Vkappa3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V A27 y la secuencia de la región J JK4.

La figura 22 muestra una comparación de una secuencia de aminoácido de cadena ligera Fab "S" prevista (radicales 5-112 inclusive en la figura 8) con una secuencia de línea germinal de la familia VL3. La secuencia de la línea germinal comprende la secuencia de la región V 3m y la secuencia de la región J JL2.

50 La figura 23 muestra ensayos de células RAW de aislados "AT" 405, "AT" 406 y "AT" 407. Se fusionó ADNc que codificaba Fab "AT" con ADNc que codificaba las regiones CH1, CH2 y CH3 de IgG1 humano, tal como se describe en el ejemplo 7. Se utilizaron diferentes secuencias líder para producir los aislados resultantes designados "AT" 405, "AT" 406 y "AT" 407. Se incubaron previamente "AT" 405-407 con OPGbp durante 1 hora, a temperatura ambiente antes de la dilución hasta la concentración final de células por pocillo que se muestra en el gráfico. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 40 ng/ml. Los valores fueron de
55 determinaciones por triplicado con barras de error que designaban desviaciones típicas 2 (2 STD).

60 La figura 24 muestra los ensayos de la médula ósea de "AT" 405 y "AT" 407. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU /ml o menos) de "AT" 405 y "AT" 407. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp humana [143-317] durante 1 hora a la temperatura ambiente antes de la adición a las células. La dilución de células final por pocillo para "AT" 405 y "AT" 407 desde la reserva de muestra se indica en el eje de las X. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml.

65 La figura 25 muestra un ensayo de médula ósea de "AT" 406. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de "AT" 406. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración final de células por pocillo de la muestra se indica en el eje de las x. La concentración final de células por pocillo de

OPGbp fue 20 ng/ml.

La figura 26 muestra un ensayo de médula ósea de "S" 435 e "Y" 429. La construcción de "S" 435 e "Y" 429 se describen en el ejemplo 7. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada "S" 435 e "Y" 429. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición de las células. La concentración por pocillo de las células final de la muestra se indica en el eje de las x. La concentración de células por pocillo final de OPGbp fue 20 ng/ml.

La figura 27 presenta un ensayo de médula ósea de "Y" 442 y "P" 444. La construcción y expresión de "Y" 442 y "P" 444 se describe en el ejemplo 7. Se muestran los resultados de una preparación sin endotoxina (0,5 EU/ml o menos) de cada "Y" 442 y "P" 444. Se incubaron previamente las muestras con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración final de células por pocillo se muestra en el eje de las x. La concentración final de células por pocillo de OPGbp fue 20 ng/ml.

La figura 28 presenta el ácido nucleico y la secuencia de aminoácido de OPGbp/DE [153-136] FLAG-murínico.

La figura 29 es un alineamiento de secuencias de aminoácido OPGbp [143-317] humana, OPGbp murínico [158-316] y OPGbp FLAG-murínico [158-316]/DE en la región del bucle DE. Se subrayan los radicales de aminoácido de OPGbp humana introducidos en OPGbp de ratón para genera la molécula OPGbp/DE FLAG-ratón.

La figura 30 es un inmunoensayo de enzima en el que se examina la unión y reactividad del anticuerpo AT a placas recubiertas con OPGbp [143-317] humana, OPGbp [158-316] murínica o OPGbp [158-316]/DE FLAG-murínica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo o dominio de unión a antígeno del mismo como se define en las reivindicaciones 1 y 5.

El término "agente de unión selectivo" se refiere a una molécula que se une preferentemente a OPGbp. Entre los agentes de unión selectivos se incluyen una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, lípido o un compuesto de bajo peso molecular. En un modo de realización preferible, un agente de unión selectivo es un anticuerpo, como por ejemplo anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos CDR-injertados, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) para anticuerpos que se pueden etiquetar en forma soluble o ligada, así como fragmentos, regiones o derivados de los mismos, obtenidos a través de técnicas conocidas, entre las que se incluyen, sin limitarse solo a ellas, segmentación enzimática, síntesis de péptido o técnicas recombinantes. Los agentes de unión selectivos anti-OPGbp de la presente invención pueden unir porciones de OPGbp que inhiben la unión de OPGbp a receptores ODAR.

Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno de la invención se unen selectivamente a OPGbp, es decir, se unen preferentemente a OPGbp con una mayor afinidad de unión con respecto a otros antígenos. Los anticuerpos se pueden unir selectivamente a OPGbp humana, pero también se unen de forma detectable a OPGbp no humana, tal como OPGbp murina. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse selectivamente a OPG no humana, pero también se unen de manera detectable a OPG humana. Alternativamente, los anticuerpos se pueden unir de forma exclusiva a OPGbp humana, sin unión detectable a OPGbp no humana.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido desde una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, reconociendo el anticuerpo monoclonal típicamente un solo epítipo en el antígeno. El término "monoclonal" no está limitado a un método en particular para la obtención de un anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden obtener según el método de hibridoma descrito en Kohler y cols. *Nature* 256, 495 (1975) o se pueden aislar desde bibliotecas de fagos empleando las técnicas que se describen aquí, por ejemplo.

El término "dominio de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno" se refiere a la porción del agente de unión selectiva (tal como una molécula de anticuerpo) que contiene los radicales de aminoácido que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad para el antígeno. Preferiblemente, la región de unión a antígeno será de origen humano. En otros modos de realización, la región de unión a antígeno puede derivarse de otras especies animales, en particular roedores como conejos, ratas o hámster.

El término "epítipo" se refiere a la porción de una molécula que puede ser reconocida y unirse al agente de unión selectivo (por ejemplo un anticuerpo) en una o más de las regiones de unión a antígeno del agente de unión. Los epítopos consisten normalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Se entiende por epítipo de "inhibición y/o neutralización" un epítipo que cuando se une mediante un agente de unión selectivo, tiene como resultado la pérdida de actividad biológica de la molécula o el organismo que contiene el epítipo, in vivo, in vitro, o in situ, más preferiblemente in vivo, incluyendo la

unión de OPGbp a su receptor.

El término “cadena ligera”, cuando se utiliza haciendo referencia a un anticuerpo, se refiere a dos tipos diferentes, denominados kappa (κ) o lambda (λ) en función de la secuencia de aminoácido de los dominios constantes.

El término “cadena pesada” cuando se utiliza haciendo referencia a un anticuerpo se refiere a cinco tipos distintos, denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, en función de la secuencia de aminoácido del dominio constante de cadena pesada. Estos tipos diferentes de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases diferentes de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases de IgG, en concreto IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere a una porción de las cadenas ligera y pesada, típicamente, de aproximadamente 120 a 130 aminoácidos amino-terminales en la cadena pesada y de aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, que difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en las regiones denominadas regiones de complementariedad (CDRs), mientras que las regiones muy conservadas en el dominio variable reciben el nombre de regiones estructurales (FR). Las CDR de las cadenas ligeras y pesadas son las responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno.

El término “región constante” o “dominio constante” se refiere a una porción carboxi terminal de la cadena ligera o pesada que no participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero que presenta varias funciones efectoras, como interacción con el receptor Fc.

El término “OPGbp” o “polipéptido de OPGbp” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido tal como se representa en la figura 4 de la publicación PCT WO /46757, la divulgación de la cual se incorpora por referencia y polipéptidos relacionados. Entre los polipéptidos relacionados se incluyen variantes alélicas; variantes de corte y empalme; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, supresión e inserción; polipéptidos de fusión y homólogos de interespecie. Asimismo, entran dentro de la definición formas solubles de OPGbp, como por ejemplo los radicales 69-317 inclusive de OPGbp humana (tal como se enumera en WO 98/46757), o un subgrupo de los mismos que es suficiente para generar una respuesta inmunológica. En un modo de realización, la OPGbp humana soluble incluye los radicales 140-317 inclusive, 143-317 inclusive, o los fragmentos inmunógenos de los mismos. OPGbp puede ser un polipéptido maduro, tal como se define aquí, y puede tener o no un radical metionina amino terminal, dependiendo del método a través del cual se prepara.

El término “fragmento”, cuando se utiliza en relación con OPGbp o un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Dicho fragmento puede producirse, por ejemplo, por truncado en el término amino, un truncado en el término carboxi, y/o una supresión interna de un radical(es) desde la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos pueden ser el resultado de corte y empalme de ARN alternativo y de la actividad in vivo de proteasa.

El término “variante” cuando se utiliza en relación con OPGbp o en relación con un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de secuencia de aminoácido en comparación con la secuencia nativa o sin modificar. Por ejemplo, una variante de OPGbp puede ser el resultado de uno o más cambios en la secuencia de aminoácido de la OPGbp nativa. También a modo de ejemplo, una variante de un agente de unión selectivo de OPGbp puede ser el resultado de uno o más cambios en la secuencia de aminoácido de un agente de unión selectivo nativo o sin modificar previamente. Las variantes pueden ser naturales, como por ejemplo, variantes alélicas o variantes de corte y empalme, o pueden construirse de forma artificial. Las variantes de polipéptido pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican dichas variantes.

El término “derivado” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un polipéptido o péptido, o a una variante, fragmento o derivado del mismo, que ha sido modificado químicamente. Entre los ejemplos se incluyen la unión covalente de uno o más polímeros, como por ejemplo, polímeros hidrosolubles, unidos a N, o carbohidratos unidos a O, azúcares, fosfatos, y/o otras moléculas similares. Los derivados se modifican de manera diferente a la del péptido o polipéptido natural o de partida, o bien en el tipo o bien en la localización de las moléculas unidas. Los derivados incluyen además la supresión de uno o más grupos químicos que están presentes de manera natural en el péptido o polipéptido.

El término “fusión” cuando se utiliza en relación con OPGbp o un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a la unión de un péptido o polipéptido, o fragmento, variante y/o derivado del mismo, con un péptido o polipéptido heterólogo.

El término “biológicamente activo” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteináceo se refiere a un péptido o a un polipéptido que tiene al menos una actividad característica de OPGbp o un agente de unión selectivo. El agente de unión selectivo de OPGbp puede tener una actividad agonista, antagonista, o neutralizante o de bloqueo en relación con al menos una actividad biológica de OPGbp.

El término “natural” cuando se utiliza en relación con materiales biológicos, como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped y similares, se refiere a las que se encuentran en la naturaleza y no han sido manipuladas por un ser humano.

5 El término “aislado” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que está libre de al menos un polipéptido contaminante que se encuentra en su entorno natural, preferiblemente sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido de mamífero contaminante que pueda interferir con su uso terapéutico o de diagnóstico.

10 El término “maduro” cuando se utiliza en relación con OPGbp o con un agente de unión selectivo proteináceo de OPGbp se refiere a un péptido o polipéptido que carece de una secuencia líder. El término puede incluir también otras modificaciones de un péptido o polipéptido como tratamiento proteolítico del término amino (con o sin una secuencia líder) y/o el término carboxi, segmentación de un polipéptido más pequeño desde un precursor mayor, glucosilación ligada a N y/o ligada a O, y similares.

15 Los términos “cantidad efectiva” y “cantidad terapéuticamente efectiva” cuando se utilizan en relación con un agente de unión selectivo de OPGbp se refiere a una cantidad de un agente de unión selectivo que es útil o necesaria para producir un cambio observable en el nivel de una o más de las actividades biológicas de Opgbp. Dicho cambio puede consistir o bien en un aumento o bien en una disminución del nivel de actividad de OPGbp.

20 El término “sustitución de aminoácido conservadora” se refiere a una sustitución de un radical de aminoácido nativo con un radical no nativo de manera que se produce un efecto pequeño o no se produce ningún efecto en la polaridad o la carga del radical aminoácido en esa posición. Por ejemplo, tiene lugar una sustitución conservadora a partir del reemplazamiento de un radical no polar en un polipéptido con cualquier otro radical no polar. Por otra parte, puede estar sustituido cualquier otro radical nativo en un polipéptido con una alanina, tal como se ha descrito anteriormente para mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham y cols. Science 244, 1081-1085 (1989). En la tabla I se exponen reglas ilustrativas de sustituciones de aminoácido conservadoras.

Tabla 1

30

| Sustituciones de aminoácido conservadoras | | |
|---|-------------------------------------|---------------------------|
| Radicales originales | Ejemplos de sustituciones | Sustituciones preferibles |
| Ala | Val, Leu, Ile | Val |
| Arg | Lys, Gln, Asn | Lys |
| Asn | Gln, His, Lys, Arg | Gln |
| Asp | Glu | Glu |
| Cys | Ser | Ser |
| Gln | Asn | Asn |
| Glu | Asp | Asp |
| Gly | Pro, Ala | Ala |
| His | Asn, Gln, Lys, Arg | Arg |
| Ile | Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina | Leu |
| Leu | Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe | Ile |
| Lys | Arg, Gln, Asn | Arg |
| Met | Leu, Phe, Ile | Leu |
| Phe | Leu, Val, Ile, Ala, Tyr | Leu |
| Pro | Ala | Ala |
| Ser | Thr | Thr |
| Thr | Ser | Ser |
| Trp | Tyr, Phe | Tyr |
| Tyr | Trp, Phe, Thr, Ser | Phe |
| Val | Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina | Leu |

Las sustituciones de aminoácido conservadoras también abarcan radicales de aminoácido naturales que se incorporan típicamente a través de síntesis de péptido química en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Incluyen péptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de fracciones de aminoácido.

35

Las modificaciones conservadoras de la secuencia de aminoácido (y las modificaciones correspondientes para los nucleótidos de codificación) pueden producir polipéptidos OPGbp (y agentes de unión selectivos proteináceos de los mismos) que tienen características funcionales y químicas similares a las de las OPGbp o los agentes de unión selectivos naturales. En contraste, se pueden conseguir sustanciales modificaciones en las características funcionales y/o químicas de OPGbp (y agentes de unión selectivos proteináceos de las mismas) seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal molecular en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los radicales naturales pueden

40

dividirse en grupos dependiendo de las propiedades de la cadena lateral común:

- 1) Hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) Hidrofilicos neutros: Cys, Ser, Thr;
- 3) Ácidos: Asp, Glu;
- 4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) Radicales que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro, y
- 6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

La "identidad o similitud" de dos o más moléculas y/o polipéptidos de ácido nucleico proporciona una medida de parentesco de dos o más secuencias diferentes. El término "identidad" se refiere a aminoácidos que son idénticos en las posiciones correspondientes en dos secuencias de aminoácido diferentes. El término "similitud" se refiere a aminoácidos que o bien son idénticos o bien son sustituciones conservadoras, tal como se ha definido anteriormente, en las posiciones correspondientes en dos secuencias de aminoácido diferentes.

Este grado de identidad o similitud puede calcularse fácilmente a través de métodos conocidos, entre los que se incluyen sin limitarse solo a los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G. eds. Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y cols., SIAM J. Applied Math., 48, 1073 (1988).

Los métodos preferibles para determinar la identidad y/o similitud están diseñados para dar la pareja más grande entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en los programas informáticos disponibles públicamente. Entre los ejemplos de métodos de programación informáticos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias se incluyen, sin limitarse solo a ellos, el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux y cols., Nucleic Acids Research 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y cols., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990). El programa BLAST está públicamente disponible del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y cols., NCB NLM Bethesda, MD). Se puede utilizar también el conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

Polipéptidos OPGbp

Los polipéptidos OPGbp, y fragmentos, variantes y derivados de los mismos, se utilizan como moléculas diana para la detección selectiva y la identificación de agentes de unión selectivos. Cuando es deseable preparar anticuerpos como agentes de unión selectivos, preferiblemente, los polipéptidos de OPGbp son inmunogénicos, es decir, provocan una respuesta inmune cuando se administran a un animal. Alternativamente, cuando se preparan anticuerpos a través de técnicas in vitro, los polipéptidos OPGbp utilizados como moléculas diana son capaces unirse detectablemente a un anticuerpo o dominio de unión a antígeno.

Los polipéptidos OPG se preparan a través de métodos químicos y biológicos. Los métodos biológicos, como expresión de secuencias de ADN que codifican OPGbp recombinante son conocidas en la especialidad (ver por ejemplo Sambrook y cols., supra). Los métodos de síntesis químicos, como los que se exponen en Merrifield y cols., J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963), Houghten y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82:5132 (1985), y Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) pueden utilizarse también para preparar los polipéptidos OPGbp. Dichos polipéptidos pueden sintetizarse con o sin metionina en el término amino. Los polipéptidos OPGbp sintetizados químicamente, o fragmentos o variantes de los mismos, pueden oxidarse aplicando los métodos expuestos en los documentos de referencia para formar puentes de disulfuro. Los polipéptidos OPGbp de la invención preparados a través de la síntesis química tendrán al menos una actividad biológica comparable con los polipéptidos OPGbp correspondientes producidos a través de métodos recombinantes o purificados desde fuentes naturales.

Los polipéptidos OPGbp pueden obtenerse por aislamiento desde muestras biológicas como por ejemplo tejidos y/o fluidos de origen en los que se encuentran los polipéptidos de OPGbp de forma natural. Las fuentes para los polipéptidos de OPGbp pueden ser de origen humano o no humano. El aislamiento de los polipéptidos de OPGbp naturales puede llevarse a cabo aplicando los métodos conocidos en la especialidad, como separación por electroforesis seguido de electroelución, diversos tipos de cromatografía (afinidad, inmunoafinidad, tamices moleculares, y/o intercambio de iones), y/o cromatografía de líquidos a alta presión. La presencia del polipéptido de OPGbp durante la purificación puede vigilarse utilizando, por ejemplo, un anticuerpo preparado contra polipéptido de OPGbp producido por recombinación, o fragmentos de péptido del mismo.

Los polipéptidos incluyen polipéptidos de OPGbp aislados y polipéptidos relacionados con los mismos, incluyendo fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión y derivados, tal como se han definido antes. Los fragmentos de OPGbp de la invención pueden ser el resultado de truncados en el término amino (con o sin una secuencia líder), truncados en el término carboxi y/o supresiones internas en el polipéptido. Dichos fragmentos de polipéptido de OPGbp pueden comprender opcionalmente un radical metionina en el terminal amino. Los polipéptidos serán inmunogénicos en el sentido de que serán capaces de provocar una respuesta de anticuerpo.

Las variantes de polipéptido de OPGbp pueden incluir una o más sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácido, en comparación con la secuencia de aminoácido OPGbp nativa. Las sustituciones de aminoácido pueden ser conservadoras, tal como se ha definido antes, o no conservadoras o una combinación de las mismas. Las variantes pueden tener adiciones de radicales de aminoácido o bien en el término carboxi o bien en el término amino (pudiendo comprender o no el término amino una secuencia líder). Entre las variantes de glucosilación de OPGbp se incluyen variantes en las que el número y/o tipo de sitios de glucosilación ha sido alterado en comparación con un polipéptido OPGbp. Las variantes de glucosilación OPGbp pueden comprender un número mayor o menor de sitios de glucosilación unidos en N en comparación con OPGbp nativo. Se ilustran también variantes de glucosilación de OPGbp que comprenden un reordenamiento de cadenas de carbohidrato unidas en N en las que se eliminan uno o más sitios de glucosilación ligados en N (típicamente los que se dan de forma natural) y se crea uno o más nuevos sitios ligados en N. Las variantes de cisteína de OPGbp comprenden un mayor número o alternativamente un menor número de radicales de cisteína en comparación con OPGbp nativa. En un modo de realización, se suprimen o se sustituyen con otro aminoácido uno o más radicales de cisteína (v.g., serina). Las variantes de cisteína de OPGbp pueden mejorar la recuperación de la OPGbp biológicamente activa favoreciendo repliegamiento de OPGbp en una conformación biológicamente activa tras el aislamiento desde un estado desnaturalizado.

La preparación de variantes de polipéptido de OPGbp se encuentra dentro del nivel de especialización en este campo. En uno de los métodos, se puede introducir una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácido en OPGbp nativo, reteniendo la variante OPGbp la estructura nativa de OPGbp y/o al menos una de las actividades biológicas. Uno de los métodos consiste en comparar secuencias de polipéptidos de OPGbp a partir de una variedad de diferentes especies con el fin de identificar regiones de identidad y/o similitud relativamente alta y baja. Puede apreciarse que las regiones de un polipéptido OPGbp que tienen una identidad y/o similitud relativamente baja tienen menor probabilidad de ser esenciales para la estructura y actividad y por tanto pueden ser más tolerantes para alteraciones de aminoácido, especialmente, las que no son conservadoras. Debe apreciarse asimismo que incluso en regiones relativamente conservadas, se pueden introducir sustituciones de aminoácido conservadoras al mismo tiempo que se retiene la actividad.

En otro modo de realización, se pueden utilizar las relaciones estructura-función para identificar radicales en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. Por ejemplo, se pueden comparar los radicales de aminoácido conservados entre OPGbp y otros miembros de la familia de factor de necrosis de tumor para los cuales están disponibles análisis de estructura-función y, en función de dicha comparación, predecir qué radicales de aminoácido en OPGbp son importantes para la actividad o la estructura. Las personas especializadas en la técnica podrán elegir sustituciones de aminoácido similares químicamente para dichos radicales de aminoácido importantes de OPGbp previstos.

En otro método más, se puede adoptar un análisis de una estructura secundaria o terciaria de OPGbp (ya se determine por difracción de rayos x de cristales de OPGbp o por métodos de predicción de estructura) para determinar la localización de radicales de aminoácido específicos en relación con estructuras reales o predichas dentro de un polipéptido OPGbp. Empleando esta información, se pueden introducir cambios de aminoácido de un modo que busque retener lo más posible la estructura secundaria y/o terciaria de un polipéptido de OPGbp.

En otro método más, se pueden analizar los efectos de la alteración de aminoácidos en posiciones específicas de forma experimental introduciendo sustituciones de aminoácido y analizando los polipéptidos de OPGbp alterados para determinar la actividad biológica utilizando los ensayos aquí descritos. Son particularmente adecuadas técnicas como la mutagénesis de exploración de alanina (Cunningham y cols., supra) para este método. Se pueden analizar convenientemente muchas secuencias alteradas introduciendo muchas sustituciones en diversas posiciones de aminoácido en la OPGbp y realizando la detección selectiva de la población de polipéptidos alterados como parte de la biblioteca de despliegue en fagos. Utilizando este método, se pueden determinar fácilmente las regiones de un polipéptido de OPGbp que son esenciales para la actividad.

Los métodos mencionados son útiles para generar variantes de OPGbp que retienen la estructura nativa. Por consiguiente, los anticuerpos producidos contra estas variantes tienen probabilidad de reconocer un determinante estructural nativo, o epítipo, de OPGbp y también tienen probabilidad de unirse a OPGbp nativa. No obstante, en algunos casos, puede ser deseable producir variantes de OPGbp que no retienen la estructura de OPGbp nativa o que quedan sin rellenar parcial o completamente. Los anticuerpos producidos contra dichas proteínas reconocerán epítopos enterrados en OPGbp.

La invención ilustra también polipéptidos de fusión de OPGbp que comprenden polipéptidos de OPGbp, y

fragmentos, variantes y derivados de los mismos, fusionados con una proteína o péptido heterólogo. Las proteínas y péptidos heterólogos incluyen, sin limitarse solo a ellos, un epítipo que permite la detección y/o aislamiento de un polipéptido de fusión de OPGbp; una proteína de receptor de transmembrana o una porción del mismo, como por ejemplo un dominio extracelular, o una transmembrana y un dominio intracelular; un ligando o una porción del mismo que se une a una proteína de receptor de transmembrana; una enzima o una porción de la misma que es catalíticamente activa; un proteína o péptido que promueve la oligomerización, como un dominio de cremallera de leucina; y una proteína o péptido que aumenta la estabilidad, como por ejemplo una región constante de inmunoglobulina. Se puede fusionar un polipéptido de OPGbp consigo mismo o con un fragmento, variante o derivado del mismo. Las fusiones pueden realizarse o bien en el término amino o bien en el término carboxi de un polipéptido de OPGbp, y pueden ser directas sin molécula ligadora o adaptadora. Puede designarse una molécula ligadora o adaptadora también con un sitio de segmentación para una endonucleasa de restricción de ADN o para una proteasa para permitir la separación de las fracciones fundidas.

En un polipéptido de OPGbp, el fragmento, la variante y/o el derivado pueden fusionarse a una región Fc de IgG humana. En un ejemplo, se puede fusionar una región CH2, CH3 y bisagra de IgG humana tanto en el término N como en el término C de los polipéptidos OPGbp aplicando los métodos conocidos entre las personas especializadas en la técnica. En otro ejemplo, se puede fusionar una porción de una región bisagra y regiones CH2 y CH3. El polipéptido de fusión Fc OPGbp así producido puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A. Por otra parte, se ha observado que los péptidos y proteínas fusionadas con una región Fc presentan una duración media sustancialmente mayor in vivo en relación con su contrapartida sin fusionar. Asimismo, una fusión con la región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc natural, o puede alterarse para mejorar determinadas calidades, como por ejemplo calidades terapéuticas, tiempo de circulación, reducir la agregación, etc.

Los derivados de polipéptido de OPGbp son composiciones de polipéptido OPGbp modificados químicamente en los que el polipéptido OPGbp está unido a un polímero. El polímero seleccionado es típicamente hidrosoluble, de manera que la proteína a la que se une no precipita en un entorno acuoso, como es el entorno fisiológico. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o sin ramificar. Se incluyen dentro del alcance de los polímeros de polipéptido de OPGbp una mezcla de polímeros. Para el uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

El polímero hidrosoluble o mezcla de ellos puede consistir por ejemplo en polietilén glicol (PEG), monometoxi-polietoxilén glicol, dextrano (como por ejemplo dextrano de bajo peso molecular, por ejemplo de aproximadamente 6 kD), celulosa, y otros polímeros a base de carbohidratos, poli(N-vinil pirrolidona), polietilén glicol, homopolímeros de propilén glicol, un co-polímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polialcoholes etilados (v.g., glicerol) y un polialcohol vinílico.

Un polímero hidrosoluble es polietilén glicol. Tal como se utiliza aquí, se pretende que polietilén glicol abarque cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para formar derivados de otras proteínas, como por ejemplo mono- (C₁-C₁₀) alcoxi, o ariloxi-polietilén glicol. La presente invención abarca asimismo moléculas de reticulación de PEG bifuncionales que se pueden utilizar para preparar multímeros de OPGbp unidos covalentemente.

Los métodos para preparar polipéptidos de OPGbp formados por derivación química son conocidos dentro de la especialidad. A modo de ejemplo, la formación de derivados de polipéptidos de OPGbp con PEG puede llevarse a cabo utilizando los procedimientos descritos en Francis y cols., Focus on Growth Factors, 3, 4-10 (1992); EP 0.154.316; EP 0.401.384; y patente EE.UU. N° 4.179.337. En un modo de realización preferible, un derivado de polipéptido de OPGbp tendrá una sola fracción PEG en el término amino. Ver la patente EE.UU. N° 5.234.784.

Los derivados de polipéptido de OPGbp divulgados en el presente documento pueden presentar una potenciación o reducción de al menos una actividad biológica de OPGbp en comparación con un polipéptido sin modificar, o pueden presentar una mayor o menor duración media o estabilidad.

Agentes de unión selectivos de OPGbp

Los polipéptidos de OPGbp, y los fragmentos, variantes y derivados de los mismos, se pueden utilizar para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp. Tal como se ha definido antes, un agente de unión selectivo de OPGbp abarca agentes de unión tanto proteináceos como no-proteináceos, y en un modo de realización preferible de la presente invención, el agente de unión selectivo es proteináceo. El agente de unión selectivo puede ser un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a OPGbp, preferiblemente OPGbp humana. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos agonistas, que potencian el nivel de al menos una actividad biológica de OPGbp; o anticuerpos antagonistas, que disminuyen el nivel de al menos una actividad biológica de OPGbp. Los anticuerpos antagonistas de OPGbp pueden recibir el nombre también de anticuerpos de inhibición o neutralizantes de OPGbp.

Tal como se describe en los ejemplos a continuación, se han identificado anticuerpos y los dominios de unión a antígeno de OPGbp que inhiben al menos una actividad de OPGbp. Los modos de realización de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia Fab de cadena pesada, tal como se muestra en cualquiera de

las figuras 9, 10, 11 o 12 y que comprenden además una secuencia de cadena ligera kappa o lambda. Las secuencias Fab de cadena ligera pueden ser tal como se representa en las figuras 5, 6, 7, u 8. Por ejemplo, el anticuerpo "AT" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 5 y 9, respectivamente; el anticuerpo "Y" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 6 y 10, respectivamente; el anticuerpo "S" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 7 y 11, respectivamente; y el anticuerpo "P" tiene secuencias de cadena ligera y pesada en las figuras 8 y 12, respectivamente. Los anticuerpos de la invención comprenden además una región Fc humana a partir de un cualquier isotipo, ya sea IgG, IgM, IgA, IgE o IgD. Preferiblemente, la región Fc es de IgG humano, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

La invención proporciona asimismo anticuerpos o dominios de unión a antígeno que comprenden fragmentos, variantes, o derivados de las secuencias Fab divulgadas en el presente documento. Los fragmentos incluyen dominios variables de secuencias Fab de cadena tanto ligera como pesada que se unen típicamente con dominios constantes ligero y pesado. Las variantes incluyen anticuerpos que comprenden secuencias Fab de cadena ligera que son idénticos o similares en al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, a las secuencias Fab o los dominios variables correspondientes, en cualquiera de las figuras 5-8, o anticuerpos que comprenden secuencias Fab de cadena pesada, o los dominios variables correspondientes que son idénticos o similares en al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % a las secuencias Fab en cualquiera de las figuras 9 a 12. Los anticuerpos pueden asociarse típicamente con regiones constantes de las cadenas pesada y ligera para formar anticuerpos de longitud completa.

Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno, y los fragmentos, variantes y derivados de los mismos, de la invención retendrán la capacidad para unirse selectivamente a un polipéptido de OPGbp humana. En un modo de realización, un anticuerpo se unirá a un polipéptido de OPGbp con una constante de disociación (KD) de aproximadamente 1 nM o menos, o alternativamente 0,1 nM o menos, o alternativamente 10 pM o menos o alternativamente menos de 10 pM. En el ejemplo 8, se observó que el anticuerpo "AT" se une a OPGbp con un KD de aproximadamente 0,33 a 0,43 nM.

Entre los anticuerpos de la invención se incluyen anticuerpos biespecíficos, de cadena única, humanos completamente, humanizados, quiméricos, recombinantes, monoclonales, policlonales monoespecíficos y/o policlonales. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen las porciones de un anticuerpo anti-OPGbp que se unen a un epítipo en un polipéptido OPGbp. Entre los ejemplos de dichos fragmentos se incluyen fragmentos Fab F(ab'), F(ab)2, Fv, sFv. Los anticuerpos pueden generarse por segmentación enzimática de anticuerpos de longitud completa o a través de técnicas de ADN recombinante, como expresión de plasmidios recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de anticuerpo.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados con un antígeno. Un antígeno es una molécula o una porción de una molécula que es capaz de unirse mediante un anticuerpo que es capaz adicionalmente de inducir a un animal a producir anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos. Se pretende que la reacción específica antes referida indique que el antígeno reacciona, de una manera altamente selectiva, con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser evocados por otros antígenos.

Los anticuerpos policlonales dirigidos hacia un polipéptido de OPGbp son producidos generalmente en animales (v.g., conejos o ratones) a través de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de OPGbp y un adyuvante. De acuerdo con la invención, puede ser útil conjugar un polipéptido de OPGbp, o una variante, fragmento de derivado del mismo con una proteína vehículo que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, como por ejemplo hemocianina de lapa californiana, suero, albúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja. Asimismo, se utilizan agentes de agregación como alum para mejorar la respuesta inmune. Tras la inmunización, se sangra a los animales y se realiza el ensayo del suero para determinar la valoración de anticuerpo anti-OPGbp.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) contienen una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, conteniendo dicha población sitios de unión a epítipo sustancialmente similares. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. Se puede cultivar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención in vitro, in situ, o in vivo. La producción de valoraciones más altas in vivo o in situ es un método de producción preferible.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia OPGbp se producen aplicando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas de células continuas en cultivo. Entre los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales se incluyen métodos de hibridoma de Kohler y cols., *Nature*, 256, 495-497 (1975), y el método de hibridoma de células B humanas, Kozbor, J. *Immunol.* 133, 3001 (1984); Brodeur y cols., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Entre los agentes de unión selectivos anti-OPGbp preferibles se incluyen anticuerpos monoclonales que inhiben

- parcial o completamente la unión de OPGbp humana con su receptor cognado, ODAR, o un anticuerpo que tiene sustancialmente las mismas características de unión específicas, así como fragmentos y regiones de los mismos. Los métodos preferibles para determinar especificidad y afinidad de anticuerpo monoclonal a través de inhibición competitiva pueden encontrarse en Harlow y cols. *Antibodies; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan y cols., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.*, 92: 589-601 (1983).
- Además, se proporcionan líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales que son reactivos con polipéptidos de OPGbp.
- Los anticuerpos quiméricos son moléculas en las que varias porciones diferentes se derivan de diferentes especies animales, como por ejemplo las que tienen una región variable derivada de anticuerpo monoclonal murínico y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos se utilizan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos de producción, por ejemplo, cuando los anticuerpos monoclonales murínicos tienen unos rendimientos más altos desde hibridomas pero una mayor inmunogenicidad en seres humanos, como por ejemplo humana/murínica, se utilizan anticuerpos monoclonales quiméricos.
- Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos dentro de la especialidad. Cabilly y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81: 3273-3277 (1984); Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6855 (1984); Boulianne y cols., *Nature*, 312: 643-646 (1984); Neuberger y cols., *Nature*, 314: 268-270 (1985); Liu y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84: 3439-3443 (1987); y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).
- Por ejemplo, se pueden utilizar los anticuerpos monoclonales quiméricos de la invención como agente terapéutico. En dicho anticuerpo quimérico, una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a la secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpos en particular, al mismo tiempo que el resto de la cadena(s) es idéntico u homólogo a la secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (ver la patente EE.UU. N° 4.816.567; Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 6851-6855 (1985).
- Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada a través de puentes de disulfuro con una cadena L quimérica. El anticuerpo quimérico divalente es tetrámero (H₂L₂) formado por dos dímeros HL asociados a través de al menos un puente de disulfuro. Puede producirse también un anticuerpo quimérico polivalente, por ejemplo, empleando una región C_H que se agrega (v.g., desde una cadena H de IgM o una cadena μ).
- Los anticuerpos murínicos y quiméricos, fragmentos y regiones de la presente invención pueden comprender cadenas de inmunoglobulina Ligeras (L) y/o pesadas (H) individuales. Una cadena H quimérica comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena H de un anticuerpo no humano específico para OPGbp, que está unido a al menos una porción de una región C de cadena H humana (C_H), como por ejemplo CH₁ o CH₂.
- Una cadena L quimérica según la presente invención comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico para OPGbp, unido a al menos una porción de una región C de cadena L humana (C_L).
- Los agentes de unión selectivos, como por ejemplo anticuerpos, fragmentos, o derivados, que tienen cadenas H y cadenas L quiméricas de la misma o diferentes especificidad de unión a región variable, pueden prepararse también a través de la asociación apropiada de cadenas de polipéptido individuales, con arreglo a etapas de método conocidas, v.g., con arreglo a Ausubel, y cols., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, N.Y. (1993), y Harlow y cols., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Con este método, se cultivan por separado huéspedes que expresan cadenas H quiméricas (o sus derivados) de huéspedes que expresan cadenas L quiméricas (o sus derivados), y se recuperan por separado las cadenas de inmunoglobulina y después se asocian. Alternativamente, se pueden co-cultivar los huéspedes y dejar asociar las cadenas espontáneamente en el medio de cultivo, seguido de la recuperación de la inmunoglobulina ensamblada, fragmento o derivado.
- A modo de ejemplo, es preferible que la región de unión a antígeno del agente de unión selectivo (por ejemplo un anticuerpo quimérico) de la presente invención se derive de un anticuerpo no humano específico para OPGbp humana. Las fuentes preferibles para ADN que codifica dicho anticuerpo no humano incluyen líneas celulares que producen anticuerpos, como por ejemplo líneas celulares de híbrido conocidas comúnmente como hibridomas.
- La invención proporciona también fragmentos, variantes y derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp, habiéndose definido en el presente documento los términos "fragmentos", "variantes", "derivados" y fusiones". La

invencción abarca fragmentos, variantes, derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp que son funcionalmente similares a los anticuerpos anti-OPGbp sin modificar, es decir, que retienen al menos una de las actividades del anticuerpo sin modificar. Además de las modificaciones que se han indicado, también se incluye la adición de secuencias genéticas que codifican proteínas citotóxicas, como toxinas vegetales y bacterianas. Los fragmentos, variantes, derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp pueden producirse a través de cualquiera de los huéspedes de la presente invencción.

Entre los fragmentos adecuados se incluye por ejemplo Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, desaparecen más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión de tejido no específico que un anticuerpo intacto. Ver Wahl y cols., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983). Estos fragmentos se producen desde anticuerpos intactos empleando métodos conocidos en la especialidad, como por ejemplo segmentación proteolítica con enzimas como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). La identificación de estas regiones y/o epítomos de unión a antígeno reconocidas por anticuerpos monoclonales de la presente invencción proporciona la información necesaria para generar anticuerpos monoclonales adicionales con características de unión similares y utilidad de diagnóstico y terapéutica que tienen parangón con los modos de realización de esta solicitud.

La invencción proporciona anticuerpos o dominios de unión a antígeno anti-OPGbp, que reconocen y se unen para inhibir y/o neutralizar epítomos en OpGbp. Como resultado de esta unión, un anticuerpo anti-OPGbp puede inhibir parcial o completamente la unión de OPGbp a su receptor o pueden inhibir parcial o completamente la formación de osteoclasto, la resorción ósea y/o la pérdida de hueso. Más en particular, la invencción proporciona anticuerpos anti-OPGbp que reconocen y se unen a un epítomo que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos de la región DE de OPGbp (un "epítomo DE"). Una región DE de OPGbp se extiende por aproximadamente las regiones de lámina D y E beta y la secuencia bucle que interviene (un "bucle DE"). La región DE en OPGbp humana comprende desde aproximadamente el radical de aminoácido 212 hasta aproximadamente el radical de aminoácido 250 inclusive (ver figura 29).

Si bien se contempla que un anticuerpo anti-OPGbp, o un dominio de unión a antígeno, se puede unir en cualquier ubicación dentro de una región DE, una forma de realización preferible es un anticuerpo anti-OPGbp que se une a al menos parte de un bucle DE. El bucle DE en OPGbp humana abarca aproximadamente cinco aminoácidos y se ubica en aproximadamente los radicales 230-234 inclusive. El bucle DE en OPGbp humana tiene la secuencia DLATE. No obstante, la secuencia de aminoácidos y los extremos del bucle DE de OPGbp humana son meramente ilustrativos entendiéndose que los bucles DE podrían tener secuencias y extremos que varían de los de OPGbp humana. La invencción abarca anticuerpos que se unen a dichos bucles DE variables.

Tal como se muestra en la figura 10, la introducción de la secuencia DLATE en el bucle DE correspondiente de OPGbp murínica tuvo como resultado la unión de anticuerpo "AT", mientras que el anticuerpo no tuvo afinidad detectable para OPGbp murínica con la secuencia de bucle DE nativa hasta una concentración de anticuerpo de aproximadamente 2 µg/ml. En otro modo de realización, el anticuerpo anti-OPGbp se une a la secuencia de aminoácidos DLATE en OPGbp humana, o a una porción de dicha secuencia. En otro modo de realización, un anticuerpo anti-OPGbp, o dominio de unión a antígeno, se une a OPGbp murínico que comprende las sustituciones de aminoácido S229D, V230L, P231A y D233E, pero no se une a OPGbp murínico que carece de dichas sustituciones en condiciones similares.

Si bien los anticuerpos de la invencción se caracterizan en parte por las secuencias de aminoácido en OPGbp a las que se unen, las personas especializadas en la técnica entenderán y apreciarán que un epítomo DE en OPGbp reconocido por un anticuerpo comprende típicamente una estructura tridimensional que puede implicar aminoácidos fuera de la región DE. En una representación lineal de una secuencia OPGbp, los aminoácidos que comprenden el epítomo DE pueden estar distantes de la región DE; pero en una estructura tridimensional de OPGbp, los aminoácidos del epítomo DE estarán probablemente en proximidad con la región DE. Por lo tanto, debe entenderse que la unión de un anticuerpo anti-OPGbp con un epítomo DE puede implicar aminoácidos distintos a los de la región DE. No obstante, se ha demostrado que los radicales de aminoácido en el bucle DE, especialmente algunos o todos los radicales de la secuencia DLATE, participan en la unión de anticuerpos a OPGbp y la inhibición de la actividad de OPGbp.

Se proporcionan también las variantes de agentes de unión selectivos. En un modo de realización, las variantes de anticuerpos y dominios de unión a antígeno comprenden cambios en las secuencias de aminoácido de cadena ligera y/o pesada que son naturales o que se introducen por ingeniería in vitro de secuencias nativas utilizando técnicas de ADN recombinante. Las variantes naturales incluyen variantes "somáticas" que se generan in vivo en las secuencias de nucleótido de línea germinal correspondiente durante la generación de una respuesta de anticuerpo a un antígeno extraño. Las variantes codificadas por mutaciones somáticas en secuencias de cadena ligera y pesada variables de línea germinal que generan los ejemplos de Fab de la presente invencción en las secuencias se muestran en la figuras 16 y 19 para Fab "AT" Figuras 16 y 20 para Fab "Y", figuras 17 y 21 para Fab "P" y figuras 18 y 22 para Fab "S".

Las variantes para anticuerpos y dominios de unión a antígeno anti-OPGbp también se preparan por técnicas de

mutagénesis conocidas en la especialidad. En un ejemplo, se puede introducir cambios de aminoácido aleatoriamente en toda la región de codificación de anticuerpo y se puede realizar la detección selectiva de las variantes resultantes para determinar la actividad deseada, como por ejemplo afinidad de unión para OPGbp. Alternativamente, se pueden introducir cambios de aminoácido en regiones seleccionadas de anticuerpo OPGbp, como por ejemplo CDRs de cadena ligera y/o pesada, y regiones estructurales, y se puede realizar la detección selectiva de los anticuerpos resultantes para determinar la unión a OPGbp o alguna otra actividad. Los cambios de aminoácido abarcan una o más sustituciones de aminoácido en una CDR, que abarcan desde una sola diferencia de aminoácido y la introducción de todas las permutaciones posibles de aminoácidos dentro de una CDR dada, como CDR3. En otro método, la contribución de cada uno de los radicales dentro de una CDR a la unión de OPGbp puede valorarse sustituyendo al menos un radical dentro de la CDR con alanina (Lewis y cols., Mol. Immunol. 32, 1065-1072 (1995)). Los radicales que no son óptimos para la unión con OPGbp pueden cambiarse después con el fin de determinar la secuencia más óptima. También quedan abarcadas las variantes generadas por inserción de aminoácidos para aumentar el tamaño de una CDR, como por ejemplo CDR3. Por ejemplo, la mayoría de las secuencias CDR3 de cadena ligera son de 9 aminoácidos de longitud. Las secuencias CDR3 de cadena ligera en un anticuerpo que tienen una longitud inferior a nueve radicales pueden optimizarse para la unión con OPGbp a través de la inserción de aminoácidos apropiados para aumentar la longitud de la CDR.

En un modo de realización, las variantes de anticuerpo o dominio de unión a antígeno comprenden uno o más cambios de aminoácido en una o más de las CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada o ligera y, opcionalmente, una o más de las regiones estructurales FR1, FR2 o FR3 de cadena pesada o ligera.

Los cambios de aminoácido comprenden sustituciones, supresiones y/o inserciones de radicales de aminoácido. Entre los ejemplos de variantes se incluye una variante de la región variable de cadena pesada de "AT" con uno o más cambios de aminoácido en la secuencia NYAIH (SEQ ID NO: 13); WINAGNGNTIKFSQKFQF (SEQ ID NO: 16); o DSSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19), o una variante de la región variable de cadena ligera de "AT" con uno o más cambios de aminoácido en las secuencias RASQSISRYLN (SEQ ID NO: 01); GASLQS (SEQ ID NO: 05); o QHTRA (SEQ ID NO: 09). Las variantes de la región variable de cadena pesada y ligera de "AT" que se han mencionado comprenden además uno o más cambios de aminoácido en las regiones estructurales. En un ejemplo, se pueden introducir uno o más cambios de aminoácido para sustituir un radical estructural mutado somáticamente con el radical de línea germinal en esa posición. Cuando los cambios de aminoácido mencionados son sustituciones, los cambios pueden consistir en sustituciones conservadoras o no conservadoras.

Los ejemplos 11 y 12 proporcionan variantes de la región CDR3 de cadena ligera y pesada del anticuerpo AT. En un modo de realización, la invención proporciona variantes tanto en la SEQ ID NO: 19 (CDR3 de cadena pesada) como en la SEQ ID NO: 9 (CDR3 de cadena ligera), de manera que los anticuerpos o dominios de unión a antígeno resultantes se unen selectivamente a una proteína de unión OPG. En un modo de realización, la OPGbp es OPGbp humana.

La invención proporciona anticuerpos anti-OPGbp que comprenden cadenas pesadas variables y ligeras variables y que comprenden además una región CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

XSSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 80);
 DXSNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 81);
 DSXNMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 82);
 DSSXMVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 83);
 DSSNXVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 84);
 DSSNMXVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 85);
 DSSNMVXVRGBIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 86);
 DSSNMVRXIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 87);
 DSSNMVRGBXIIAYYFDY (SEQ ID NO: 88);
 DSSNMVRGBIXIAYYFDY (SEQ ID NO: 89);
 DSSNMVRGBIXAYYFDY (SEQ ID NO: 90);
 DSSNMVRGBIIIYYFDY (SEQ ID NO: 91);
 DSSNMVRGBIIIAXYFDY (SEQ ID NO: 92);
 DSSNMVRGBIIIAYXFDY (SEQ ID NO: 93);
 DSSNMVRGBIIIAYYXDY (SEQ ID NO: 94);
 DSSNMVRGBIIIAYYFX (SEQ ID NO: 95) y
 DSSNMVRGBIIIAYYFDX (SEQ ID NO: 96);

pudiendo ser X el radical aminoácido que es diferente del radical de aminoácido normalmente residente en esa posición, y uniéndose selectivamente el anticuerpo resultante a una OPGbp.

La invención proporciona también anticuerpos anti-OPGbp que comprenden cadenas pesadas variables y ligeras variables y que comprenden además una secuencia CDR3 de cadena ligera que ha sido aumentada desde cinco aminoácidos hasta nueve aminoácidos. Más en particular, la secuencia CDR3 de cadena ligera se selecciona del

grupo que consiste en:

QHTXXXXRA (SEQ ID NO: 97)

representando la primera aparición de X desde la izquierda a la derecha cualquier radical aminoácido distinto a arginina, representando la segunda, tercera y cuarta aparición de X cualquier radical aminoácido, pero preferiblemente alanina, y uniéndose selectivamente el anticuerpo resultante a una OPGbp. En otro modo de realización de la invención, se selecciona una secuencia CDR de cadena ligera del grupo que consiste en:

QHTXAAARA (SEQ ID NO: 98)

siendo X cualquier radical aminoácido distinto a arginina.

10 En otro modo de realización, las variantes de anticuerpo de la invención comprenden cadenas V_L que tienen una secuencia CDR1 como en SEQ ID NO: 1 y una secuencia CDR2 como en SEQ ID NO: 5, y comprenden cadenas V_H que tienen cadenas V_H que tienen una secuencia CDR1 como en SEQ ID NO: 13 y una secuencia CDR2 como en SEQ ID NO: 16. En otro modo de realización, las variantes de anticuerpo comprenden una cadena V_L desde el anticuerpo "AT" con las variantes CDR3 de cadena ligera antes mencionadas y una cadena V_H desde el anticuerpo "AT" con las variantes CDR3 de cadena pesada antes mencionadas. Pueden prepararse variantes también "revolviendo la cadena" tanto de cadenas ligeras como pesadas (Marks y cols., *Biotechnology* **10**, 779-783 (1992)). Típicamente, se combina una sola cadena ligera (o pesada) con una biblioteca que tiene un repertorio de cadenas pesadas (o ligeras) y se realiza la detección selectiva de la población resultante para una actividad deseada, como por ejemplo la unión a OPGbp. Esta técnica permite la detección selectiva de una muestra más grande de diferentes cadenas pesadas (o ligeras) en combinación con una sola cadena ligera (o pesada) con respecto a lo que es posible con bibliotecas que comprenden repertorios tanto de cadenas pesadas como ligeras.

25 Los agentes de unión selectivos de la invención pueden ser biespecíficos. Los agentes de unión selectivos biespecíficos de la presente invención pueden tener varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se parecen a anticuerpos simples (o fragmentos de anticuerpo) pero tienen dos sitios de unión de antígeno diferentes (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir a través de técnicas químicas (ver v.g., Kranz y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:5807 (1981), a través de técnicas de "polidoma" (ver patente EE.UU. N° 4.474.893 para Reading) o a través de técnicas de ADN recombinante.

30 Los agentes de unión selectivos de la invención también pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos consisten en dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión a anticuerpo (Fab) unidos en combinación, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

35 La invención se refiere también a anticuerpos "humanizados". Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos dentro de la especialidad. Generalmente, un anticuerpo humanizado lleva uno o más radicales de aminoácido introducidos en un anticuerpo humano desde una fuente que es no humana. En general, los radicales no humanos estarán presentes en CDRs. La humanización puede llevarse a cabo siguiendo métodos conocidos dentro de la especialidad (Jones y cols., *Nature*, **321**, 522-525 (1986); Riechmann y cols., *Nature*, **332**, 323-327 (1988); Verhoeven y cols., *Science* **239**, 1534-1536 (1988)), por sustitución de regiones determinantes de complementariedad de roedores (CDRs) por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

45 Los agentes de unión selectivos de la invención, incluyendo anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados, se pueden producir a través de métodos recombinantes conocidos dentro de la especialidad. Se introducen los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos en células huésped y se expresan utilizando los materiales y procedimientos aquí descritos y que se conocen en la especialidad. En un modo de realización preferible, los anticuerpos se producen en células huésped de mamífero, como por ejemplo células CHO. Los anticuerpos totalmente humanos se pueden producir a través de la expresión de ADN recombinante transfectado en células huésped o a través de la expresión en células de hibridoma tal como se ha descrito anteriormente.

50 Las técnicas para crear versiones de ADN recombinante de las regiones de unión a antígeno de las moléculas de anticuerpo que bordean la generación de anticuerpos monoclonales entran dentro del alcance de la práctica de la presente invención. Para hacerlo así, se extraen las moléculas de ARN mensajeras específicas de anticuerpo desde células del sistema inmune tomadas de un animal inmunizado, y se transcriben en ADN complementario (ADNc). El ADNc se clona a continuación en un sistema de expresión bacteriana. Un ejemplo de esta técnica, adecuada para la práctica de la presente invención utiliza un sistema de vector lambda de bacteriófago que tiene una secuencia líder que hace que la proteína Fab expresada se desplace al espacio periplásmico (entre la membrana de célula bacteriana y la pared celular) o que sea secretada. Se puede generar rápidamente y detectar selectivamente un gran número de fragmentos Fab funcionales para los que se une el antígeno. Dichos agentes de unión selectivos de OPGbp (fragmentos Fab que se unen específicamente para un polipéptido OPGbp) entran específicamente dentro del alcance del término "anticuerpo" tal como se ha definido, explicado y reivindicado en el presente documento.

65 Entran también dentro del marco de la invención las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos por corte y empalme de genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad para antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada, como por ejemplo la capacidad de activar complemento humano y mediar ADCC. (Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**: 6851 (1984); Neuberger y cols. *Nature*, **312**: 604 (1984)). Un ejemplo es el reemplazamiento de una región Fc

con la de un isotipo diferente. Los agentes de unión selectivos, como son los anticuerpos producidos a través de esta técnica, entran dentro del marco de la presente invención.

En un modo de realización preferible de la invención, los anticuerpos anti-OPGbp son anticuerpos completamente humanos. Por consiguiente, entra dentro del alcance de la invención anticuerpos que se unen a polipéptidos de OPGbp y que están codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas naturales de la secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana, y fragmentos, variantes de síntesis, derivados y fusiones de los mismos. Dichos anticuerpos pueden producirse a través de cualquiera de los métodos conocidos en la especialidad. Entre los ejemplos de métodos se incluyen inmunización con un antígeno de OPGbp (cualquier polipéptido de OPGbp capaz de provocar una respuesta inmune y, opcionalmente, conjugado con un vehículo) de animales transgénicos (v.g., ratones) que sean capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Ver por ejemplo, Jakobovits y cols., Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 2551-2555 (1993); Jakobovits y cols., Nature, 362, 255-258 (1993); Bruggemann y cols., Year in Immunol., 7, 33 (1993).

Alternativamente, pueden generarse anticuerpos humanos a través de la detección selectiva in vitro de bibliotecas de anticuerpo de despliegue en fago. Ver Hoogenboom y cols., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks y cols. J. Mol. Biol., 222, 581 (1991), incorporado en el presente documento por referencia. Se han descrito diversas bibliotecas de despliegue en fago que contienen anticuerpo, pudiéndolas preparar fácilmente la persona especializada en la técnica. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpos humanos, como por ejemplo fragmentos Fab, Fv y scFv humanos, cuya detección selectiva puede realizarse contra una diana apropiada. El ejemplo 1 describe la detección selectiva de una biblioteca en fago Fab contra OPGbp para identificar las moléculas que se unen selectivamente a OPGbp. Se podrá apreciar que las bibliotecas de despliegue en fagos pueden comprender péptidos o proteínas distintas a anticuerpos que se pueden detectar selectivamente para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp.

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo Id inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético, (v.g., cepa de ratón), como fuente de anticuerpo monoclonal con el anticuerpo monoclonal con el que se está preparando anti-Id. El animal inmunizado reconoce y responde a determinantes idiotípicos del anticuerpo de inmunización produciendo un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Ver por ejemplo, la patente EE.UU. N° 4.699.880, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. El anticuerpo anti-Id puede utilizarse también como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo lo que se denomina un anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al anticuerpo monoclonal original que indujo el anti-Id. Por lo tanto, al utilizar anticuerpos para los determinantes idiotípicos de mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

Producción de agentes de unión selectivos de OPGbp

Cuando el agente de unión selectivo de OPGbp que se va a preparar es un agente de unión selectivo proteínico, como por ejemplo un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno, se dispone de varios métodos biológicos o químicos para producir dicho agente.

Son preferibles los métodos biológicos para producir cantidades suficientes de un agente de unión selectivo para uso terapéutico. Las técnicas de ADN recombinante normales son particularmente útiles para la producción de anticuerpos y dominios de unión a antígeno según la invención. A continuación se describen ejemplos de vectores de expresión, células huésped y métodos para la recuperación del producto expresado.

Se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de OPGbp en un vector de expresión apropiado aplicando técnicas de ligación normales. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula huésped empleada en particular (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de célula huésped, de manera que puede producirse la amplificación del gen y/o expresión del gen). Se puede amplificar / expresarse una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-OPGbp en células huésped procarióticas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucarióticas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si el anticuerpo anti-OPGbp se ha de modificar post-transicionalmente (v.g., glucosilar y/o fosforilar). Si es así, son preferibles células huésped de levadura, insecto o mamífero. Para una revisión de los vectores de expresión, ver Meth. Enz. v. 185, D.V. Goeddel, ed. Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

Típicamente, los vectores de expresión utilizados en las células huésped contendrán uno o más de los siguientes componentes: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia líder para la secreción, un sitio de unión de ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de polilígar para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador seleccionable. A continuación, se explica en detalle cada una de estas secuencias.

Los componentes de vector pueden ser homólogos (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogos (es decir, de especies distintas a la especie o cepa de la célula huésped), híbridos (es decir, una combinación de diferentes secuencias de más de una fuente), sintéticos, o secuencias nativas que funcionan normalmente para regular la expresión de inmunoglobulina. Como tales, una fuente de los componentes de vector puede ser cualquier organismo procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre y cuando los componentes sean funcionales en la maquinaria de la célula huésped y puedan ser activados por ella.

Se selecciona un origen de replicación en función del tipo de célula huésped que se esté utilizando para la expresión. Por ejemplo, el origen de la replicación desde el plasmidio pBR322 (Producto N° 303-3s, New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, mientras que diversos orígenes desde SV40, polioma, adenovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus (como HPV o BPV) son útiles para la clonación de vectores en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen SV40 se utiliza frecuentemente solamente porque contiene el primer promotor).

Típicamente existe una secuencia de terminación de transcripción localizada en 3' del extremo de un polipéptido que codifica regiones y sirve para terminar la transcripción. Normalmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procarióticas es un fragmento rico G-C seguido de una secuencia poli T. Si bien la secuencia se clona fácilmente desde una biblioteca, o incluso se puede adquirir en el comercio como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente empleando métodos para la síntesis de ácido nucleico como los que se han descrito anteriormente.

Un elemento de gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, v.g., ampicilina, tetraciclina o canamicina para células huésped procarióticas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles desde medios complejos. Los marcadores seleccionables preferibles son el gen de resistencia a canamicina, el gen de resistencia a ampicilina, y el gen de resistencia a tetraciclina. Se puede usar también un gen de resistencia a neomicina para la selección en células huésped procarióticas y eucarióticas.

Se pueden utilizar otros genes de selección para amplificar el gen que se exprese. La amplificación es el proceso en el que los genes que tienen una mayor demanda de producción de una proteína crítica para crecimiento se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Entre los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero se incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Los transformantes de célula de mamífero se sitúan bajo la presión de selección, a la que solamente los transformantes se adaptan de forma única para sobrevivir en virtud del marcador presente en el vector. Se impone la presión de selección cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, conduciendo así a la amplificación del gen de selección y el ADN que codifica un anticuerpo anti-OPGbp. Como resultado, se sintetizan mayores cantidades de un anticuerpo a partir del ADN amplificado.

Normalmente, es necesario un sitio de unión a ribosoma para la iniciación de la traducción de ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento está típicamente localizado en 3' para el promotor y en 5' para la secuencia de codificación del polipéptido que se va a expresar. La secuencia Shine-Dalgarno puede variar, aunque típicamente es una polipurina (es decir, tiene un alto contenido A-G). Se han identificado muchas secuencias Shine-Dalgarno, pudiéndose sintetizar fácilmente cada una de ellas aplicando los métodos que se han indicado anteriormente y utilizarse en un vector procariótico.

Se utiliza una secuencia, o señal, líder para dirigir la secreción de un polipéptido. Se puede colocar una secuencia de señal dentro del extremo 5' de una región de codificación de polipéptido o directamente en el él. Se han identificado muchas secuencias de señal y se pueden seleccionar en función de la célula huésped utilizada para la expresión. En la presente invención, una secuencia de señal puede ser homóloga (natural) o heteróloga para una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp. Una secuencia de señal heteróloga seleccionada deberá ser aquella que es reconocida y procesada, es decir, segmentada, por una peptidasa de señal, a través de la célula huésped. Para las células huésped procarióticas que no reconocen y procesan una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa, la secuencia de señal es sustituida por una secuencia de señal procariótica seleccionada, como por ejemplo, del grupo de los líderes fosfatasa alcalina, penicilinasasa o enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura, se puede sustituir una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa por un líder de levadura invertasa, factor alfa o fosfatasa ácida. En la expresión de célula de mamífero, la secuencia de señal nativa es satisfactoria, si bien pueden ser adecuadas otras secuencias de señal de mamífero.

En la mayoría de los casos, la secreción de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp desde una célula huésped tendrá como resultado la eliminación del péptido de señal desde el anticuerpo. Por consiguiente, el anticuerpo maduro carecerá de secuencias de señal o líder.

En algunos casos, como por ejemplo cuando se desea la glucosilación en un sistema de expresión de célula huésped eucariótica, se pueden manipular las diversas pre-secuencias para mejorar la glucosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de segmentación de peptidasa de un péptido de señal en particular o añadir prosequencias, que también pueden afectar a la glucosilación. El producto de proteína final puede tener en la posición -1 (en relación con el primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes para la expresión, que pueden no haber sido eliminados totalmente. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos aminoácidos que se encuentran en el sitio de segmentación de peptidasa, unidos en el término N. Alternativamente, el uso de algunos sitios de segmentación de enzima puede tener como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido OPGbp deseado, si la enzima corta en ese área dentro del polipéptido maduro.

Los vectores de expresión de la presente invención contendrán típicamente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y que está unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp. Se puede utilizar tanto un promotor nativo como heterólogo dependiendo de la célula huésped utilizada para la expresión y el rendimiento de la proteína deseado.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procarióticos incluyen los sistemas de promotor de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptofano (trp); y promotores híbridos como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Se han publicado sus secuencias, permitiendo así que las personas especializadas en este campo puedan ligarlos a la(s) secuencia(s) de ADN deseadas, utilizando ligadores o adaptadores según sea necesario para suministrar los sitios de restricción necesarios.

Los promotores adecuados para su uso con los huéspedes de levadura también son conocidos dentro de la especialidad. Ventajosamente se utilizan potenciadores de levadura con promotores de levadura. Los promotores adecuados para su uso con células huésped de mamífero son muy conocidos y entre ellos se incluyen los que se obtienen de genomas de virus como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y de manera más preferible virus 40 de simio (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, v.g., promotores de choque de calor y promotor de actina.

Otros promotores que se pueden utilizar para expresar los agentes de unión selectivos de la invención incluyen, sin limitarse solo a ellos: la región promotora temprana SV40 (Bernoist and Chambon, *Nture*, 290: 304-301, 1981); el promotor CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' de virus de sarcoma de Rous (Yamamoto, y cols., *Cell*, 22; 787-797, 1980); el promotor de timidina cinasa de herpes (Wagner y cols., *Proc.*, *Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 78; 144-1445, 1981); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster y cols. *Nature*, 296; 39-42, 1982); los vectores de expresión procarióticos como el promotor beta-lactamasa (Villa-Kamaroff, y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 75, 3727-3731, 1978); o el promotor tac (DeBoer, y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 80, 21-25, 1983). También son de interés las siguientes regiones de control transcripcional de animal, que presentan especificidad de tejido y que se han utilizado en animales transgénicos; la región de control de gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift y cols., *Cell*, 38, 639-646, 1984; Ornitz y cols., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50; 399-409, 1986; MacDonald, *Hepatology*, 7, 425-515, 1987); la región de control de gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, *Nature*, 315, 115-122; 1985); la región de control de gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl y cols., *Cell*, 38, 647-658, 1984; Adames y cols., *Nature*, 318; 533-538, 1985; Alexander y cols., *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1436-1444, 1987); la región de control de virus de tumor de mama de ratón que es activo en células de testículo, de pecho, linfoides y mastocitos (Leder y cols., *Cell*, 45, 485-495, 1986), región de control de gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert y cols., *Genes and Devel.*, 1, 268-276, 1987); la región de control de gen de alfafetoproteína que es activa en el hígado (Kurmlauf y cols., *Mol. Cell. Biol.*, 5; 1639-1648, 1985; Hammer y cols., *Science*, 235; 53-58; 1987); la región de control de gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey y cols., *Genes and Devel.*, 1, 161-171, 1987); la región de control de gen beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram y cols. *Nature*, 315; 338-340, 1985; Kollias y cols., *Cell*, 46; 89-94, 1986); la región de control de gen de proteína básica de mielina que es activa en células de oligodendrocito en el cerebro (Readhead y cols., *Cell*, 48, 703-712; 1987); la región de control de gen de cadena-2 ligera de miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, *Nature*, 314, 283-286, 1985); y la región de control de gen de hormona de liberación glonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason y cols., *Science*, 234; 1372-1378, 1986).

Se puede insertar una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción en células huésped eucarióticas. Se conocen varias secuencias potenciadoras asequibles desde mamíferos (v.g., globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, típicamente, se utilizará un potenciador desde un virus. El potenciador SV40, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, y los potenciadores de adenovirus son ejemplos de elementos de potenciación para la activación de promotores eucarióticos. Si bien se puede cortar y empalmar un potenciador en el vector en la posición 5' y 3' de la región de codificación de polipéptido, típicamente queda localizado en el sitio 5' desde el promotor.

Los vectores para la puesta en práctica de la presente invención pueden ser los que son compatibles con células huésped de bacterias, de insectos y de mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3, y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, CA), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alfa (publicación PCT N° WP90(14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY).

Entre otros vectores posibles se incluyen, sin limitarse solo a ellos, cosmidios, plasmidios o virus modificados, pero el sistema de vector debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. Entre dichos vectores se incluyen, sin limitarse solo a ellos plasmidios como derivados de plasmidio Bluescript® (un fagémido a base de ColE1 de alto número de copias, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), plasmidios de clonación PCR designados para la clonación de productos PCR Taq-amplificados (v.g., TOPO™ TA Cloning ® Kit, PCR2.1® plasmid derivatives, Invitrogen, Carlsbad, CA), y vectores de mamífero, levadura o virus como un sistema de expresión de baculovirus (derivados de plasmidio pBacPAK, Clontech, Palo Alto, CA). Se pueden introducir las moléculas recombinantes en células huésped a través de técnicas de transformación, transfección, infección, electroporación y otras técnicas conocidas.

Las células huésped pueden ser células huésped procarióticas (por ejemplo E. coli) o células huésped eucarióticas (como por ejemplo células de levadura, células de insecto o células de vertebrado). La célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, expresa un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno de la invención que puede recogerse después desde el medio de cultivo (si la célula huésped la secreta en el medio) o directamente desde la célula huésped que la produce (si no la secreta). La selección de la célula huésped apropiada dependerá de varios factores como los niveles de expresión deseados, las modificaciones de polipéptido que son deseables o necesarios para la actividad, como glucosilación o fosforilación, y la facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa.

Se conoce una serie de células huésped adecuadas en la especialidad y muchas de ellas están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Entre los ejemplos se incluyen células de mamífero, como células de ovario de hámster chino (CHO) (ATCC N° CCL61) células CHO DHFR (Urlaub y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97, 4216-4220 (1980), células de riñón embrionario humano (HEK) 293 o 293T (ATCC N° CRL1573) o células 3T3 (ATCC N° CCL92). La selección de células huésped de mamífero adecuadas y los métodos para la transformación, cultivo, amplificación, detección selectiva y producción y purificación de producto son conocidas en la especialidad. Otras células de mamífero adecuadas son líneas celulares COS-1 (ATCC N°, CRL1650) y COS-7 (ATCC N° CCL651) de mono, y la línea celular CV-1 (ATCC N° CCL70). Otros ejemplos de células huésped de mamífero incluyen líneas de células de primate y líneas de células de roedores, incluyendo líneas de células transformadas. También son adecuadas las células diploides normales, cepas de células derivadas de cultivo in vitro de tejido primario, así como explantes primarios. Las células candidato pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección o pueden contener un gen de selección que actúe predominantemente. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, sin limitarse solo a ellas, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratón suizo, BALB-c o NIH, líneas de células de hámster BHK o HaK, que están disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA). Cada una de estas líneas celulares se conoce y está disponible para las personas especializadas en el campo de la expresión de proteína.

De manera similar, entre las células huéspedes útiles adecuadas para la presente invención se encuentran las células bacterianas. Por ejemplo, se conocen las diversas cepas de E. coli (v.g. HB101, (ATCC N° 33694) DH5 α , DH10 y MC1061 (ATCC N° 53338)) como células huésped en el campo de la biotecnología. Se pueden emplear también en este método varias cepas de B. subtilis, Pseudomonas spp., otras Bacillus spp. Streptomyces spp. y similares.

También se dispone de muchas cepas de células de levadura conocidas entre las personas especializadas en este campo como células huésped para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Entre las células de levadura preferibles se incluyen por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae.

Adicionalmente, cuando se desee, se pueden utilizar sistemas de células de insecto en los métodos de la presente invención. Dichos sistemas se describen por ejemplo en Kitts y cols. (Biotechniques, 14, 810-817 (1993)), Lucklow (Curr. Opin. Biotechnol., 4, 564-572 (1993)), Lucklow y cols. (J. Virol, 67, 4566-4579 (1993)). Las células de insecto preferibles son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La transformación o transfección de una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp en una célula huésped seleccionada puede llevarse a cabo a través de métodos muy conocidos, incluyendo métodos como método de cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o método DEAE-dextrano. El método seleccionado se determinará en parte en función del tipo de células huésped utilizada. Estos métodos y otros métodos adecuados son muy conocidos entre las personas especializadas en este campo y se exponen por ejemplo en Sambrook y cols., supra.

Se pueden utilizar también animales transgénicos para expresar agentes de unión selectivos glucosilados, como por ejemplo anticuerpos y dominio de unión de antígeno. Por ejemplo, se puede utilizar un animal de producción de

leche transgénico (una vaca o una cabra, por ejemplo) y obtener agentes de unión glucosilados en la leche animal. Alternativamente, se pueden utilizar plantas para producir agentes de unión selectivos glucosilados.

5 Pueden cultivarse células huésped que comprenden (es decir transformadas o transfectadas) un vector de expresión que codifica un agente de unión selectivo de OPGbp utilizando medios patrón muy conocidos entre las personas especializada en este campo. Los medios contendrán normalmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Entre los medios adecuados para el cultivo de células *E. coli* se incluyen por ejemplo caldo de cultivo de Luria (LB) y /o caldo de cultivo Terrific (TB). Entre los medios adecuados para el cultivo de células eucarióticas se incluyen RPMI 1640, MEM, DMEM, que pueden suplementarse todos ellos con suero y/o factores de crecimiento, según se requiera para la línea de células en particular que se cultive. Un medio adecuado para cultivos de insecto es medio de Grace suplementado con hidrolizado de levadura, hidrolizado de lactalbúmina y/o suero de becerro fetal, según sea necesario.

15 Típicamente, se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de células transformadas o transfectadas como suplemento al medio. El compuesto que se utilice vendrá dictado por el elemento marcador seleccionable presente en el plasmidio con el que se transformó la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionado es resistencia a canamicina, el compuesto que se añada al medio de cultivo será canamicina. Otros compuestos para crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina.

20 La cantidad de anticuerpo o dominio de unión de antígeno anti-OpGbp producida por una célula huésped puede evaluarse utilizando métodos normales conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitarse solo a ellos, análisis de mancha de Western, electroforesis de gel SDS-poliacrilamida, electroforesis de gel no desnaturante, separación por HPLC, inmunoprecipitación, y/o ensayos de actividad.

25 La purificación de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPG que ha sido secretado hacia un medio de células puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas, entre las que se incluyen afinidad, inmutofinidad o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de tamiz molecular, electroforesis de gel preparativa o enfoque isoelectrónico, cromatografía de líquidos a alta presión. Por ejemplo, se pueden purificar convenientemente los anticuerpos que comprenden una región Fc por cromatografía de afinidad con una proteína A, que se une selectivamente a la región Fc. Las formas modificadas de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno pueden prepararse con etiquetas de afinidad, como hexahistidina u otros péptidos pequeños como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o myc (Invitrogen) en su término carboxilo o su término amino y purificarse por columna de afinidad en una etapa. Por ejemplo, polihistidina se une con mayor afinidad y especificidad a níquel, de manera que se puede utilizar una cadena de afinidad de níquel (como columnas de níquel Qiagen®) para la purificación de agentes de unión selectivos etiquetados con polihistidina. (Ver por ejemplo, Ausubel, y cols., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)). En algunos casos, pueden ser necesarias más de una etapa de purificación.

40 Los agentes de unión selectivos de la invención que se expresan en células huésped procarióticas pueden estar presentes en forma soluble, ya sea en el espacio periplásmico o en el citoplasma, o en una forma soluble como parte de los cuerpos de inclusión intracelulares. Los agentes de unión selectivos pueden extraerse de la célula huésped utilizando cualquier técnica normal conocida entre las personas especializadas. Por ejemplo, se pueden lisar células huésped para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante prensa francesa, homogenización, y/o sonicación seguido de centrifugado.

45 Las formas solubles de anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp presentes tanto en el espacio de citoplasma como liberadas desde el espacio periplásmico pueden purificarse después aplicando métodos conocidos dentro de la especialidad, por ejemplo, se liberan fragmentos Fab desde el espacio periplásmico bacteriano a través de técnicas de choque osmótico.

50 Si un anticuerpo o dominio de unión a antígeno ha formado cuerpos de inclusión, se pueden unir frecuentemente a las membranas celulares interiores y/o exteriores y, por tanto, se encontrarán principalmente en el material aglomerado tras el centrifugado. El material aglomerado se tratará después a extremos de pH, o con un agente caotrópico como, por ejemplo, un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea, o derivados de urea, en presencia de un agente de reducción como ditiotreitól a un pH alcalino o tris carboxietil fosfina a un pH ácido para liberar, descomponer y solubilizar los cuerpos de inclusión. El agente de unión selectivo soluble puede analizarse después utilizando electroforesis de gel, inmunoprecipitado o similares. Cuando es deseable aislar un anticuerpo o dominio de unión a antígeno solubilizado, se puede llevar a cabo el aislamiento utilizando métodos normales, como los que se exponen más adelante y en Marston y cols., (Meth Enz., 182: 264-275 (1990)).

60 En algunos casos, un anticuerpo o dominio de unión a antígeno puede no estar biológicamente activo tras el aislamiento. Se pueden utilizar varios métodos para el "replegamiento" o conversión del polipéptido en su estructura terciaria y la generación de uniones disulfuro, para restaurar la actividad biológica. Dichos métodos incluyen la exposición del polipéptido solubilizado a un pH normalmente por encima de 7 y en presencia de una concentración concreta de un caotropo. La selección del caotropo es muy similar a las opciones utilizadas para la inclusión de solubilización de anticuerpo, pero normalmente el caotropo se utiliza a una concentración inferior y no coincide

65

necesariamente con los mismos caotropos que los utilizados para la solubilización. En la mayoría de los casos la solución de replegamiento / oxidación contendrá también un agente de reducción o el agente de reducción más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox concreto que permita que se produzca el desordenamiento de disulfuro en la formación del puente(s) de cisteína de proteína. Algunas de las parejas redox comúnmente utilizadas incluyen cisteína/cistamina, glutatona (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditiotreitól (DTT)/ditiano DTT, y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-b (ME). En muchos casos, se puede utilizar o puede ser necesario un co-disolvente para aumentar la eficacia del replegamiento, incluyéndose entre los reactivos comunes utilizados para este propósito glicerol, polietilén glicol de diversos pesos moleculares, arginina y similares.

Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno de la invención se pueden preparar a través de métodos de síntesis química (como por ejemplo síntesis de péptido en fase sólida) utilizando técnicas conocidas en la especialidad como las que se exponen en Merrifield y cols., (J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963)) Houghten y cols. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82: 5132 [1985]), y Stewart and Young (Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL [1984]). Dichos polipéptidos se pueden sintetizar con o sin metionina en el término amino. Los anticuerpos y dominios de unión a antígeno químicamente sintetizados pueden oxidarse aplicando los métodos que se exponen en estos documentos de referencia para formar puentes de disulfuro. Los anticuerpos así preparados retendrán al menos una actividad biológica asociada con un anticuerpo o dominio de unión a antígeno anti-OPGbp producido por recombinación o nativo.

20 Ensayos para identificar agentes de unión selectivos de OPGbp

La invención proporciona métodos de detección selectiva para identificar agentes de unión selectivos que inhiben parcial o completamente al menos una actividad biológica de OPGbp. La inhibición de la actividad biológica de OPGbp incluye, sin limitarse solo a ellas, la inhibición de la unión de OPGbp a su receptor cognado, ODAR, la inhibición de la estimulación de la formación de osteoclasto *in vitro* o *in vivo* mediante OPGbp, y/o la inhibición de recambio óseo o resorción ósea mediada por OPGbp. Los agentes de unión selectivos de la invención incluyen anticuerpos anti-OPGbp, y fragmentos, variantes, derivados y fusiones de los mismos, péptidos, compuestos peptidomiméticos o compuestos organomiméticos.

Los métodos de detección selectiva para la identificación de agentes de unión que pueden inhibir parcial o completamente una actividad biológica de OPGbp pueden incluir ensayos *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos *in vitro* incluyen aquellos que detectan la unión de OPGbp a ODAR y se pueden utilizar para la detección selectiva de agentes de unión de OPGbp en cuanto a su capacidad para aumentar o disminuir la velocidad o grado de unión de OPGbp a ODAR. En un tipo de ensayo, se inmoviliza un polipéptido OPGbp, preferiblemente una forma soluble de OPGbp, como por ejemplo un dominio extracelular, en un soporte sólido (v.g., agarosa o perlas acrílicas) y se añade el polipéptido ODAR, ya sea en presencia o en ausencia de un agente de unión selectivo de OPGbp. Se mide el grado de unión de OPGbp y ODAR con presencia o sin ella de agente de unión selectivo. Se puede detectar la unión por ejemplo por etiquetado radioactivo, etiquetado fluorescente o reacción enzimática. Alternativamente, la reacción de unión puede llevarse a cabo utilizando un sistema detector de resonancia de plasmón superficial, como por ejemplo el sistema de ensayo BIAcore (Pharmacia, Piscataway, NJ). Las reacciones de unión pueden llevarse a cabo con arreglo al protocolo del fabricante.

Los ensayos *in vitro*, como los que se han descrito, pueden utilizarse ventajosamente para detectar selectivamente rápidamente un gran número de agentes de unión selectivos en cuanto a los efectos de unión de OPGbp con ODAR. Los ensayos pueden ser automáticos para detectar selectivamente compuestos generados en despliegue en fago, péptido sintético y bibliotecas de síntesis química.

Se pueden detectar selectivamente también el aumento o disminución de agentes de unión selectivos que se unen a OPGbp con ODAR en cultivos celulares utilizando células y líneas celulares que expresan cada polipéptido. Las células y líneas celulares pueden obtenerse de cualquier mamífero, si bien es preferible su obtención de seres humanos u otros primates, perros o roedores. A modo de ejemplo, la unión de OPGbp a células que expresan ODAR en la superficie se evalúa en presencia o ausencia de agentes de unión selectivos y el grado de unión puede determinarse por ejemplo por citometría de flujo utilizando un anticuerpo biotinilado para OpGbp.

Los ensayos de actividad *in vitro* pueden utilizarse también para identificar agentes de unión selectivos que inhiben la actividad de OPGbp. Entre los ejemplos de ensayos se incluyen la estimulación del crecimiento y proliferación de células que dependen de OPGbp y la formación de osteoclasto mediada por OPGbp desde células de médula ósea, describiéndose ésta última en el ejemplo 1 de la presente invención.

Los ensayos *in vivo* también están disponibles para determinar si un agente de unión selectivo es capaz o no de disminuir o inhibir el recambio óseo y/o resorción ósea. Se puede aumentar la resorción ósea en animales a través de diversos métodos, entre los que se incluyen ovariectomía y administración de agentes pro-resortivos como OPGbp o IL-1. Ver WO 97/23614 y WO 98/46751. Los efectos de los inhibidores de OPG en la resorción ósea en pacientes humanos se puede medir a través de diversos métodos conocidos como absorptiometría de fotón único (SPA), absorptiometría de fotón dual (DPA), absorptiometría por rayos X de energía dual (DEXA), tomografía computada cuantitativa (QCT) y ultrasonografía (ver Johnston y cols., en Primer on the Metabolic Bone Disease and

Disorders of Mineral Metabolism, 2ª ed. M.J. Favus, ed. Raven Press pp. 137-146). El recambio y resorción ósea pueden determinarse también midiendo los cambios en determinados marcadores bioquímicos, como osteocalcina de suero, fosfatasa alcalina de suero, péptidos de extensión de procolágeno I de suero, telopéptido de colágeno N-terminal o C-terminal de suero o urinario, calcio urinario, hidroxiprolina y piridinolina urinaria y desoxipiridinolina.

5 Generalmente se reconoce que una disminución de los niveles de los marcadores bioquímicos mencionados indica que ha disminuido la resorción ósea y se está reduciendo la pérdida de masa ósea. Alternativamente, se pueden determinar los efectos de la resorción ósea midiendo un cambio en la resistencia mecánica del hueso, en particular un aumento en la resistencia de torsión del hueso (retorcimiento).

10 Para aplicaciones de diagnóstico, en determinados modos de realización, los agentes de unión selectivos de OPGbp, como por ejemplo anticuerpos y dominios de unión a antígeno de los mimos, se etiquetarán típicamente con una fracción detectable. La fracción detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, una fracción detectable puede ser un radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}P , ^{35}S o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o una enzima como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Bayer y cols., Meth Enz. 184: 138-163 (1990).

20 Los agentes de unión selectivos de la invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, como radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos (ELISAs), y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, 1987)) para detección y cuantificación de polipéptidos de OPGbp. Los anticuerpos se unirán a polipéptidos de OPGbp con una afinidad que es apropiada para el método de ensayo que se emplee.

25 Los agentes de unión selectivos de la invención también son útiles para la obtención de imágenes in vivo, administrándose por ejemplo un agente de unión selectivo etiquetado con una fracción detectable a un animal, preferiblemente en la corriente sanguínea, y ensayándose la presencia y localización del anticuerpo etiquetado en el huésped. El agente puede etiquetarse con cualquier fracción que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología, u otros medios de detección conocidos en la especialidad.

30 La invención se refiere también a un equipo que comprende un agente de unión selectiva de OPGbp, como un anticuerpo o un dominio de unión a antígeno, y otros reactivos útiles para detectar los niveles de OPGbp en muestras biológicas. Dichos reactivos pueden incluir una actividad secundaria, una etiqueta detectable, suero de bloqueo, muestras de control positivo y negativo y reactivos de detección.

35 Usos terapéuticos de agentes de unión selectivos de OPGbp

Los anticuerpos monoclonales y dominios de unión a antígeno según la reivindicación 1 o 5 pueden utilizarse como agentes terapéuticos. Los agentes de unión selectivos terapéuticos pueden ser agonistas o antagonistas de OPGbp y, en un modo de realización, son anticuerpo antagonistas anti-OPGbp que inhiben al menos una de las actividad biológicas de un polipéptido OPGbp in vitro o in vivo. Por ejemplo, un antagonista de OPGbp inhibirá la unión de OPGbp con ODAR al menos aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces, más de aproximadamente 1000 veces. Alternativamente, un antagonista de OPGbp inhibirá la formación de osteoclasto in vitro tal como lo indica una IC50 mensurable (una concentración que da un 50 % de inhibición) en un ensayo de médula ósea, como se describe en el ejemplo 1. Alternativamente, un antagonista de OPGbp disminuirá los marcadores de recambio óseo en al menos un 20 %, o al menos un 50 % en comparación con los niveles de la línea de referencia. Los agentes de unión selectivos de OPGbp antagonistas (como por ejemplo anticuerpos) se identifican a través de los ensayos de detección selectiva que se han descrito aquí.

50 Los antagonistas de OPGbp, como por ejemplo anticuerpos y dominios de unión a antígeno antagonistas anti-OPGbp, pueden utilizarse para prevenir o tratar enfermedades óseas caracterizadas por una pérdida de la masa ósea o por reemplazamiento del hueso estructuralmente normal con un hueso estructuralmente anormal. Los antagonistas de OPGbp pueden administrarse a un animal que padece pérdida de masa ósea o que es susceptible de padecer pérdida de masa ósea a causa de uno de los siguientes trastornos: osteoporosis, como por ejemplo osteoporosis primaria, osteoporosis endocrina (hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing y acromegalia, formas hereditarias y congénitas de osteoporosis (osteogénesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Menkes y síndrome de Riley-Day) y osteoporosis como consecuencia de la inmovilización de las extremidades; osteomielitis, o una lesión infecciosa del hueso, que lleva a la pérdida de la masa ósea; hipercalcemia como resultado de tumores sólidos (pecho, pulmón y riñón) y malignidades hematológicas (mieloma múltiple, linfoma y leucemia), hipercalcemia idiopática e hipercalcemia asociada con hipertiroidismo y trastornos de la función renal; osteopenia después de cirugía, inducida por administración de esteroides y asociada con trastornos del intestino delgado y grueso y con enfermedades hepáticas y renales crónicas; osteonecrosis, o muerte celular ósea, asociada con lesión traumática o necrosis no traumática asociada con enfermedad de Gaucher, anemia de células falciformes, lupus eritematoso sistémico y otros estados patológicos; pérdida de la masa ósea debido a artritis reumatoide; pérdida periodontal de la masa ósea; osteoartritis; pérdida prostética; y metástasis osteolítica. Los antagonistas de OPGbp pueden utilizarse también para prevenir o tratar determinados trastornos óseos que se caracterizan por un reemplazamiento del hueso estructuralmente sólido con hueso incompetente estructuralmente desorganizado, como

enfermedad de hueso de Paget (osteítis deformante) en adultos y edad juvenil; hiperparatiroidismo, en trastornos óseos congénitos, como displasia fibrosa y en metástasis ósea osteosclerótica.

Los antagonistas de OPGbp se utilizan ventajosamente para tratar la pérdida de masa ósea como resultado de la destrucción osteolítica de hueso causada por tumores malignos o metastáticos. Los polipéptidos de OPG de la invención se pueden utilizar para tratar la pérdida de masa ósea asociada con cánceres de pecho, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esófago, rectal, de vejiga, de útero, de ovario y de hígado, así como cáncer del tracto gastrointestinal. También se incluye la pérdida de masa ósea asociadas con determinadas malignidades hematológicas como mieloma múltiple y linfomas como enfermedad de Hodgkin.

Los antagonistas de OPGbp de la invención, incluyendo los anticuerpos y dominios de unión a antígeno antagonistas, se administran en solitario o en combinación con otros agentes terapéuticos, en particular, en combinación con otros agentes de terapia contra el cáncer. Dichos agentes incluyen por lo general, terapia de radiación y quimioterapia. La quimioterapia puede implicar el tratamiento con uno o más de los siguientes: antraciclinas, taxol, tamoxifeno, doxorubicina, 5-fluorouracilo, y otros fármacos conocidos entre las personas especializadas. En un modo de realización, el agente de terapia contra el cáncer es un antagonista de hormona de liberación de hormona luteinizante (LHRH), preferiblemente un antagonista de péptido. Más preferiblemente, un antagonista de LHRH es un decapeptido que comprende la siguiente estructura:

A-B-C-D-E-F-G-H-I-J

donde:

A es piro-glu, Ac-D-Nal, Ac-D-Qal, Ac-Sar, o Ac-D-Pal;

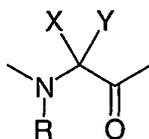
B es His o 4-Cl-D-Phe;

C es Trp, D-Pal, D-Nal, L-Nal-D-Pal(N-O) o D-Trp;

D es Ser;

E es N-Me-Ala, Tyr, N-Me-Tyr, Ser, Lys(iPr), 4-Cl-Phe, His, Asn, Met, Ala, Arg o Ile;

F es



donde R y X son independientemente H y alquilo;
e Y comprende una entidad polar pequeña.

G es Leu o Trp;

H es Lys (iPr), Gln, Met, o Arg;

I es Pro; y

J es Gly-NH₂ o D-Ala-NH₂;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otro modo de realización, un antagonista de LHRH comprende el péptido:

**N-Ac-D-Nal-4-Cl-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-
Lys (iPr) -Pro-D-Ala-NH₂.**

Se utilizan en el presente documento las abreviaturas y las convenciones estándar, abreviándose los radicales y fracciones no estándar del siguiente modo:

| | |
|----------|---------------------------------|
| Nal | 3-(2-naftil)alaninilo |
| 4-Cl-Phe | (4'-clorofenil)alaninilo |
| Pal | 3-(3'-piridil)alaninilo |
| Pal(N-O) | 3-(3'-piridin-N-óxido)alaninilo |
| iPr-Lys | N-épsilon-2-propil-lisinilo |
| Qal | 3-(2'-quinolinil)alaninilo |

Entran dentro del alcance de la presente invención las formas alternativas de los decapeptidos antagonistas de LHRH. Dichos decapeptidos se describen en la patente EE.UU. N° 5.843.901 incorporado en el presente documento por referencia.

Se incluyen asimismo combinaciones de antagonistas de OPGbp con anticuerpos que se unen a células de tumor e inducen un efecto citotóxico y/o citostático en el crecimiento de tumor. Entre los ejemplos de dichos anticuerpos se incluyen los que se unen a proteínas de superficie de célula Her2, CDC20, CDC33, glucoproteína de tipo mucina y

receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR) presente en células de tumor y que induce un efecto citostático y/o citotóxico en las células de tumor que despliegan estas proteínas. Entre los ejemplos de dichos anticuerpos se incluyen HERCEPTINA para el tratamiento de cáncer de pecho y RITUXAN para el tratamiento de linfoma no Hodgkin. Se incluyen también como agentes para terapia contra el cáncer polipéptidos que inducen selectivamente apoptosis en células de tumor como TRAIL de polipéptido relacionado con TNF. Los antagonistas de OPGbp se pueden administrar antes, de forma concurrente o posteriormente al tratamiento con un agente de terapia contra el cáncer. Los antagonistas de OPGbp pueden administrarse profilácticamente para prevenir o mitigar el inicio de la pérdida de la masa ósea por cáncer metastático o pueden administrarse para el tratamiento de un estado patológico existente de pérdida de masa ósea como consecuencia de metástasis.

Los antagonistas de OPGbp de la invención pueden utilizarse para prevenir y/o tratar el crecimiento de células de tumor en el hueso. El cáncer que tiene metástasis en el hueso puede extenderse rápidamente como células de tumor que estimulan a los osteoclastos para reabsorber la matriz del hueso interna. El tratamiento con un antagonista de OPGbp mantendrá la densidad ósea inhibiendo la resorción y disminuirá la probabilidad de que se extiendan las células de tumor por todo el esqueleto. Se puede prevenir y/o tratarse cualquier cáncer tenga metástasis al hueso con un antagonista de OPGbp.

En un modo de realización, se puede prevenir y/o tratar el mieloma múltiple con un antagonista de OPGbp, como por ejemplo un anticuerpo. El mieloma múltiple está localizado en el hueso y los pacientes afectados presentan típicamente una pérdida de la masa ósea como consecuencia de una mayor activación de osteoclasto en regiones localizadas. Las células de mieloma producen directa o indirectamente OPGbp, que a su vez activa los osteoclastos con el resultado a lisis del hueso local que rodea a las células de mieloma embebidas en los espacios de la médula ósea. Los osteoclastos normales adyacentes a la célula de mieloma, a su vez, producen IL-6, que lleva a un crecimiento y proliferación de células de mieloma. Las células de mieloma se expanden en un modo clonal y ocupan espacios que están siendo creados por una resorción ósea inapropiada. El tratamiento de un animal con un antagonista de OPGbp bloquea la activación de osteoclastos, lo que a su vez lleva a una disminución de la producción de IL-6 por los osteoclastos, y a una supresión del crecimiento y/o proliferación de mieloma.

Los antagonistas de OPGbp pueden utilizarse en solitario para el tratamiento de los estados patológicos que se han mencionado que tienen como resultado una pérdida de la masa ósea o en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente (anabólico) promotor del crecimiento óseo o un agente anti-resortivo del hueso entre los que se incluyen factores morfogénicos óseos designados BMP-1 a BMP-12, factor- β de crecimiento de transformación y miembros de la familia TGF- β , factores de crecimiento de fibroblasto FGF-1 a FGF-10, inhibidores de interleucina-1, inhibidores de THF- α , hormona paratiroides, prostaglandinas serie E, bisfosfonatos y minerales potenciadores del hueso, como flúor y calcio. Los agentes anabólicos incluyen hormona paratiroides y factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), formando preferiblemente este último agente complejo con una proteína de unión IGF. Los modos de realización preferibles incluyen también la combinación de un antagonista OPGbp con un antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1) o un antagonista de OPGbp con un receptor TNF soluble, como por ejemplo receptor-1 de TNF soluble o receptor-2 de TNF soluble. Un ejemplo de antagonista de receptor de IL-1 es el que se describe en WO 89/11540 y un ejemplo receptor-1 de TNF soluble es el que se describe en WO 98/01555.

Una disminución en la velocidad de resorción ósea puede llevar a osteopetrosis, un estado patológico marcado por una densidad ósea excesiva. Los agonistas de OPGbp pueden aumentar la formación de osteoclasto y la resorción ósea y se administran a un animal que padece o es susceptible de una disminución en la resorción ósea y un aumento anormal de la masa ósea.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de agentes de unión selectivos de OPGbp entran dentro del marco de la presente invención. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un agente de unión selectivo de OPGbp, es decir un anticuerpo, o un fragmento, variante, derivado o fusión del mismo, mezclado con un agente farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización preferible, las composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos antagonistas anti-OPGbp que inhiben parcial o completamente al menos una actividad biológica de OPGbp mezclados con un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los anticuerpos estarán suficientemente purificados para su administración a un animal.

Los agentes farmacéuticamente aceptables para su uso en las composiciones de la invención incluyen vehículos, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, colorantes, aromatizantes y agentes de dilución, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de volumen, tampones, vehículos de suministro, agentes de tonicidad, co-disolventes, agentes de humectación, agentes de formación de complejo, agentes de tamponado, antimicrobianos y agentes tensioactivos, tal como se conoce dentro de la especialidad.

Una solución salina tamponada neutra o salina mezclada con albúmina de suero son ejemplos de vehículos apropiados. Asimismo se incluyen en las composiciones antioxidantes como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinil

5 pirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros
 10 carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes, como EDTA; alcoholes de azúcar como
 15 manitol o sorbitol; contraiones de formación de sal como sodio; y/o agentes tensioactivos no iónicos como Tween,
 pluronics o polietilén glicol. Asimismo, a modo de ejemplo, entre los agentes de potenciación de la tonicidad
 adecuados se incluyen haluros de metal alcalino (preferiblemente cloruro de potasio o sodio), manitol, sorbitol y
 similares. Entre los conservantes adecuados se incluyen, sin limitarse solo a ellos cloruro de benzalconio, trimerosal,
 alcohol fenético, metil parabeno, propil parabeno, clorohexidina, ácido sórbico y similares. También se pueden
 utilizar peróxido de hidrógeno como conservante. Entre los ejemplos de co-disolventes adecuados se incluyen
 glicerina, propilén glicol, y polietilén glicol. Entre los agentes de formación de complejo adecuados se incluyen por
 ejemplo cafeína, polivinil pirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Entre los agentes
 tensioactivos o agentes de humectación adecuados se incluyen ésteres de sorbitano, polisorbatos como polisorbato
 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales como
 acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonatos, o Tris-HCl. Tampón acetato que puede tener un pH en torno a 4,0-5,5
 y tampón Tris que puede tener un pH en torno a 7,0-8,5. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R.
 Gennaro, ed. Mack Publishing Company, 1990 se exponen otros agentes farmacéuticos adicionales.

Las composiciones pueden presentarse en forma líquida o en una forma liofilizada o deshidratada por congelado.
 Las formas liofilizadas pueden incluir excipientes como sacarosa.

20 Las composiciones de la invención son adecuadas para administración parenteral. En los modos de realización
 preferibles, las composiciones son adecuadas para inyección o infusión en un animal a través de una ruta asequible
 para las personas que trabajan en este campo, como las rutas subcutánea, intravenosa, intramuscular,
 intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, o
 25 intralesionales. Una formulación parenteral será típicamente una solución acuosa isotónica sin pirógenos,
 esterilizada, opcionalmente con contenido en conservantes farmacéuticamente aceptables.

La formulación farmacéutica óptima puede ser determinada por las personas especializadas dependiendo de la ruta
 de administración pretendida, el formato de suministro y la dosis deseada.

30 La invención contempla también otras formulaciones. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también
 preparaciones en partículas de compuestos poliméricos como poliácido áctico, poliácido glicólico, etc. o la
 introducción de un agente de unión selectivo de OPGbp (como por ejemplo un anticuerpo) en liposomas. Se puede
 utilizar también un ácido hialurónico, que puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la
 circulación. Las composiciones farmacéuticas incluyen también la formulación de agentes de unión selectivos de
 35 OPGbp (como por ejemplo anticuerpos) con un agente, como por ejemplo microesferas inyectables, partículas o
 perlas bio-erosionables, o liposomas, que proporcionan una liberación sostenida o controlada del agente de unión
 selectivo que se puede suministrar después como una inyección depot. Otros medios adecuados para el suministro
 incluyen dispositivos de suministro implantables.

40 Se puede formular una composición farmacéutica que comprende un agente de unión selectivo OPGbp (como por
 ejemplo un anticuerpo) como un polvo deshidratado para inhalación. Dichas soluciones para inhalación pueden
 formularse también en un propelente licuado para suministro por aerosol. En otra formulación más, se pueden
 nebulizar soluciones.

45 Se contempla asimismo, la posibilidad de administrar determinadas formulaciones que contienen agentes de unión
 selectivos de OPGbp por vía oral. Las formulaciones que se administran de este modo pueden formularse con o sin
 los vehículos que se utilizan habitualmente en la formación de compuestos de formas de dosis sólidas, como por
 ejemplo tabletas y cápsulas. Por ejemplo, se pueden diseñar cápsulas para liberar la porción activa de la formulación
 en un punto del tracto gastrointestinal en el que se aumenta al máximo la biodisponibilidad y se reduce al mínimo la
 50 degradación pre-sistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión
 selectivo. Asimismo, se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales,
 lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de tabletas y aglutinantes.

Otras preparaciones pueden incluir una cantidad efectiva de un agente de unión selectivo de OPGbp en una mezcla
 55 de excipientes no tóxicos como los que son adecuados para la fabricación de tabletas. Al disolver las tabletas en
 agua esterilizada, u otro vehículo apropiado, se pueden preparar soluciones en formas de dosis unitarias. Entre los
 excipientes adecuados se incluyen, sin limitarse solo a ellos, diluyentes inertes, como carbonato cálcico, carbonato o
 bicarbonato sódico, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes de unión, como almidón, gelatina o acacia; o agentes
 lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

60 Otras formulaciones serán evidentes para las personas especializadas en este campo, incluyendo formulaciones
 que implican agentes de unión selectivos de OPGbp en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Las
 técnicas para la formulación de distintos medios de suministro controlado o sostenido, como vehículos de liposoma,
 micropartículas bio-erosionables, o perlas porosas e inyecciones depot, también son conocidas entre las personas
 65 especializadas en este campo. Ver por ejemplo, Supersaxo y cols., Description of controlled release porous
 polymeric microparticles for delivery of pharmaceutical compositions (Ver WO 93/15722 (PCT/US93/00829).

Independientemente de la manera de administración, la dosis específica puede calcularse con arreglo al peso corporal, el área superficial del cuerpo o el tamaño del órgano. Asimismo, el refinamiento de los cálculos necesarios para determinar la dosis apropiada para el tratamiento en relación con las formulaciones antes mencionadas es el realizado de forma rutinaria por las personas especializadas en este campo y entra dentro del ámbito de las tareas que llevan a cabo rutinariamente. Las dosis apropiadas pueden determinarse a través del uso de los datos de respuesta a dosis apropiados.

Asimismo, se pueden administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención a través de la administración pulmonar, ver, por ejemplo, el documento PCT WO 94/200069, que divulga el suministro pulmonar de proteínas químicamente modificadas, incorporado en el presente documento por referencia. Para el suministro pulmonar el tamaño de partícula deberá ser el adecuado para el suministro en el pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula deberá estar comprendido entre 1 μm y 5 μm , si bien se pueden utilizar partículas más grandes, como por ejemplo, cuando la partícula es bastante porosa.

Alternativamente o adicionalmente, las composiciones se pueden administrar localmente por implante en el área afectada de una membrana, de una esponja u otro material apropiado en el que se ha absorbido o en el que está encapsulado el agente de unión selectivo de OPGbp. Cuando se utiliza un dispositivo de implante, dicho dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro del agente de unión selectivo de OPGbp puede ser directo a través del dispositivo a través de un bolo, o a través de administración continua, o a través de un catéter utilizando infusión continua.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar también en una formulación o preparación de liberación sostenida. Entre los ejemplos de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices de polímero semi-permeables en forma de artículos moldeados, v.g., películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, poliactidas (ver, v.g., patente EE.UU. N° 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y cols., *Biopolymers*, 22: 547-556 [1983]), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer y cols., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 [1981] y *Langer Chem. Thech.*; 12: 98-105 [1982]), acetato de etilen vilnilo, o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir también liposomas, y se pueden preparar a través de cualquiera de los diversos métodos conocidos en la especialidad. Ver v.g., Eppstein y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 3688-3692 (1985); EP 36.676; EP 88.046 y EP 143.949.

Los agentes de unión selectivos de OPGbp, es decir, anticuerpos y fragmentos, variantes, derivados y fusiones de los mismos, pueden emplearse en solitario o combinados con otras composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, se pueden utilizar composiciones farmacéuticas que comprenden por separado o en combinación un antagonista de OPGbp y un antagonista de receptor de interleucina-1, un antagonista de OPGbp y un receptor-1 de TNF soluble, o un antagonista de OPGbp y un receptor-2 TNF soluble para el tratamiento de artritis reumatoide. Por otra parte, se pueden utilizar composiciones que comprenden por separado o en combinación un antagonista de OPGbp y un agente de terapia contra el cáncer para el tratamiento de cáncer y pérdida de masa ósea asociada. Son posibles otras combinaciones con un antagonista o agonista de OPGbp dependiendo del estado patológico que se esté tratando.

Puede ser deseable en algunos casos utilizar una composición farmacéutica que comprenda las composiciones de agente de unión selectivo de OPGbp de una manera *ex vivo*. En este caso, se exponen las células, tejidos u órganos que han sido extirpados del paciente a composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de unión selectivos de OPGbp, tras lo cual se vuelven a implantar en el paciente las células, tejidos y/o órganos posteriormente.

En otros casos, se puede suministrar una composición que comprende un agente de unión selectivo de OPGbp a través del implante en ciertas células del paciente que han sido obtenidas por ingeniería genética, utilizando métodos como los que se describen aquí, para expresar y secretar los polipéptidos, agentes de unión selectivos, fragmentos, variantes o derivados. Dichas células pueden ser células animales o humanas, y pueden suministrarse desde el propio tejido del paciente o desde otra fuente, ya sea humana o no humana. Opcionalmente, se pueden immortalizar las células. No obstante, para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, es preferible que las células estén encapsuladas para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulado consisten típicamente en cubiertas o membranas poliméricas semi-permeables biocompatibles que permiten la liberación del producto(s) de proteína para prevenir la destrucción de las células a través del sistema inmune del paciente o a través de otros factores negativos de los tejidos de alrededor.

Los métodos utilizados para el encapsulado de membrana de las células son conocidas para las personas especializadas en este campo y la preparación de las células encapsuladas y su implantación en pacientes pueden realizarse sin un experimentación indebida. Ver, v.g., patentes EE.UU. N° 4.892.538; 5.011.472; y 5.106.627. En PCT WO 91/10425 (Aebischer y cols.) se describe un sistema de encapsulado de células vivas. Las técnicas para formular otros medios de suministro sostenido o controlado diversos, como vehículos de liposoma, partículas o perlas bio-erosionables, también son conocidas entre las personas especializadas en este campo, y están descritas. Las células, con o sin encapsulado, pueden implantarse en tejidos u órganos del cuerpo del paciente adecuados.

Una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un agente de unión selectivo de OPGbp (como por ejemplo un anticuerpo anti-OPGbp, o fragmento, variante, derivado o fusión del mismo), dependerá por ejemplo de los objetivos terapéuticos, como la indicación para la que se está utilizando la composición, la ruta de administración y el estado del sujeto. Los anticuerpos o dominios de unión a antígeno antagonistas de OPGbp de la invención se administran en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva para prevenir y/o tratar pérdida de hueso asociada a enfermedad ósea metastásica. Una "cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva" de un anticuerpo antagonista de OPGbp es la cantidad que reduce la velocidad y/o extensión de la pérdida de masa ósea o que previene la pérdida de la masa ósea en un sujeto que tiene una masa ósea normal. Los cambios en la masa ósea se detectan a través de una serie de métodos conocidos como absorptiometría de fotón único (SPA), absorptiometría de fotón dual (DPA), absorptiometría de rayos X de energía dual (DEXA), tomografía computada cuantitativa (QCT) y ultrasonografía (ver Johnston y cols., en Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorder of Mineral Metabolism, 2ª ed. M. J. Favus, ed. Raven Press pp. 137-146). Las personas especializadas en este campo pueden aplicar estos métodos para determinar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de fusión de OPG. Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede determinarse midiendo los cambios en los marcadores bioquímicos para el recambio óseo, como por ejemplo osteocalcina de suero, fosfatasa alcalina de suero, péptidos de extensión de procolágeno I de suero, telopéptido de colágeno C-terminal o N-terminal de suero o urinario, calcio urinario, hidroxiprolina, piridinolina urinaria y desoxipiridinolina. Generalmente, se reconoce que una disminución de los niveles de los marcadores bioquímicos que se han mencionado indica que se está reduciendo la resorción ósea y que se está disminuyendo la pérdida de masa ósea. Alternativamente, se puede determinar también una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de fusión de OPG midiendo un cambio en la resistencia mecánica del hueso, en particular un aumento de la resistencia de torsión (retorcimiento) del hueso.

Por consiguiente, puede ser necesario que la persona encargada valore la dosis y modifique la ruta de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores que se han mencionado antes. En otros modos de realización, la dosis puede oscilar entre 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 1 µg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg. Típicamente, el especialista clínico administrará la composición hasta alcanzar la dosis con la que se consiga el efecto deseado. La composición puede administrarse por lo tanto como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de agente de unión selectivo de OPGbp) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o un catéter.

35 Ejemplo 1

Reactivos y ensayos

La diana de detección selectiva utilizada en estos estudios fue preparada a partir de la expresión de ADNc que codifica OPGbp humana de 140 a 317 aminoácidos inclusive, tal como se muestra en la figura 4 de PCT WO 98/46751 en una célula huésped CHO y se purificó del siguiente modo. Se equilibró una columna de Sefarosa Q (Pharmacia) con Tris 20 mM, pH 8,5. Se aplicó medio acondicionado que había sido valorado también a un pH 8,5, se lavó la columna con tampón Tris y se eluyeron las proteínas con un gradiente NaCl 100-600 mM sobre 20 volúmenes de columna. Se identificaron fracciones que contenían OPGL a través de SDS-PAGE y análisis de mancha de Western. A continuación, se valoraron fracciones que contenían OPGbp a un pH 4,8 y se aplicaron a una columna Sp (Pharmacia) que había sido equilibrada con acetato sódico 20 mM, pH 4,8. Después del lavado, se eluyeron las proteínas con gradiente de NaCl 0-0,3 M, seguido de etapas de NaCl 0,5 M y 1M. Se eluyó OPGbp con todos los tampones, aunque solamente se encontraron activas las fracciones de gradiente de NaCl 0-0,3 M en los bioensayos de estimulación de osteoclasto in vitro. El rendimiento fue 40 mg/l. El secuenciado amino-terminal reveló que aproximadamente un 80 % de la proteína purificada empezaba con el aminoácido 143 de OPGbp humana, mientras que el 20 % restante comenzaba con el aminoácido 147. El producto final utilizado para la detección selectiva de bibliotecas de fagos recibe el nombre de OPGbp[143-317], la forma purificada predominante.

Se prepararon anticuerpos policlonales anti-OPGbp del siguiente modo. Se inyectaron inicialmente en tres conejos neozelandeses blancos (Western Oregon Rabbit co., Philomath, OR) cantidades iguales de Hunter Titer Max (CytRx Corp., Atlanta, GA) y OPGbp[143-317]. Se inyectaron 0,2 mg por conejo. Se repitió la misma operación cuatro y seis semanas después. Se realizó extracción de 50 ml de sangre a los siete semanas y una vez a la semana después con un total de seis sangrados. Se purificaron por afinidad los anticuerpos desde el suero de conejos inmunizados en una resina de OpGbp del siguiente modo. Se añadieron 3 ml de resina Actigel Aid (Sterogene) a una columna de 10 ml (Kontes Fex Colum) y se lavaron con 50 ml de PBS. Se añadieron 3 mg de OPGbp[143-317] diluidos en 3 ml de PBS a la columna de Actigel y se agitó suavemente para su mezclado. Se añadieron 0,6 ml de cianoborohidruro de Na 1 M y después se agitó la mezcla durante toda la noche a 4 °C. Se lavó la columna con 50 ml de tampón de elución Pierce Gentle (Pierce) seguido de 150 ml de PBS. Se filtraron para esterilización 50 ml de sueros de conejos inmunizados a través de un filtro de 0,45 µm, se añadieron a la columna y se agitó la mezcla durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se dejó en reposo el contenido de la columna y se drenó la fase líquida. A continuación, se lavó la columna con 150 ml de PBS hasta un OD₂₈₀ de 0,002. A continuación, se añadió tampón de elución Pierce

Gentle con 1 % de ácido acético glaciado al 1 % a la columna y se recogieron fracciones de 1 ml a intervalos de 10 minutos y se analizaron según OD₂₈₀. Se distribuyeron las fracciones que contenían la cantidad más alta de material de absorción OD₂₈₀ y se dializaron contra dos litros de PBS durante 48 horas. Se produjo un cambio de tampón durante este tiempo.

5 Se llevaron a cabo los ensayos ELISA en distribuciones de fago eluidos colocando en placa OPGbp[143-317] a 1,5 µg/ml en PBS, pH 8,0 durante 1 hora a temperatura ambiente, en inmunoplasmas Nunc Maxisopr en una batidora. Se añadió una solución de enjuagado de MPBS 2 % (Tampón de bloqueo) a las inmunoplasmas, se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente y se descartaron. Se llevó a cabo el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con MPBS al 2 %. Se realizaron lavados 5 x utilizando TBS-Tween-20 (0,1 %) (TBS; Solución salina tamponada Tris; Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM). Se añadió una valoración de fago utilizando un mínimo de 10¹⁰ fagos/pocillo en tampón de dilución conjugado (0,4 % leche deshidratada sin grasa en TBS o 0,4 % M-TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados utilizando TBS-Tween-20 (0,1 %). Se utilizó conjugado de anticuerpo monoclonal peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-M13 (Pharmacia Piscataway, NJ) en una dilución 1/2000 en MTBS al 0,4 % durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo los lavados 5 veces con TBS-Tween-20 (0,1 %). Se añadió ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-sulfónico) (ABTS) (Pierce, Rockford, IL) un sustrato colorimétrico para detección a OD₄₀₅. Se llevaron a cabo los controles positivos para la detección de huOPG bp [143-317] en placa por adición de OPG[22-194]-Fc, seguido de fosfatasa anti-Fc-alcalina y sustrato para-nitrofenilfenol (pNPP) para la detección.

20 Condiciones PCR y cultivo 2xTY-AG

Se llevó a cabo una reacción en cadena de polimerasa típica (PCR) en una placa Thermowell de 96 pocillos. Cada pocillo contenía 20 µl de una mezcla de reacción PCR (2 µl 10 x tampón PCR (Gibco BRL Products, Grand Island, NY), 17,3 µl de agua, 0,2 µl dNTPs (25 mM), 0,2 µl Primer 870-02, 0,2 µl cebador 2182-83 (reservas de cebador 10 pmoles/µl para amplificación por inserto), 0,1 µl de polimerasa Taq]. Se recogieron colonias individuales y se resuspendieron en un pocillo y se superpusieron 20 µl de aceite mineral, se sellaron y después se colocaron en una máquina PCR.

30 870-02 5'-CCG ACT TTG CAC CTA GTT (SEQ ID NO: 22)
2182-83 5'-TTT GTC TTT CCA GAC GTT AGT (SEQ ID NO: 23)

35 Se generó una placa por duplicado para preparar cultivos transfiriendo la misma colonia recogida a la posición de pocillo correspondiente en un segundo bloque de 96 pocillos profundos. Se dejaron crecer los cultivos en 0,3 a 1,0 ml 2 x TY-AG (caldo de cultivo 2x TY (16 g bacto-triptona/litro de agua, 10 g extracto de levadura /litro de agua, 5 g NaCl /litro de agua), con un contenido de 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa). Se selló el bloque con una cinta adhesiva permeable al aire, se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos para que bajara el líquido, y se incubó a 37 °C a 300 a 350 rpm durante toda la noche para el cultivo. Los cultivos de toda la noche recibieron 150 µl/pocillo de 50 % glicerol, se mezclaron y se congelaron a -80 °C.

40 Las condiciones de reacción PCR fueron 40 ciclos de 45 segundos, a 90 °C, 45 segundos a 55 °C, 1,5 minutos a 72 °C, seguido de 72 °C de extensión durante 10 minutos. Una vez completada la reacción PCR, se hicieron correr 2,5 a 4,0 µl sobre geles de agarosa al 1 % de 25-pocillos con 0,5 µl/ml de bromuro de etidio, utilizando patrones de peso molecular de ADN (Gibco BRL Products, Grand Island, NY, o Stratagene, La Jolla, CA) durante 90 minutos a 90 voltios. Se consideraron solamente insertos de longitud total de más de 1,6 kb.

45 Se digirieron con BstNI partes alícuotas de 16 µl de reacciones PCR durante 3 horas a 60 °C con una mezcla de digestión total de 30 µl que contenía 10 µl de agua, 3 µl de 10X tampón 2 React (GIBCO BRL products), 0,3 µl BSA (10 mg/ml), 0,7 µl BstNI (GIBCO: 10.000 unidades/ml). Se hicieron correr las muestras digeridas en geles de agarosa al 3 % de 25-pocillos durante 3,5 horas a 80 voltios.

50 Ensayo de células RAW

55 Se mezclaron varias concentraciones de muestras de ensayo Fab con una cantidad constante de OPGbp [143-317] humana y se incubaron durante al menos una hora a temperatura ambiente en DMEM, suero bovino fetal al 10 % y 1 x mezcla de glutamina-penicilina-estreptomicina. Se indican las concentraciones de muestras Fab y OPGbp para cada experimento. Tras la incubación, se añadió la mezcla a 2 x 10⁴ células RAW /pocillo (American Type Culture Collection, Manassas, VA, Accession N° TIB-71) en una placa de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos. Se cultivaron las células RAW en DMEM con suero bovino fetal al 10 % y 1 x glutamina-penicilina-estreptomicina. Al cabo de tres días a 37 °C y CO₂ al 5 %, se aspiró el medio desde los pocillos y se mancharon las células para determinar la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), un marcador de diferenciación de osteoclasto, por adición de 100 µl por pocillo de tampón citrato 0,1 M con Tritón X-100 al 0,1 %, incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, adición de sustrato de paranitrofenilfosfato (pNPP) y tartrato en tampón citrato que contenía Tritón X-100 (la concentración de sustrato fue 20 mM pNPP y 335 mM tartrato) e incubación durante 5 minutos más a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción por adición de NaOH hasta una concentración de 0,05 M. La fosfatasa ácida convierte el sustrato pNPP en para-nitrofenol que se detecta por absorbancia a 405 nm.

Se trazó el gráfico del cambio de absorbancia a 405 nm en función del log de dosis para los controles y las muestras de ensayo. Se calculó un análisis de varianza (ANOVA) y potencia relativa con un límite de confianza del 95 %. Los controles positivos incluyeron diferentes concentraciones de proteína de fusión OPG [22-194]-Fc o una preparación de anticuerpo policlonal anti-OPGbp preincubada con OPGbp [143-317] e incubada con células RAW 264,7 tal como se ha descrito antes.

Ensayo de médula ósea

Se llevó a cabo un ensayo de la médula ósea murínica para la determinar la formación de osteoclasto, esencialmente, tal como describe Lacey y cols. (Cell 93, 165-176 (1988)) y Kong y cols., (Nature, 397, 315-323 (1999)). Brevemente, el ensayo es una modificación del ensayo de co-cultivo de médula ósea murínica descrito en PCT WO 97/23614 en el que se cultivaron células de médula ósea murínicas no-adherentes en medio durante siete días en presencia de OPGbp humana (143-317), pero sin adición de la línea celular de estroma ST2, 1,25 (OH)₂ vitamina D3 y dexametasona. Se detectaron las células que tenían un fenotipo de osteoclasto según la presencia de células TRAP-positivas. Se midió la actividad TRAP en solución y por manchado histoquímico.

Para la detección de la actividad TRAP en solución, se lisaron las células de la médula ósea adultas en tampón citrato 100 mM (Sigma, Cat # 91-5) + 0,1 % Triton X-100, pH 5,0, 3-5 minutos. Se añadieron pNPP 20 mM, tartrato 80 mM y citrato 100 mM + Tritón 0,1 % X-100, pH 5,0 y se incubaron a temperatura ambiente durante 3-5 minutos y se midieron a 405 nm después de detener la reacción con 50 µl de 500 mM NaOH/pocillo. Una respuesta positiva fue una disminución de la absorbancia dependiente de la concentración a 450 nm desde ~2,0 OD a ~0,6 OD.

Para el manchado histoquímico, se fijaron las células en una solución fijadora a base de formaldehído, después se mancharon con Fast Garnet GBC (solución 2-metil-4-[(2-metilfenil)-azo]bencenodiazonio) + solución fosfato Naftol AS-BI (C₁₈H₂₅BrNO₆P) + solución acetato + solución tartrato), se incubó durante 1 hora a 37 °C, después se enjuagó, se secó y se evaluó con el microscopio. Se consideró que una célula que era TRAP positiva y contenía tres o más núcleos (MNC TRAP-positiva) era una célula osteoclastica.

Ejemplo 2

Detección selectiva de biblioteca Fab humana

Se obtuvo una biblioteca de aproximadamente 4 x 10¹⁰ fragmentos Fab humanos únicos en bacteriófago M13 de Target Quest, NV (Amsterdam, Países Bajos). Los procedimientos generales para la construcción y detección selectiva de bibliotecas Fab humanos se describe en Haard y cols. (Advanced Drug Delivery Reviews 31, 5-31 (1998); J. Biol. Chem. 274, 18218-18230 (1999)). Se realizó la detección selectiva de la biblioteca para los fragmentos Fab que se unen a OPGbp [143-317] siguiendo los procedimientos que se indican a continuación.

Depósito en placa directo en fase sólida

Se inmovilizó OPGbp [143-317] tal como se ha descrito anteriormente en una fase sólida utilizando tubos de inmunoensayo Nunc Maxisorb (12 x 75 mm, capacidad 5 ml) por depósito directo en la fase sólida a una concentración de proteína de 1,5 µg/ml en TBS, pH 8,0 (TBS es solución salina tamponada con Tris: Tris 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM) a temperatura ambiente durante 2 horas. Estas condiciones permitieron un 80 % de depósito máximo de la fase sólida en 2 horas (máximo en 2 horas seguía no saturado) al mismo tiempo que se retenían las capacidades de unión a OPG [22-194]-Fc. Al cabo de 2 horas de incubación, se lavó el tubo tres veces con PBS. Se bloqueó la diana depositada rellenando el tubo de inmunoensayo con leche deshidratada no grasa al 2 % (Marvel o Carnation) en PBS (MPBS) durante 1 a 4 horas a temperatura ambiente, se lavó dos veces, cada una de ellas en PBS-Tween 20 (0,1 %) y PBS. Se pre-bloquearon los fagos concentrados con PEG (aproximadamente 10¹³) en MPBS al 2 % para absorber el fago de unión a leche antes de la exposición del fago a la diana en fase sólida. Se incubaron los fagos pre-bloqueados en 4 ml con la diana depositada a temperatura ambiente durante 2 horas (30 minutos de rotación transversal ("end-over-end") y 90 minutos de reposo). Se lavó el contenido unido al tubo 20 veces con PBS-Tween 20 (0,1 %) y 20 veces con PBS para eliminar el fago sin unir y reducir la unión no específica. Se eluyeron los fagos desde la fase sólida con de elución de fagos total de diez minutos con 1 ml de trietilamina 100 mM (TEA) pH 12, rotación del tubo longitudinal (end-to-end), seguido de neutralización con 0,5 ml de 1 M Tris-HCl pH 7,4. Alternativamente, se recuperaron ligadores de fago específicos por elución con 1 ml de 1 µM OPGbp[143-317] o 1 µM OPG[22-194]-Fc en 0,4 % MPBS, pH 8,0 o pH 7,4, respectivamente.

Se valoraron los fagos eluidos (ligadores) sobre cepa TG1 de E. coli (Pharmacia, Piscataway, NJ.). Se llevó a cabo la valoración por duplicado según una modificación del método "Dilución continua" (Huycke y cols., BioTechniques 23, 648-650 (1997)) con 10 µl de dilución de fago en caldo de cultivo 2x TY en 90 µl de células TG1 en fase log (A600, 0,2 a 1,0 ODs, se mezclaron y se incubaron 20-30 minutos a temperatura ambiente. Se vetearon horizontalmente 10 µl en una línea, 6 líneas por cada placa petri cuadrada 2xTY-AG (caldo de cultivo 2xTY, que contenía 2 % de glucosa, 100 µl/ml ampicilina y 15 g/litro agar), y se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Se amplificaron los fagos eluidos (aglutinantes) a través de la infección bacteriana en células TG1. Se inocularon en

25 ml de caldo de cultivo 2 x TY células TG1 de E. coli y se cultivaron a 30 °C durante más de 12 horas, 270 rpm. Se inoculó el cultivo durante toda la noche 1:100 con 50 ml de caldo de cultivo 2x TY caldo de cultivo, y se desarrolló ~1,5 horas, 270 rpm hasta un OD₆₀₀ de 0,5. Para la amplificación de fago seleccionado, se añadieron 5 volúmenes de células TG1 de E. coli exponenciales, 4 volúmenes de caldo 2xTY y 1 volumen de fago eluido (neutralizado) en combinación y se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 30 minutos. Para reducir el volumen para el depósito, se centrifugaron las células a 4.000 rpm y se resuspendió el aglomerado en caldo de cultivo 2 x TY-AG (100 ug/ml ampicilina, 2 % glucosa). En la primera vuelta de selección, se depositó la muestra en dos a cuatro placas 16 cm² 2 x TT-G (caldo de cultivo 2 x TY que contenía 2 % de glucosa, 100 ug/ml de ampicilina y 15 g de agar) para mantener la diversidad. Para las últimas vueltas de selección, fue suficiente una placa. Se incubaron las placas durante toda la noche a 30 °C. Después de un crecimiento durante toda la noche, se añadieron 5 ml de 2xTG-AG a cada placa grande, y se rasparon las bacterias para soltarlas con un dispersador esterilizado. Una vez completada la resuspensión y la concentración por centrifugado a 4.000 rpm, 10 minutos, se transfirió una muestra concentrada a un criotubo Nunc. Se añadió glicerol esterilizado a una concentración final de 15 % y se almacenó inmediatamente a -70 °C.

Se resuspendieron las células amplificadas en caldo de cultivo 2 x TY-AG hasta ~0,1 OD y se desarrolló durante 1,5 -2,5 horas a 37 °C, 270 rpm, a un OD₆₀₀ de 0,5 y se transfirió (5 ml) a un tubo Falcon de 50 ml que contenía una cantidad apropiada de fago ayudador M13K07 (Gibco BRL Products, Grand Island, NY) con una relación de 20 a 1 de fago a bacteria. Se incubó la mezcla de fagos y bacterias a 37 °C durante 30 minutos sin agitación seguido de centrifugado durante 15 minutos, 3.700 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el aglomerado de bacterias en 25 ml de 2xTY-AK (100 ug/ml ampicilina, 25 ul/ml canamicina) y se transfirió a un matraz de 250 ml para incubación durante toda la noche a 30 °C con agitación a 270 rpm. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo en un tubo Falcon de 50 ml durante 20 minutos a 3.700 rpm para aglomerar las bacterias. Se añadió al sobrenadante 1/5 del volumen de una solución de polietileno glicol (PEG) (20 % PEG 8000, 2,5 M NaCl) y se mantuvo sobre hielo durante al menos 1 hora. Se aglomeraron los fagos durante 20 minutos, 3.700 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el aglomerado en ~1,0 ml de PBS esterilizado y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se microcentrifugó la muestra 2 minutos, ~ 14.000 rpm para eliminar el resto de las bacterias y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se repitió el precipitado de PEG. Se utilizaron los fagos precipitados con PEG concentrados en los ensayos de selección o detección selectiva. El rendimiento normal fue aproximadamente 1-5 x 10¹³ fago desde un cultivo de 25 ml. Para un almacenamiento más prolongado, se añadió glicerol al fago (15 % de concentración final) y se almacenaron los fagos a -70 °C.

En este procedimiento se describe una ronda de detección selectiva que comprende las etapas de unión, elución y amplificación. Típicamente, se llevaron a cabo de tres a cinco rondas de detección selectiva con el fin de obtener una distribución de fagos eluidos que se unen a OPGbp [143-317] en un ensayo ELISA a un nivel al menos cuatro veces mayor con respecto al fondo. Una vez completada la detección selectiva, se depositaron en placa los fagos eluidos finales para colonias individuales y se analizó el ADN insertado por PCR de colonia y digestión con BstNI tal como se describe a continuación.

Fase en solución

Se bloquearon previamente los fagos durante 60 minutos en un rotador a temperatura ambiente en MPBS al 2 %. Se añadió bucle b-b' de OPGbp biotinilado (500 nM) directamente a la mezcla de fagos equilibrada y se incubó durante 30 minutos a 1 hora en un rotador (transversal) a temperatura ambiente. El péptido de bucle tenía la secuencia [biotina][LC]-TDIPSGSHKVLSSWYHDRG] (SEQ ID NO: 24) donde se utilizó LC (cadena lineal, es decir (CH₂)₅-NH₂) para unir la secuencia de bucle b-b' OPGbp con biotina. Se utilizaron perlas Dynabead revestidas con estreptavidina (100 µl por selección en tubos Eppendorf de 1,5 ml) para la captura en fase solución de complejos antígeno biotinilado-fago (3 x para selección de antígeno negativo, y 1X para selección de antígeno diana). Se pre-equilibraron las perlas recubiertas con estreptavidina arrastrándolas hacia un lado del tubo utilizando un imán Dynal, se separó el tampón y se resuspendieron las perlas en 1 ml de MPBs al 2 %. El equilibrio a temperatura ambiente fue 1 a 2 horas en un rotador transversal.

Se realizaron tres selecciones negativas en las rondas 2 y 3. Para la selección negativa, se añadieron fagos prebloqueados a un tubo de perlas Dynabeads revestidas con estreptavidina pre-equilibradas en MPBS al 2 % y se incubaron durante 30 minutos en un rotador transversal a temperatura ambiente (se repitió dos veces). Se arrastraron las perlas a un lado y se transfirieron los fagos sin unir a un tubo Eppendorf nuevo para su utilización para la selección de antígeno. Se añadió péptido de bucle b-b' huOPGbp biotinilado (500 nM) directamente a la mezcla de fagos equilibrada y se incubó durante 30 minutos a 1 hora en un rotador transversal a temperatura ambiente. Se arrastraron perlas equilibradas a un lado del tubo, se separó el tampón y se resuspendió con la mezcla de péptido biotinilado-fago seguido de incubación durante 15 minutos en un rotador transversal a temperatura ambiente. Se colocaron los tubos en una rejilla magnética durante 1 minuto, se aspiraron y se lavaron las perlas 6x con 1 ml de 2 % MPBS-Tween-20 (0,1 %), 6 x de 1 ml de PBS-Tween-20 (0,1 %) y 2 x con 1 ml de PBS. Se eluyeron los fagos con 1 ml de TEA 100 mM, pH 12 durante 5-10 minutos en un rotador a temperatura ambiente, seguido de neutralización con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7,4.

Ejemplo 3

Identificación de clones Fab que se unen OPGbp

5 Se infectaron células TG1 de *E. coli* con la distribución de fagos de una ronda de respuesta a ELISA y se recogieron colonias individuales para el análisis PCR. Típicamente, se recogieron de una a cuatro placas de las 96 colonias para cada selección. Se amplificaron los ADNc de Fab por PCR con un grupo específico de cebadores y se analizaron en un gel de agarosa para determinar la longitud del inserto Fab. El inserto Fab tiene una longitud de > 1,6 Kb de longitud completa. Se digirieron también ADNc con la enzima de restricción BstNI y se analizó el patrón de banda por electroforesis en geles de agarosa. Los clones que presentaron insertos de longitud completa PCR de tamaño idéntico y patrones de banda BstNI idénticos en dos o más aislados fueron candidatos para otros análisis. Utilizando los criterios mencionados, se identificaron los siguientes Fabs.

15 Se identificó el patrón "P" de Fab tras la detección selectiva en fase solución utilizando tres rondas de elución con trietilamina, pH 12, seguido de la detección selectiva en fase sólida, tal como se ha descrito antes utilizando una ronda de elución con 1 uM OPGbp [143-317].

20 Se identificó el patrón "S" de Fab por detección selectiva en fase solución utilizando tres rondas de elución con trietilamina, pH 12, seguido de detección selectiva en fase sólida tal como se ha descrito antes utilizando dos rondas de elución con 1 uM de OPG[22-194]-Fc.

Se identificó el patrón "AT" de Fab por detección selectiva en fase sólida tal como se ha descrito antes utilizando cuatro rondas de elución con 1 uM OPG[22-194]-Fc.

25 Se identificó el patrón "Y" de Fab por detección selectiva en fase sólida tal como se ha descrito utilizando tres rondas de elución con OPGbp[143-317].

30 Se prepararon los fagos para colonias individuales que presentaban los patrones AT, Y, P y S de Fab a través del siguiente procedimiento. Se realizaron las preparaciones de plasmidio y se transformaron en células TG1. Los análisis de PCR confirmaron la transformación de un inserto de longitud completa. Se desarrollaron las células tanto en un bloque de pocillo profundo (0,5 ml de volumen) como en un cultivo de 10 ml. Se rescataron los fagos por infección en una relación 20:1 de fago ayudador M13K07 /células, se hicieron precipitar en PEG 1 vez (como en el protocolo de depósito en placa directa en fase sólida) y se resuspendieron en ~200 ul desde un bloque de pocillo profundo de tamaño de pocillo de 2 ml o ~500 ul desde el cultivo de 10 ml en PBS.

35 Las valoraciones de fago fueron en el intervalo de 10^{11} - 10^{14} fago/ml en el ELISA. Se realizaron las valoraciones en función del volumen utilizando un máximo de adiciones de 50 µl/pocillo dando un intervalo típico de 10^9 - 10^{11} fago pocillo en un ensayo ELISA. Se llevó a cabo el ensayo ELISA de fago tal como se ha descrito antes. En el ensayo ELISA se utiliza conjugado anti-M13-HRP para la detección de fago unido con ABTs, un sustrato colorimétrico a 405 nm. Un conjugado anti-M13 HRP fue específico para la proteína VIII de recubrimiento principal en el fago. Los valores fueron de determinaciones en un solo punto.

45 En la figura 1 se muestran los resultados de un ELISA de un clon representativo para cada uno de los patrones principales "AT", "Y", "P" y "S". Los cuatro clones Fab mostraron una reactividad significativa con OPGbp [143-317]. Se secuenciaron todos los miembros de clon de los patrones "AT" e "Y" (27 miembros de 672 clones y 9 miembros de 96 clones, respectivamente) y se encontraron idénticos dentro de sus patrones. Por lo tanto, los miembros del patrón serán representativos de todo el patrón para los patrones "AT" e "Y".

50 Los patrones "Q" (3 miembros de 96 clones), "X" (3 miembros de 96 clones) y "AB" (2 miembros de 96 clones) también fueron ELISA positivos para OPGbp[143-317] en placa según lo determinó un clon representativo (figura 1). Dado que las señales ELISA fueron considerablemente más bajas que los patrones "AT", "Y", "P" y "S" y estaban representados solamente por dos o tres miembros en los 96 clones, se asumió que tenían Kds en el intervalo µM y no se siguieron analizando. El patrón "X" fue solamente ELISA positivo cuando la concentración de Tween-20 en los lavados se redujo de 0,1 % a 0,01 %.

Ejemplo 4

Purificación de Fabs solubles

60 Se infectaron fagos que contenían Fabs "AT", "Y", "P" y "S" en HB2151 de *E. coli* (Pharmacia, Piscataway, NJ) y se indujo la expresión de fragmentos Fab por adición de IPTG a 1 mM generalmente durante al menos 5 horas, a excepción de que para el patrón Y se redujeron los niveles de IPTG a 0,25 mM. Tras la inducción, se recogieron las células (750 ml) por centrifugado y se liberaron los Fabs desde el espacio periplásmico por choque osmótico.

65 Se resuspendió el aglomerado total en 8 ml de TES enfriado con hielo (Tris 0,2 M, EDTA 0,5, sacarosa al 17,1 %, pH 8,0), se transfirió a un tubo de 50 ml y se incubó durante 5 a 10 minutos en hielo con agitación suave

ocasionalmente. Al mismo tiempo, se lavaron tubos vacíos con 8,8 ml TES/H₂O (1:3) para recuperar el resto del aglomerado de células y se añadió a las otras células y se incubó durante otros 20 minutos sobre hielo. Se centrifugaron las células a 14.000 rpm durante 3 minutos y se transfirió el sobrenadante desde el aglomerado de células ligeramente enlodado a otro tubo de 50 ml. Se volvió a centrifugar el sobrenadante a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para eliminar la contaminación de células residuales. El sobrenadante recibió el nombre de fracción periplásmica liberada por TES. Se resuspendió el aglomerado bacteriano en 10 ml de TES más MgSO₄ 15 mM, se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó dos veces como en el caso anterior. El sobrenadante recibió el nombre de fracción periplásmica liberada con Mg. Se añadió albúmina de suero bovino (BSA; tipo RIA, Sigma) como vehículo y estabilizante a cada fracción periplásmica hasta una concentración final de 1 mg/ml y se dializó durante toda la noche a 4 °C en 2 L con 1 intercambio de tampón de columna Talon (Tris-HCl 20 mM/NaCl 0,1 M, pH 8,5) más inhibidores de proteasa a las concentraciones finales, Pefabloc 0,05 mg/ml, leupeptina 50 nM, aprotinina 0,06 µg/ml y pepstatina A 0,9 µg/ml.

Se sometieron los extractos periplásmicos que contenían Fab (liberados con TES y Mg) por separado a la unión por método discontinuo 1 hora agitando a 4 °C con 0,8 ml a 1,5 ml (1/20 del volumen de extracto) de resina Talon pre-equilibrada (Clontech), a continuación lavado por método discontinuo en al menos 2 x volúmenes de 20 columnas de tampón de columna. Se cargó la columna con resina Talon, se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de columna y 2 volúmenes de columna de tampón columna más 50 mM de imidazol para liberar las proteínas unidas no específicamente. Se eluyeron los Fabs purificadas con 2 a 3 volúmenes de columna de 200 mM de imidazol, 4 % de glicerol. A continuación, se concentraron /intercambiaron los extractos purificados con un Centricon 10 (Amicon, Inc. Beverly, MA) en PBS, pH 7,4 hasta una concentración final de 0,5 a 5 mg/ml. Se determinó la pureza de Fab "AT" soluble en un gel Bis Tris NuPAGE Novex (San Diego, CA) al 10 % con tampón de deslizamiento NuPAGE MOPS SDS (no reductor) y tampón de muestra 4x LDS (pH 8,45). Se calentaron muestras Fab purificadas que contenían el tampón de muestra LDS a 70 °C durante 10 minutos y se cargaron con 40 µl / línea. Se corrió el gel a 200 voltios, 20 minutos, después se redujo a 50 voltios, -1,5 horas, se manchó con Novex Colloidal Coomassie Blue Stain -14 h, y se destiñó. Se determinó Fab "AT" soluble para que tuviera más de 98 % de pureza.

Ejemplo 5

Actividad de Fabs anti-OPGbp purificadas

Se analizó la actividad de Fabs "AT" e "Y" solubles purificadas con los siguientes ensayos

Ensayo de inhibición de la interacción OPGbp/ODAR

Se midió la interacción de OPGbp humana [143-317] y su receptor ODAR en un ensayo de transferencia de energía por fluorescencia (FRET). Se añadió una hora de pre-incubación con OPGbp para una mayor sensibilidad. Se construyó un dominio extracelular soluble de ODAR humano como polipéptido de fusión con una etiqueta FLAG amino terminal y una región Fc humana carboxi terminal. La región Fc es reconocida por y se une a alofocianina Fc específica anti-humana de cabra policlonal (APC) que es detectada por absorbancia a 665 nm. Se etiquetó OPGbp [143-317] con Eu²⁺ que fue detectado por absorbancia a 620 nm. La unión de OPGbp con ODAR en este ensayo impulsa una transferencia de energía fluorescente y es muy sensible para curvas de competencia. Una disminución en la relación de absorbancia A665/A620 indica la inhibición de la unión de OPGbp a ODAR.

Se observó una inhibición dependiente de concentración de la unión OPGbp-Eu con sODAR-Fc para preparaciones por duplicado de Fabs solubles "AT" e "Y". Fab "AT" soluble (preparación A) inhibió la unión de OPGbp con la fusión ODAR-Fc soluble con una IC₅₀ de 550 nM. Fab "Y" soluble la inhibió con una IC₅₀ de 6 µM. El clon de Fab "AT" 1B5 fue del patrón de 27 miembros predominante desde siete placas de 96 pocillos (todas con la misma secuencia de aminoácido) obtenidas por elución desde la diana OPGbp utilizando una solución de 1 µM OPG[22-194]-Fc durante 90 minutos. El clon de Fab "Y" 1B4 fue del patrón de 9 miembros predominante desde una placa de 96 pocillos (todas con la misma secuencia de aminoácido) desde el tamiz OPGbp depositado en placa optimizado utilizando una elución de OPGbp 1 µM durante 90 minutos. Una segunda purificación del clon de Fab "AT" 6F11 (designada preparación B) produjo una IC₅₀ similar de 440 nM para PBS y una IC₅₀ de 354 nM para TBS. Una segunda purificación de Fab "Y" (preparación B) produjo una IC₅₀ similar de 4,1 µM para TBS. El control positivo fue OPGbp [143-317] en TBS o PBS con las IC₅₀s correspondientes de 0,89 y 0,93 nM, respectivamente. De manera similar, se obtuvieron las IC₅₀ con las preparaciones "A" y "B" por duplicado. Los resultados de la preparación "B" de los Fabs "AT" e "Y" en TBS se muestran en la figura 2.

Ensayo de médula ósea

Se purificaron Fabs "AT", "Y" y "P" solubles como en el ejemplo 4 seguido de dos etapas de separación de endotoxina sucesivas utilizando una columna de afinidad de polimixina (~1 ml; BioRad, Hercules, CA) en PBS a temperatura ambiente con arreglo a las instrucciones del fabricante, a excepción de lo que se señala a continuación. Para aumentar la probabilidad de eliminación de endotoxina unida a Fab, tras cada adición de muestra, se reciclaron partes alícuotas de 100 µl a 150 µl desde el fondo y la parte superior de la columna cada 5 minutos durante 2 a 2,5 horas. Se eluyó Fab con 3 volúmenes de columna de PBS con glicerol al 4 %.

Se sometieron a ensayo las muestras para determinar la endotoxina utilizando el sistema de detección de E-toxato (lisado de amebocitos de limulus) (Sigma, St. Louis MO) con arreglo a las instrucciones del fabricante. A continuación, se esterizaron por filtración las muestras (0,2 µm). Se desnaturalizó Fab "PE tras la purificación y se unió escasamente a OPGbp [143-317] en un ensayo ELISA. Se utilizó como control negativo en estos experimentos.

El formato de ensayo incluye una pre-incubación de 1 hora del Fab anti-OPGbp con 10 ng/ml de OPGbp humano [143-317] (concentración de células final por pocillo). Se llevaron a cabo los ensayos TRAP en solución utilizando sustrato cromogénico pNPP. En la figura 3 se muestran los resultados. Fab "AT" dio una disminución del 50 % (IC50) a 57,8 nM; Fab "Y" dio una disminución del 50 % a 212 nM; Fab "P" dio una disminución del 50 % a 1,5 µM. Se utilizó un peso molecular de Fab estimado de 50.000 en estos cálculos para dar un factor de conversión de 1 µg/ml = 20 nM.

Las IC50 tal como se determinaron por manchado histoquímico TRAP fueron similares a las determinadas en el ensayo pNPP.

Ensayo de células RAW

En la figura 4 se muestran los efectos de añadir Fabs "AT", "Y" y "P" solubles al ensayo de células RAW. El punto 50 % para el gráfico fue tomado como 1,65 OD₄₀₅ nm. Fab "AT" tiene una IC50 de 15 µg/ml, 300 nM (suponiendo un peso molecular Fab de 50.000). Fab "Y" tiene una disminución de la señal a 2,15 OD 405 desde 2,5 OD₄₀₅, un punto 80 %. Por extrapolación, un OD₄₀₅ al punto de 50 % de 1,65 para Fab "Y" se alcanzaría a ~400 µg/ml x 20 = ~8 µM. "P" no presenta ninguna reactividad detectable en el ensayo.

Ejemplo 6

Secuenciado y análisis de clones Fab

Las secuencias de ADN y aminoácido previstas para las cadenas ligeras de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se presentan en las figuras 5, 6, 7 y 8, respectivamente. Las secuencias de ADN y aminoácido previstas para cadenas pesadas de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se presentan en las figuras 9, 10, 11 y 12, respectivamente. La figura 13 presenta una matriz de comparación de la secuencia de aminoácido de la cadena pesada y ligera, respectivamente de los cuatro clones de patrón Fab predominantes en función de la identidad y la similitud. Se obtuvieron la identidad y similitud o bien con programa GCG o bien se calculó a mano. Las secuencias de cadena pesada de Fabs "AT" e "Y" tienen la pareja más próxima ya que difieren en un solo aminoácido (cambio conservador) y por tanto tienen una identidad de 99,6 % y una similitud de 100 %. Se compararon las secuencias de aminoácido de cadena ligera entre los cuatro patrones de arriba tanto la identidad como la similitud entre sí. Fabs "AT", "Y" y "P" presentaron una identidad de al menos 85 % y una similitud de al menos 89 %. El patrón "S" fue el más disimilar al ser de la familia lambda V más rara.

En la figura 14 se muestra una comparación de las secuencias de aminoácido de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs). Los Fabs "AT" e "Y" tuvieron idénticas secuencias de aminoácido de cadena pesada en CDR1, CDR2 y CDR3. La CDR1 de cadena pesada de Fabs "PE y "S" tenían 3 radicales de aminoácido idénticos a los de la secuencia CDR1 "AT" e "Y. La secuencia de CDR2 de "P" y "S" presentó una mayor identidad entre sí que con la secuencia CDR2 de "AT" e "Y". Las cadenas ligeras de Los Fabs "AT" e "Y" presentaron longitudes idénticas a las de CDR1, CDR2 y CDR3. Las CDR 1 y 3 de cadena ligera de patrones "AT" e "Y" presentaron identidad en 7 de 11 radicales (64 %) y 3 de 5 radicales (60 %) respectivamente. Si bien la CDR2 de cadena ligera de patrones "AT" e "Y" no presentan identidad entre sí, cada uno de ellos contiene parte de la secuencia de consenso para la CDR2 de cadena ligera. Cuando se combinaron los primeros 4 radicales del patrón "AT" con los últimos 3 radicales del patrón "Y", se obtuvo la cadena ligera CDR2 del patrón "P". La cadena ligera CDR3 puede variar de longitud desde 5 a 25 radicales. Por lo tanto, las CDR3 de cadena ligera obtenidas en los patrones "AT", "Y" y "P" es muy corta. El más único de los cuatro clones de patrón predominante fue Fab "S".

En la figura 15 se muestra una comparación de las clases Fab representadas en los cuatro patrones predominantes. Estos resultados fueron obtenidos del análisis de gráfico de ADN V-Base. Según lo esperado los Fabs "AT" e "Y" fueron de la misma familia VH1 (familia 1 pesada variable) con las mismas regiones VDJ (Variable, diversidad y unión). Los Fabs "AT" e "Y" pertenecen a diferentes familias de cadena ligera. Los Fabs "P" y "S" pertenecen a la misma familia de cadena pesada VH3, pero a diferentes familias de cadena ligera. Todas las cadenas pesadas tienen las mismas regiones de unión JH4b.

En las figuras 16-18 se muestra un alineamiento de las secuencias Fab y las secuencias de línea germinal correspondientes para las cadenas pesadas y, en las figuras 19-22 para las cadenas ligeras. Los cambios en las cadenas pesada y ligera de "AT", "Y", "P" y "S" son el resultado de metástasis somática natural que tiene lugar en las secuencias de línea germinal de anticuerpo durante la respuesta a anticuerpo. Las regiones variables de las cadenas pesadas "AT" e "Y" (Los aminoácidos 127 amino terminales de las figuras 9 y 10, respectivamente) tuvieron cambios de aminoácido 17 y 18 respectivamente, en comparación con las secuencias de línea germinal VDJ

correspondientes. La región variable de la cadena pesada "P" (los aminoácidos 117 amino terminales en la figura 11) tiene los cambios de aminoácido 16 en comparación con la secuencia de línea germinal VDJ correspondiente. La región variable de la cadena pesada "S" (los aminoácidos 124 amino terminales de la figura 12) tuvieron los cambios de aminoácido 14 en comparación con las secuencias de línea germinal. La región variable de la cadena ligera "AT" (radicales 6-108 en la figura 5) tuvo los cambios de aminoácido 16 en comparación con la secuencia de línea germinal VJ correspondiente; la cadena ligera "Y" (radicales 6-108 en la figura 6) tuvo cambios de aminoácido 14; la cadena ligera "P" (radicales 5-108 en la figura 7) tuvo los cambios de aminoácido 14; y la cadena ligera "S" (radicales 5-112 en la figura 8) tuvo los cambios de aminoácido 12. En general, las diferencias de aminoácido se dieron con mayor frecuencia en las regiones CDR3 de las cadenas tanto pesada como ligera.

Ejemplo 7

Clonación y expresión de anticuerpos OPGbp humana de longitud completa

Se convirtieron clones Fab en anticuerpos de longitud completa siguiendo los procedimientos que se indican a continuación.

Construcción de pDSR α 19:hCH

Se digirió el plasmidio pDSR α 19: EPO con Hind III y SaI para eliminar la región de codificación para eritropoyetina. Se utilizó el plasmidio pCRBluntCH1-3 que contenía los dominios C_H1, bisagra, C_H2 y C_H3 de IgG humana insertados en el vector pCRBlunt (Invitrogen) para obtener un dominio constante IgG1 humano de 1,4 kb. Se digirió pCRBluntCH1-3 con HindIII y SaI y se insertaron las secuencias de dominio constante en pDSR α 19 para generar pDSR α 19:hCH

Construcción de pDSR α 19: AT-VH21

Se clonaron cuatro ADNs de cadena pesada Fab anti-huOPGbp en pDSR α 19: hCH para convertir los Fabs en IgGs de longitud completa. La construcción de un plasmidio que codifica cadena pesada "AT" se describe en el presente documento. Se clonaron las otras cadenas pesadas Fab utilizando procedimientos similares. Para generar Fab con una secuencia de señal, se llevó a cabo PCR en tres etapas. En la primera, se utilizaron los cebadores 2249-25 y 2248-22 con la plantilla de ADNc Fab. Las condiciones fueron: 94 °C durante 1 minuto, (95 °C durante 3 segundos, 50 °C durante 1 minuto, 68 °C durante 1 minuto) durante 20 ciclos, 68 °C durante 10 minutos, con Pfu polimerasa y el tampón y los nucleótidos apropiados. A continuación, se amplificó el producto PCR con los cebadores 2209-21 y 2248-22 seguido de la amplificación con los cebadores 2209-20 y 2248-22. Se limpió el producto PCR final, se cortó con HindIII y BsmBI, y se purificó con gel. Este fragmento contiene el Fab con un sitio 5'-Kozak (iniciación de traducción) y la siguiente señal de secuencia de señal para expresión de mamífero de la cadena pesada "AT" de Fab:

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS (SEQ ID NO: 25)

Esta secuencia de señal se designa la secuencia de señal VH2₁.

Se digirió el plasmidio pDSR α 19: hCH con HindIII y BamBI para eliminar el poliligador antes de los dominios C_H1-3 de IgG y se insertó el producto PCR Fab para generar pDSR α 19: AT-VH21.

Cebadores:

```

                HindIII  Kozak
2209-20 5'-CAGAAGCTTAGACCACC ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC T-3'
(SEQ ID NO: 26 Y 27)
                M E W S W V F L F

2209-21 5'-G AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACG ACT GGT GTC CA-
3'(SEQ ID NO: 28 Y 29)
                S W V F L F F L S V T T G V

2249-25 5'-TCA GTA ACG ACT GGT GTC CAC TCA CAG GTC CAG CTG GTG CAG-3'
(SEQ ID NO: 30 Y 31)
                S V T T G V H S Q V Q L V Q

                BsmBI
2248-22 5'-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTGACC AGG GTG-3' (SEQ ID NO: 32)

```

Construcción de pDSR α 19: AT-L

Se clonaron los ADNs de cadena ligera Fabs "AT", "Y", "P" y "S" en pDSR α 19 para convertir los Fab en anticuerpos

de longitud completa. Se describe aquí la construcción de un plasmidio que codifica la cadena ligera "AT". Se clonaron los otros Fab utilizando procedimientos similares. Para generar Fab "AT" con una secuencia de señal, se llevó a cabo la PCR en tres etapas. En la primera, se utilizaron los cebadores 2233-50 y 2233-51 con la plantilla de ADNc Fab. Las condiciones de PCR fueron: 94 °C durante 1 minuto (95 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 minuto, 68 °C durante 2 minutos) durante 20 ciclos, 68 °C durante 10 minutos con Pfu polimerasa y el tampón y los nucleótidos apropiados. A continuación, se amplificó el producto de PCR con los cebadores 2148-98 y 2233-51 seguido de la amplificación con los cebadores 2148-97 y 2233-51. Se limpió el producto PCR final, se cortó con HindIII y Sail, y se purificó con gel. Este fragmento contiene el Fab con un sitio 5' Kozak (iniciación de la traducción) y la siguiente secuencia de señal para expresión de mamífero de la cadena ligera de "AT":

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 33)

Esta secuencia de señal se designa secuencia de señal "ligera".

Se digirió el plasmidio pDSR α 19: EPO con HINDIII y Sail para eliminar el gen EPO antes de insertar el producto de PCR de cadena ligera de IgG para generar pDSR α 19: AT-L.

Cebadores:

HindIII Kozak

2148-97 5'-CAGAAGCTTGACCACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GG-
3' (SEQ ID NO: 34 Y 35)

M D M R V P A Q L L

2148-98 5'-CC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA TTG TGG TTG AGA GGT GCC AGA
T-3' (SEQ ID NO: 36 Y 37)

A Q L L G L L L L

W L R G A R

2233-50 5'-G TGG TTG AGA GGT GCC AGA TGT GAA ATT GTG ATG ACA CAG TCT C-
3' (SEQ ID NO: 38 Y 39)

W L R G A R C E I V M T Q S

SaI

2233-51 5'- TTTGGACGTCGAC TTA TTA ACA CTC TCC CCT G-3' (SEQ ID NO: 40 Y
41)

* * C E G R

Construcción de pDSR α 19: AT-tPA

Se construyeron los vectores de expresión para la producción de cadenas pesadas de longitud completa "AT", "Y", "P" y "S" tal como se ha descrito anteriormente, a excepción de que se modificaron los cebadores para introducir la siguiente secuencia de señal:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSRGRFR (SEQ ID NO: 42)

Esta secuencia de señal se designa la secuencia de señal "tPA-RGR".

Construcción de pLDH-AT

Se construyó el vector de expresión que incluía las cadenas pesada y ligera de "AT". Se digirió el plasmidio pDSR α 19: AT-Vh21 con AatII y NdeI y se cargaron los extremos con T4 ADN polimerasa. Se purificó con gel el fragmento que contenía el cassette de expresión de cadena pesada "AT" (secuencia de codificación de cadena pesada "AT" flanqueada por el promotor y el sitio de poliadenilación desde pDSR α 19) y se ligó con pDSR α 19: AT-L que había sido linearizado con NheI, cargado con T4 ADN polimerasa y desfosforilado con fosfatasa alcalina. El cassette de expresión de cadena pesada se encontraba en la misma orientación de transcripción que la cadena ligera y los genes DHFR.

Preparación de anticuerpo

Se transfectaron los vectores de expresión que contenían ADNc de codificación de anticuerpos de longitud completa de cadena pesada y ligera "AT", "Y", "S" y "P" (o bien en vectores separados o bien en un único vector) en células CHO y se cultivaron en condiciones que permitieron la expresión de cadenas pesada y ligera y la secreción en el medio de células. Se filtraron los medios acondicionados a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μ m (Corning, Acton, MA) y se aplicó a columna de sefarosa de proteína G (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) que había sido equilibrada con PBS – solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin cloruro cálcico y sin cloruro de magnesio (Gibco BRL Products, Grand Island NY). Tras la aplicación de muestra se lavó la columna con PBS hasta que la absorbencia a 280 nm alcanzó la línea de referencia. Se consiguió la elución de proteína utilizando glicina 100 mM, pH 2,5. Se recogieron fracciones y se neutralizaron inmediatamente por adición de Tris-HCl 1M, pH 9,2. Se detectaron los anticuerpos con geles de SDS-poliacrilamida visualizados por manchado Comassie.

Se distribuyeron las fracciones que contenían anticuerpo, se concentraron y se diafiltraron en PBS utilizando o bien Centricon 10 (Amicon) o bien, para volúmenes más grandes Centriprep 10 (Amicon).

5 El anticuerpo aislado se caracterizó por filtración de gel en Superose 6 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se demostró que corría como una IgG monomérica.

Ejemplo 8

10 Análisis BIAcore de Fab y unión de anticuerpo a OPGbp

Se determinaron la constante de unión (K_d), constante de velocidad de encendido (k_a) y constante de velocidad de apagado (k_d) para los Fabs "AT" e "Y" y se determinó el anticuerpo "AT" a través de técnicas de resonancia de plasmón superficial (BIAcore, Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey) cuyos resultados se muestran en la tabla II. Se prepararon Fabs tal como se ha descrito en el ejemplo 4 y se preparó anticuerpo "AT" tal como se ha descrito en el ejemplo 7. Se inmovilizó OPGbp en un CM5-chip por acoplado con amina normal. Se determinaron las constantes de velocidad y K_d con el programa informático BIOEVALUATION 3.0 (Pharmacia).

TABLA II

20 Análisis BIAcore de Fabs "AT" e "Y" y anticuerpo "AT"

| | K_a ($M^{-1}s^{-1}$) | K_d (s^{-1}) | K_D (nM) |
|------------------|--------------------------|-----------------------|------------|
| Fab "Y" | $9,44 \times 10^5$ | $5,91 \times 10^{-3}$ | 594 |
| Fab "AT" | $2,2 \times 10^6$ | 0,31 | 140 |
| "AT" Ab (147 RU) | $5,7 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^{-3}$ | 0,42 |
| "AT" Ab (80 RU) | $8,1 \times 10^6$ | $2,7 \times 10^{-3}$ | 0,33 |
| "AT" Ab (47 RU) | $7,3 \times 10^6$ | $3,1 \times 10^{-3}$ | 0,43 |

25 La afinidad de unión de Fab "AT" aumentó de aproximadamente 140 nM a aproximadamente entre 0,33 y 0,43 nM, o aproximadamente 350 a 400 veces más, cuando se añadió la región constante de IgG1 Fc como se describe en el ejemplo 7

Ejemplo 9

30 Actividad de anticuerpos anti-OPGbp

Ensayo de células RAW

35 Se sometieron a ensayo preparaciones de anticuerpo "AT" designadas 405, 406 y 407 en un ensayo de células RAW tal como se ha descrito en el ejemplo 1. "AT" 405, "AT"406 y "AT"407 difirieron solamente en las secuencias líder utilizadas para expresión ("AT" 405 fue expresado utilizando la secuencia de señal "ligera", "AT"406 utilizó la secuencia de señal tPA-RGR y "AT"407 utilizó la secuencia de señal VH21). Los anticuerpos maduros purificados fueron idénticos en cada preparación. En la figura 23 se muestran los resultados.

40 Las IC50 para "AT" 405, "AT" 406 y "AT"407 fueron 20,1 nM, 60,3 nM y 21,4 nM, respectivamente, que corresponden a 3,0 ug/ml, 9,0 ug/ml y 3,2 ug/ml, respectivamente (presuponiendo un peso molecular de 150.000). Los controles positivos de OPG[22-194]-Fc y anticuerpo policlonal anti-OPGbp fueron a 33 ng/ml y 150 ng/ml, respectivamente.

45 La diferencia en IC50 en el ensayo de células RAW del fragmento Fab "AT" fue 300 nM en comparación con aproximadamente 20 nM para la longitud completa "AT", o aproximadamente 15 veces más para el anticuerpo de longitud completa "AT". Teniendo en cuenta las diferencias en las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos ($150 \text{ ng/ml}/60 \text{ ng/ml} = 2,5$ veces), el aumento en la avidéz de la función celular para el anticuerpo de longitud completa "AT" fue aproximadamente $15 \times 2,5 = 37,5$ veces.

Ensayo de médula ósea

50 En la figura 24 se muestran los efectos de la adición de preparaciones de "AT"405 o "AT"407 al ensayo de médula ósea murínica. Las IC50 para "AT"405 y "AT"407 fueron 2,15 ug/ml (14,4 nM) y 1,85 ug/ml (12,5 nM), respectivamente (peso molecular = 150.000). Un anticuerpo policlonal anti-OPGbp de rata inhibió la formación TRAP con una IC50 de ~50 ng/ml.

55 En un experimento por separado, se sometió a ensayo "AT"406 en el ensayo de co-cultivo de médula ósea e inhibió la formación TRAP con una IC50 de 2,35 ug/ml (14,4 nM) asumiendo un peso molecular de anticuerpo de 150.000 (ver figura 25).

60 La diferencia en la IC50 en el ensayo de médula ósea para el fragmento Fab "AT" fue aproximadamente 50 nM en

comparación con aproximadamente 13 nM para anticuerpo de longitud completa "AT" o un aumento de 3,85 veces más. Teniendo en cuenta las diferencias de las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos (50 nM /9 nM = 5,55 veces), la ganancia aproximada de avidez de función celular a partir del anticuerpo de longitud completa "AT" fue aproximadamente $3,85 \times 5,55 = 21,4$ veces.

5 Se fusionaron también ADNc que codificaban Fab "Y", "P" y "S" para secuencias CH1, CH2, y CH3 de IgG1 humana tal como se describe en el ejemplo 7 y se transfectoron en células CHO. Se expresaron los anticuerpos resultantes y se purificaron desde medio acondicionado y se eliminó la endotoxina como en el caso anterior. Se sometieron a ensayo los anticuerpos de cadena ligera "S" e "Y" (que recibieron el nombre de "S ligero" e "Y ligero") en el ensayo de médula ósea, mostrándose los resultados en la figura 26. Los anticuerpos "S ligero" e "Y ligero" fueron expresados utilizando las secuencias líder de cadena ligera correspondientes y se designaron "S" 435 e "Y" 429 respectivamente. "Y" 429 ("Y ligero") tenía una IC50 de 23 ug/ml o 154 nM. "S" 435 ("S ligero") no presentó suficiente actividad para una determinación de una IC50.

15 "Y Campath" y "P ligero" fueron la secuencia Hu-IgG1 "Y" y "P", respectivamente, con la secuencia líder para la cadena "Campath" y "ligera" y se designaron "Y" 442 y "P" 444, respectivamente. "Y" 442 ("Y Campath") tenía una IC50 de 20 ug/ml o 134 nM. "P" 444 ("P ligera") no presentó una actividad detectable (ver figura 27).

20 La diferencia en la IC50 en el ensayo de la médula ósea del fragmento "Y" Fab fue 212 nM en comparación con 134-154 nM para el anticuerpo de longitud completa "Y" o un aumento de aproximadamente 1,38 a 1,58 veces. Teniendo en cuenta las diferencias de las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos (50 nM/9 nM = 5,55 veces), la ganancia aproximada en la avidez de la función celular desde "Y" Fab a anticuerpo de longitud completa "Y" fue aproximadamente $(1,38 \text{ a } 1,58) \times 5,55 = 7,7 \text{ a } 8,8$ veces o aproximadamente 8 veces más.

25 Ejemplo 10

Identificación de epítipo para anticuerpo "AT" sobre OPGbp

30 Producción de OPGbp murínica variante

Se produjo OPGbp [143-317] humana tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Se produjo OPGbp [158-316] murínica que contenía los radicales de aminoácido 158 a 316 tal como se muestra en la figura 1 de PCT WO 98/46751 precedido de un radical de metionina N-terminal introducido en E. coli y se purificó desde la fracción soluble de bacterias, tal como se ha descrito anteriormente (Lacey y cols., Cell. 93, 165-176 (1998)). Se generó OPGbp[158-316] FLAG-murínico por introducción de radicales de ácido nucleico que codificaban una metionina N-terminal seguido de una secuencia de etiqueta FLAG (DYKDDDDKKL (SEQ ID NO: 99)) fusionada con el término N de los radicales 158-316, tal como se muestra en la figura 1 de PCT WO 98/46751 utilizando métodos conocidos entre las personas especializadas en este campo. Se clonó la molécula FLAG-OPGbp [158-316] en el vector de expresión de bacteria pAMG21 (depositado en la American Type Culture Collection que tenía el número de acceso 98113).

45 Se construyó una variante de polipéptido OPGbp [158-316] FLAG-murínica donde se habían sustituido los radicales de aminoácido SVPTD en las posiciones 229-233 inclusive, tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) de WO 98/46751 con los radicales de aminoácido correspondientes DLATE en las posiciones 230-234 inclusive, tal como se muestra en la figura 4 (SEQ ID NO: 3) de WO 98/46751. El constructo resultante que se denomina "OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínico" tiene la secuencia de ácido nucleico y proteína que se muestra en la figura 28. Los cambios en la secuencia de aminoácido se localizan en una región de OPGbp comprendida entre las regiones D y E. La figura 29 presenta una comparación de las secuencias de aminoácido murínica, humana, y variante DE murínica en esta región. Los cambios de secuencia en la variante murínica son S229D, V230L, P231A y D233E con la T en la posición 234 invariable. Las secuencias de flanqueo en esta región son virtualmente idénticas entre OPGbp murínica y humana.

55 Se construyó esta molécula utilizando una reacción PCR de dos etapas, comprendiendo la primera etapa dos reacciones PCR por separado, designadas reacción A y reacción B. tanto para la reacción A como para la reacción B se utilizó ADN OPGbp[158-316] pAMG21-FLAG murínico como plantilla para PCR. La reacción A empleó oligonucleótidos #2640-90 y #2640-91 para PCR, mientras que la reacción B empleó oligonucleótidos #2640-92 y 2640-93. Se llevó a cabo el termociclado y se purificaron los productos de PCR de las reacciones A y B desde un gel de agarosa aplicando los métodos disponibles en la especialidad. La reacción de PCR en segunda etapa, designada reacción C, empleó productos de PCR de reacción A y reacción B purificados como plantilla y oligonucleótidos #2640-90 y #2640-93 como cebadores. Tras el termociclado, se clonó el producto de la reacción C en vector de clonación pCRII-TOPO (invitrogen) y se electroporó en células DH10b (Gibco) utilizando los métodos proporcionados por el fabricante. Se seleccionaron clones y se confirmó la secuencia que verificaba que las mutaciones introducidas tenían como resultado un cambio de la secuencia de aminoácido SVPTD en OPGbp [158-316] murínica en DLATE. La secuencia verificó que se había digerido entonces ADN con NdeI y XhoI, se había purificado y se había subclonado en el vector de expresión bacteriana pAMG21 para dar lugar al plasmidio pAMG1-FLAG-murínico OPGbp[158-316]/DE.

2640-90: CCTCTCATATGGACTACAAGGAC (SEQ ID NO: 100)
 2640-91: AGTAGCCAGGTCTCCCGATGTTTCATGATG (SEQ ID NO: 101)
 2640-92: CTGGCTACTGAATATCTTCAGCTGATGGTG (SEQ ID NO: 102)
 2640-93: CCTCTCCTCGAGTTAGTCTATGTCC (SEQ ID NO: 103)

Se cultivó el huésped GM94 de E. coli (depositado en la American Type Culture Collection con el número de acceso 202173) que contenía el plasmidio pAMG21-FLAG-murínico OPGbp [158-316]/DE en medio 2x YT hasta una fase de crecimiento exponencial y se indujo para que expresara proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica por adición de autoinductor v. Fisheri sintético a 100 ng/ml. Aproximadamente 3-6 horas después de la inducción, se aglomeraron las células y se purificó proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG murínica recombinante desde la fracción soluble de E. coli utilizando los métodos descritos en Lacey y cols. *ibid*.

Unión de anticuerpo "AT" a OPGbp[143-317] humana, OPGbp[158-316] murínica y OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica

Se recubrieron placas Costar E.I.A./R.I.A. (Flat Botton Hig Binding, Cat. # 3590) con 100 µl/pocillo de proteína OPGbp[143-317] humana, proteína OPGbp[158-316] murínica y proteína OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica a 3 µg/ml en PBS, durante toda la noche a 4 °C con agitación. Tras toda la noche de incubación, se sacaron las soluciones de proteína de la placa y se añadieron 200 µl de suero de pollo al 5 % (Gibco/BRL cat # 16110-082) en PBST (PBS más 0,05 % Tween 20) a cada pocillo de la placa y se incubaron las placas a temperatura ambiente (RT) durante 90 minutos con agitación. Tras la incubación y el bloqueo se lavaron las placas 4 veces con solución de lavado 1 X K-P en dH₂O (cat# 50-63-00, Kirkegaard & Perry Laboratories) y se secaron. Se diluyó en serie el anticuerpo "AT" purificado o la proteína OPG[22-194]-Fc humana 1:1 desde 2 µg/ml descendientemente hasta 1,953 ng/ml en PBST y se añadieron 100 µl/pocillo a los pocillos apropiados de la placa de microvaloración recubierta con proteína OPGbp[143-317] humana, OPGbp[158-316] murínica o OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica. Se incubaron las placas durante tres horas a temperatura ambiente, con agitación, se lavaron cuatro veces con solución de lavado 1 x K-P y se secaron. Se diluyó IgG anti-humana de cabra (Fc) (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-036-098) 1:5000 en suero de pollo al 5 % en PBST y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 1,25 horas a temperatura ambiente con agitación, se lavaron seis veces con solución de lavado 1 X K-P y se secaron. Se añadieron 100 µl de sustrato ABTS sin diluir (Kirkegaard & Perry; cat · 50-66-00) a cada uno de los pocillos y se incubó el plato a temperatura ambiente hasta que se reveló suficiente color azul-verde. Se detuvo el revelado del color por adición de 100 µl % SDS. Se llevó a cabo la cuantificación del revelado de color utilizando una lectora de placa de microvaloración con detección a 405 nm.

En la figura 30 se muestran los resultados de EIA. El anticuerpo "AT" se une a OPGbp[143-317] humana pero no muestra una unión detectable a OPGbp [158-316] murínica por encima del intervalo de concentración analizado. No obstante, el anticuerpo "AT" se une tanto a OPGbp[158-316]/DE FLAG-murínica como OPGbp[143-317] humana en las condiciones de ensayo mencionadas. Se concluyó que los cambios de aminoácido en OPGbp[158-316]/DE murínico en comparación con OPGbp[158-316]/DE murínica tenían relación con la unión de anticuerpo "AT".

Se sometió a ensayo OPGbp[143-317] /DE FLAG-murínico para determinar la actividad en el ensayo de células RAW tal como se ha descrito en el ejemplo 1 y se observó que tenía ED50 similar para la formación de osteoclasto con respecto a OPGbp[143-317] humana, lo que indica que la variante DE es activa para promover la actividad de osteoclasto *in vitro*. Por consiguiente, la unión de anticuerpo "AT" a OPGbp[158-316]/DE murínica probablemente inhibe la formación de osteoclasto.

El epítipo del anticuerpo "AT" está localizado en una región de OPGbp humana que incluye al menos radicales de aminoácido DLATE (radicales 230 a 234 de OPGbp humana tal como se muestra en la figura 4 de PCT WO98/46751).

Ejemplo 11

Construcción de variantes de Fab "AT" y variantes de anticuerpo

Se utilizaron tres métodos para generar variantes CDR de anticuerpo "AT"; mutagénesis de exploración de alanina de la región CDR3 de cadena pesada; mutagénesis de sustitución de sitios seleccionados en la región CDR3 de cadena pesada y mutagénesis de inserción de la región CDR3 de cadena ligera.

Variantes de alanina de CDR3 de cadena pesada

Se llevó a cabo la mutagénesis de exploración de alanina en la región CDR3 de la cadena pesada AT. La secuencia de aminoácido para la exploración de alanina fue:

DSSNMVIRGIIIAYFDY (SEQ ID NO: 104)

Se sometieron a anelación los cebadores 12 y 15 entre sí y se extendieron por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en las siguientes condiciones: 25 pmoles para cada cebador, 6 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 2 minutos a 55 °C y 20 segundos a 74 °C.

12) 5' AGA GAT TCC TCA AAT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA GCG (SEQ ID NO: 105)

15) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT TCC CCG AAC (SEQ ID NO: 106)

5 El producto de esta reacción recibe el nombre de plantilla A.

Se extendió la plantilla A por PCR utilizando los cebadores 22 y 14 en las siguientes condiciones: 0,5 microlitros de plantilla A, 10 pmoles cada cebador, 15 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 2 minutos a 43 °C, 20 segundos a 74 °C.

10 11) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC TCA AAT ATG (SEQ ID NO: 107)

14) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA GTA CGC (SEQ ID NO: 108)

El producto PCR de esta reacción recibe el nombre de plantilla B.

15 Se generaron variantes de alanina de CDR3 utilizando la plantilla A o la plantilla B. Se realizaron dos vueltas de PCR (20 ciclos de 94 °C durante 20 segundos y 74 °C durante 40 segundos) utilizando un cebador que contenía el codón alanina deseado. El cebador que contenía el codón de alanina se encontraba en la orientación de avance para los radicales CDR3 (la numeración sigue el sistema Kabat, ver Kabat y cols., Sequences de Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 4ª edición (19991) D95, S96, V100, R100a. El cebador que contenía el codón de alanina se encontraba en la orientación invertida para los radicales S97, N98, M99, G100b, I100c, I100d, I100e, Y100g, Y100h, F100i, D101, Y102.

20 A continuación, se realizaron las reacciones de mutagénesis con hasta tres reacciones de extensión utilizando seis cebadores comunes. Estas reacciones extendieron el producto para abarcar toda la región CDR3 hasta los sitios de restricción de flanqueo únicos BgIII y BstEII, e incluyéndolos.

25 A continuación, se muestran los cebadores para la sustitución de alanina en la orientación 5' a 3'. El codón de alanina aparece en negrita.

60) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA **GCT** TCC TCA AAT ATG GTT CGG (SEQ ID NO: 109)

59) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT **GCC** TCA AAT ATG GTT CGG (SEQ ID NO: 110)

58) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT **TGC** GGA ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 111)

57) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT **AGC** TGA GGA ATC TCT CGC ACA (SEQ ID NO: 112)

56) 5' AAT AAT TCC CCG AAC **GGC** ATT TGA GGA ATC TCT CGC (SEQ ID NO: 113)

55) 5' GAT TCC TCA AAT ATG **GCT** CGG GGA ATT ATT ATA GCG (SEQ ID NO: 114)

54) 5' GAT TCC TCA AAT ATG GTT **GCC** GGA ATT ATT ATA GCG TA (SEQ ID NO: 115)

53) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT **TGC** CCG AAC CAT ATT TGA (SEQ ID NO: 116)

52) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT **GGC** TCC CCG AAC CAT ATT (SEQ ID NO: 117)

51) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT **GGC** AAT TCC CCG AAC CAT (SEQ ID NO: 118)

50) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC **TGC** AAT AAT TCC CCG AAC (SEQ ID NO: 119)

20) 5' GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA **GGC** CGC TAT AAT AAT TCC (SEQ ID NO: 120)

19) 5' GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA **AGC** GTA CGC TAT AAT AAT TCC (SEQ ID NO: 121)

18) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC **AGC** ATA GTA CGC TAT AAT (SEQ ID NO: 122)

17) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA **GGC** AAA ATA GTA CGC TAT (SEQ ID NO: 123)

30 16a) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA **GGC** GTC AAA ATA GTA CGC TAT (SEQ ID NO: 124)

A continuación se muestran los seis cebadores comunes para PCR de extensión. Las secuencias de los sitios BgIII (hebra superior) BstEII (hebra inferior) de flanqueo se muestran en negrita.

35 Cebadores comunes directos

10) 5' AGT CTG **AGA TCT** GAA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA (SEQ ID NO: 125)

11) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC TCA AAT ATG (SEQ ID NO: 126)

12) 5' AGA GAT TCC TCA AAT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA GCG (SEQ ID NO: 127)

Cebadores comunes inversos

40 13) 5' CTT GAG ACG **GTG ACC** AGG GTG CCC TGG CCC CA (SEQ ID NO: 128)

14) 5' CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA ATA GTA CGC (SEQ ID NO: 129)

15) 5' GTA GTC AAA ATA GTA CGC TAT AAT AAT TCC CCG AAC (SEQ ID NO: 130)

5 En la tabla que se muestra a continuación, se indican los pares de cebador y plantilla de partida utilizados en secuencia para construir fragmentos de ADN sintéticos que contienen radicales de alanina sustituidos.

TABLA III

| Radical CDR | Plantilla | Reacciones PCR | | | |
|-------------|-----------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Para cebador de alanina | Cebadores de extensión | Cebadores de extensión | Cebadores de extensión |
| D95 | A | 60 + 14 | 10 + 13 | | |
| S96 | A | 59 + 14 | 10 + 13 | | |
| S97 | B | 10 + 58 | 10 + 15 | 10 + 14 | 10 + 13 |
| N98 | B | 10 + 57 | 10 + 15 | 10 + 14 | 10 + 13 |
| M99 | B | 10 + 56 | 10 + 15 | 10 + 14 | 10 + 13 |
| V100 | A | 55 + 14 | 10 + 14 | 10 + 13 | |
| R100a | A | 54 + 14 | 10 + 14 | 10 + 13 | |
| G100b | A | 11 + 53 | 10 + 14 | 10 + 13 | |
| I100c | A | 11 + 52 | 10 + 14 | 10 + 13 | |
| I100d | A | 11 + 51 | 10 + 14 | 10 + 13 | |
| I100e | A | 11 + 50 | 10 + 14 | 10 + 13 | |
| Y100g | B | 11 + 20 | 10 + 13 | | |
| Y100h | B | 11 + 19 | 10 + 13 | | |
| F100i | B | 11 + 18 | 10 + 13 | | |
| D101 | B | 11 + 17 | 10 + 13 | | |
| Y102 | B | 11 + 16a | 10 + 13 | | |

10 Para los cebadores utilizados para la exploración de alanina, las condiciones de PCR fueron 20 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, a continuación 74 °C durante 40 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 + 15, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 42 °C durante 1 minuto 30 segundos, 74 °C durante 20 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 a 14, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 48-50 °C durante 1 minuto 30 segundos, 74 °C durante 20 segundos. Para las reacciones de extensión con el par de cebadores 10 a 13, las condiciones fueron 20-25 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 64 °C durante 1 minuto 30 segundos, 74 °C durante 20 segundos. Se digirieron los productos de PCR con las enzimas de restricción BglIII y BstEII y se clonaron en Fab AT que había sido digerido con BglIII y BstEII, reemplazando así la CDR3 de AT con la CDR3 sustituida de alanina. Se verificaron los constructos sustituidos con alanina por secuenciado con ADN.

20 Variantes de sustitución de CDR3 de cadena pesada

25 Se utilizó una estrategia similar a la utilizada para la mutagénesis de exploración de alanina para la aleatorización de las posiciones S96, S97 y N98 de la CDR3 de "AT" de cadena pesada. Se generaron las plantillas A y B tal como se ha descrito previamente. Se aleatorizaron las posiciones 96, 97 y 98 con un grupo de cuatro cebadores para cada posición. Las posiciones entre paréntesis tienen nucleótidos variables tal como queda indicado.

para la posición S96

- 23) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA G(AT) (ACGT) ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 131)
 24) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA G(CG) (ACGT) ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 132)
 25) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA CT(CGT) ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 133)
 26) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA C(AC) (AT) ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 134)

30 Para la posición S97

- 27) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT G(AT) (ACGT) GGA ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 135)
 28) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT G(CG) (ACGT) GGA ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 136)
 29) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT CT(CGT) GGA ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 137)
 30) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT C(AC)(AT) GGA ATC TCT CGC ACA GTA (SEQ ID NO: 138)

Para la posición N98

- 31) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT G(AT) (ACGT) TGA GGA ATC TCT CGC ACA (SEQ ID NO: 139)
 32) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT G(CG)(ACGT) TGA GGA ATC TCT CGC ACA (SEQ ID NO: 140)
 33) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT CT(CGT) TGA GGA ATC TCT CGC ACA (SEQ ID NO: 141)
 34) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT C(AC)(AT) TGA GGA ATC TCT CGC ACA (SEQ ID NO: 142)

ES 2 738 798 T3

Se realizaron las reacciones de PCR utilizando el cebador de aleatorización inversa y el cebador 10. Se extendió el producto resultante con cuatro reacciones PCR sucesivas utilizando los pares de cebadores 10 + 15, 10 + 14, 10 + 13 y 10 + 22. Se amplificó el extremo 5' de la región variable de cadena pesada de "AT" a partir de un clon de longitud completa de la región variable de cadena pesada "AT" utilizando los cebadores 16 y 72. Se purificaron con gel todos los productos PCR. Se solaparon los productos de aleatorización con el producto 16/72, siendo los cebadores de flanqueo 16 y 22. A continuación, se clonó la región variable de longitud completa en un vector que contenía la región constante IgG1 como un fragmento HindIII/BsmBI. Se seleccionaron los clones de anticuerpo de longitud completa por secuenciado.

Los cebadores utilizaron la PCR de superposición para aleatorización de mutantes

10 5' AGT CTG AGA TCT GAA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA (SEQ ID NO: 143)

16 5' CAG CAG AAG CTT AGA CCA CCA TGG ACA TGA GGG TCC CCG CTC AGC TCC TGG G (SEQ ID NO: 144)

72 5' CAC AGC CGT GTC TTC AGA TCT CAG ACT GCG CAG CTC (SEQ ID NO: 145)

22 5' GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTG (SEQ ID NO: 146)

Se convirtieron las variantes S96A, S97A y N98A desde Fabs a anticuerpos de longitud completa por amplificación por PCR del clon Fab que tenía la secuencia de señal bacteriana reemplazada con una secuencia de señal de mamífero. Se utilizó el ADN de plasmidio del Fab que contenía la mutación deseada como plantilla. Los pares de cebador en secuencia utilizados fueron 21 + 22, 98 + 22 y 16 + 22. Se seleccionaron clones correctos por análisis de secuencia de ADN.

Se generaron variantes de alanina múltiples (S96A, S97A; S96A, N98A; S97A, N98A y S96A, S97A y N98A) utilizando el plasmidio de IgG1 de longitud completa de cadena pesada de AT como plantilla. Se llevaron a cabo las reacciones PCR iniciales con uno de los cebadores enumerados a continuación y el cebador 22. A continuación, se extendieron estos productos utilizando pares de cebador 10 + 22. A continuación, se solapó ese producto con el producto 16/72 utilizando cebadores de flanqueo 16 y 22, y se clonaron en la región constante de IgG1 como en el caso anterior. Se seleccionaron clones correctos por análisis de secuencia de ADN.

S96A, S97A

63) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC GCA AAT ATG GTT CGG GGA ATT ATT (SEQ ID NO: 147)

S96A, N98A

64) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC TCA GCT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 148)

S97A, N98A

65) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TCC GCA GCT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 149)

S96A, S97A, N98A

66) 5' GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GCC GCA GCT ATG GTT CGG GGA ATT ATT ATA GC (SEQ ID NO: 150)

21) 5' GTG GTT GAG AGG TGC CAG ATG TCA GGT CCA GCT GGT GCA G (SEQ ID NO: 151)

98) 5' CCG CTC AGC TCC TGG GGC TCC TGC TAT TGT GGT TGA GAG GTG CCA GAT (SEQ ID NO: 152)

Variantes de inserción de la región CDR3 de cadena ligera

La CDR3 de cadena ligera de AT contiene un bucle de cinco aminoácidos que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09). Se construyeron las variantes de secuencia de CDR3 de cadena ligera del siguiente modo. Se utilizaron los siguientes cebadores para PCR utilizando un plasmidio que contenía ADNc de cadena ligera "AT" Fab como plantilla:

(HincII)CCG GTC AAC ACA CT(ACGT)(ACGT)(GT)G CGG CGG CGC GGG CGT TCG GCC AAG GG (SEQ ID NO: 153)

indicando (ACGT) cuatro bases mixtas en esta posición.

CCG GGC GCG CCT TAT TAA CAC TC(Ascl) (SEQ ID NO: 154)

El producto PCR resultante tenía una secuencia de bucle CDR3 aumentada de cinco a nueve aminoácidos y cambió desde QHTRA A GHTXAAARA pudiendo ser X cualquier aminoácido. Se digirió un clon de AT con digestión HincII y Ascl y se reemplazó la región CDR3 de cadena ligera de "AT" con la secuencia variante. Se aislaron los clones que contenían los veinte radicales de aminoácido en la posición X junto con tres radicales de alanina insertados en el bucle CDR3 y se confirmó su identidad por secuenciado de ADN.

Purificación y variantes Fab

Se produjeron variantes de sustitución de alanina de la CDR3 de cadena pesada y variantes de inserción de CDR3 de cadena ligera y se purificaron como fragmentos Fab a través del siguiente procedimiento. Se cultivó cada variante en 50 ml de 2XYT con glucosa al 2 % y 100 µg/ml de ampicilina al mismo tiempo que se agitaba a 37 °C hasta un OD₆₀₀ de 0,8-1,0. A continuación, se centrifugó cada cultivo y se resuspendió en 50 ml de 2XYT con 100 µg/ml de ampicilina con 1 mM IPTG a 30 °C para inducir la producción de Fabs solubles. A continuación, se desplazaron las Fab solubles al área periplásmica y se concentraron durante toda la noche antes de la liberación por choque osmótico. Se llevó a cabo el choque osmótico por lavado de las células con solución de sacarosa 0,5 M fría en tampón Tris y EDTA para romper la pared celular bacteriana y a continuación, por dilución rápida en solución fría de concentración osmótica baja. Se purificaron las Fabs solubles diluidas por cromatografía de afinidad de metal TALON a través de 6 x radicales etiquetados con His en la Fab expresada. Se eliminaron las impurezas por lavado con NaCl y concentraciones de imidazol más bajas antes de eluir la proteína con imidazol. Se analizó la expresión y purificación de cada mutante con manchas de reducción, no reducción y de Western anti-His. Se determinó la concentración de proteína total por A₂₈₀.

Ejemplo 12

Análisis BIAcore de variantes "AT"

Se determinaron la constante de unión (Kd) la constante de velocidad de encendido (Ka) y la constante de velocidad de apagado (kd) para las variantes de anticuerpo "AT" y la constante de velocidad de apagado (Kd) para las variantes Fab "AT" por técnicas de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) utilizando OPGbp [143-317] inmovilizada. En las tablas IV –VIII se muestran los resultados. Las variantes CDR3 de cadena ligera descritas en el ejemplo 11 no muestran una unión detectable.

TABLA IV

| Análisis BIAcore de Fabs "AT" desde mutagénesis de exploración de alanina de CDR3 de cadena pesada | |
|--|------------------------|
| | Kd (s ⁻¹) |
| AT (alaninas no sustituidas) | 0,284 |
| D95A | sin unión detectable |
| S96A | 7,20 x10 ⁻³ |
| S97A | 6,20x10 ⁻³ |
| N98A | 1,20x10 ⁻² |
| M99A | 1,12 |
| V100A | 0,261 |
| R(100a)A | 0,303 |
| G(100b)A | 0,657 |
| I(100c)A | 0,53 |
| I(100d)A | 0,622 |
| I(100e)A | 6,90x10 ⁻³ |
| A(100f) | 0,197 |
| Y(100g)A | 7,4x10 ⁻² |
| Y(100h)A | 0,368 |
| F(100i)A | 0,251 |
| D110A | 0,127 |
| Y111A | 0,414 |

TABLA V

| Análisis BIAcore de Abs "AT" de mutagénesis de exploración de alanina de CDR3 de cadena pesada | | | |
|--|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | Ka (M ⁻¹ s ⁻¹) | Kd (s ⁻¹) | K _D (nm) |
| AT | 1,70x10 ⁹ | 2,00x10 ⁻³ | 1,18 |
| S96A | 2,60x10 ⁹ | 6,40x10 ⁻² | 2,50 |
| S97A | 5,30x10 ⁹ | 1,5x10 ⁻³ | 2,90 |
| N98A | 1,30x10 ⁹ | 9,00x10 ⁻³ | 0,67 |
| S96A, S97A | 3,17x10 ⁹ | 2,84x10 ⁻³ | 8,90 |
| S97A,N98A | | | Unión no detectable |
| S96A, S97A, N98A | | | Unión no detectable |
| S96A, N98A | | | Unión no detectable |

TABLA VI

| Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituido en S96 de CDR3 de cadena pesada | | | |
|---|--------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| | Ka(M ⁻¹ s ⁻¹) | Ka (s ⁻¹) | K _D (nM) |
| S96F | 3,17 x 10 ⁹ | 2,68 x 10 ⁻³ | 8,45 |
| S96Q | 1,16 x 10 ⁹ | 3,59 x 10 ⁻³ | 3,09 |
| S96M | 3,57 x 10 ⁹ | 8,70 x 10 ⁻³ | 2,43 |
| S96V | 5,37 x 10 ⁹ | 1,21 x 10 ⁻³ | 2,25 |
| S96I | 2,99 x 10 ⁹ | 4,66 x 10 ⁻³ | 1,56 |
| S96N | 1,40 x 10 ⁹ | 2,15 x 10 ⁻³ | 1,53 |
| S96P | 1,45 x 10 ⁹ | 1,88 x 10 ⁻³ | 1,29 |
| S96W | 1,61 x 10 ⁹ | 2,03 x 10 ⁻³ | 1,26 |
| S96T | 3,14 x 10 ⁹ | 1,67 x 10 ⁻³ | 0,53 |
| S96D | 2,28 x 10 ⁹ | 1,18 x 10 ⁻³ | 0,51 |
| S96R | 6,97 x 10 ⁹ | 2,62 x 10 ⁻³ | 0,38 |
| S96E | 2,54 x 10 ⁹ | 9,01 x 10 ⁻³ | 0,35 |
| S96K | 4,55 x 10 ⁹ | 1,41 x 10 ⁻³ | 0,31 |
| S96L | 5,84 x 10 ⁹ | 1,75 x 10 ⁻³ | 0,30 |
| S96H | 4,12 x 10 ⁹ | 7,64 x 10 ⁻³ | 1,86 |
| S96G | 3,87 x 10 ⁹ | 1,50 x 10 ⁻³ | 3,85 |
| S96Y | 2,75 x 10 ⁹ | 1,85 x 10 ⁻³ | 0,67 |

TABLA VII

| Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituido en S97 de CDR3 de cadena pesada | | | |
|---|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| | Ka (M ⁻¹ s ⁻¹) | Kd (s ⁻¹) | K _D (nM) |
| S97F | | | unión no detectable |
| S97Y | | | unión no detectable |
| S97G | | | Unión no detectable |
| S97W | | | Unión no detectable |
| S97D | | | Unión no detectable |
| S97E | Rápido conectado | Rápido desconectado | 1940 |
| S97R | 4,09 x 10 ⁹ | 1,18 x 10 ⁻¹ | 28,90 |
| S97P | 1,10 x 10 ⁹ | 2,69 x 10 ⁻² | 24,50 |
| S97M | 2,33 x 10 ⁹ | 2,90 x 10 ⁻² | 12,40 |
| S97Q | 7,30 x 10 ⁹ | 5,98 x 10 ⁻³ | 8,19 |
| S97N | 8,95 x 10 ⁹ | 4,11 x 10 ⁻³ | 4,59 |
| S97H | 8,39 x 10 ⁹ | 2,48 x 10 ⁻³ | 3,00 |
| S97T | 4,63 x 10 ⁹ | 1,16 x 10 ⁻³ | 2,51 |
| S97V | 3,04 x 10 ⁹ | 3,58 x 10 ⁻³ | 1,18 |
| S97L | 7,50 x 10 ⁹ | 6,90 x 10 ⁻³ | 0,92 |
| S97I | 2,10 x 10 ⁹ | 1,80 x 10 ⁻³ | 0,87 |
| S97K | 1,45 x 10 ⁷ | 5,78 x 10 ⁻³ | 0,40 |

TABLA VIII

| Análisis BIAcore de Abs "AT" sustituido en N98 de CDR3 de cadena pesada | | | |
|---|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| | Ka (M ⁻¹ s ⁻¹) | Kd(s ⁻¹) | K _D (nM) |
| N98K | | | Unión no detectable |
| N98F | 3,70 x 10 ³ | 9,90 x 10 ⁻² | 26600 |
| N98Y | 2,72 x 10 ³ | 1,12 x 10 ⁻² | 41,30 |
| N98M | 2,96 x 10 ³ | 8,14 x 10 ⁻² | 27,50 |
| N98T | 2,46 x 10 ³ | 6,62 x 10 ⁻² | 26,90 |
| N98G | 2,30 x 10 ³ | 5,59 x 10 ⁻³ | 24,30 |
| N98I | 5,68 x 10 ³ | 4,36 x 10 ⁻³ | 7,60 |
| N98W | 2,62 x 10 ³ | 7,68 x 10 ⁻³ | 2,93 |
| N98E | 2,72 x 10 ³ | 3,59 x 10 ⁻³ | 1,32 |
| N98P | 1,51 x 10 ³ | 1,71 x 10 ⁻³ | 1,13 |
| N98H | 2,20 x 10 ³ | 2,34 x 10 ⁻³ | 1,06 |
| N98L | 1,48 x 10 ³ | 1,22 x 10 ⁻³ | 0,82 |
| N98Q | 1,86 x 10 ³ | 1,51 x 10 ⁻³ | 0,81 |
| N98S | 2,67 x 10 ³ | 1,54 x 10 ⁻³ | 0,58 |
| N98D | 6,85 x 10 ³ | 3,12 x 10 ⁻³ | 0,46 |
| N98V | 4,56 x 10 ³ | 1,97 x 10 ⁻⁴ | 0,43 |
| N98R | 3,59 x 10 ³ | 1,08 x 10 ⁻³ | 0,30 |

LISTADO DE SECUENCIAS

5

<110> AMGEN INC.

<120> AGENTES DE UNION SELECTIVOS DE LA PROTEINA DE UNION A OSTEOPROTEGERINA

10

<130> A-633A

<150> 09/511.139

<151> 23-02-2000

15

<160> 154

<170> PatentIn versión 3.0

20

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Humano

25

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr Leu Asn
1 5 10

30

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Humano

<400>2

35

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

40

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Humano

<400> 3

ES 2 738 798 T3

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Leu Ala
1 5 10

5 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Humano

<400> 4

10 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr
1 5

15 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Humano

<400> 5

20 Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

25 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Humano

<400> 6

30 Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr
1 5

35 <210> 7
<211> 7
<212> PR
<213> Humano

<400> 7

40 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

45 <210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Humano

<400> 8

50 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

55 <210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Humano

<400> 9

55 Gln His Thr Arg Ala
1 5

ES 2 738 798 T3

<400> 16

Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

10 <400> 17

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Humano

20 <400> 18

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

Gly

25 <210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Humano

<400> 19

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

30 <210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Humano

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

40 <210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> Humano

45 <400> 21

ES 2 738 798 T3

Gly Gly Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr
 1 5 10

5 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 22

ccgactttgc acctagtt
 18

10 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Humano
 15 <400> 23

tttgtcgtct ttccagacgt tagt
 24

20 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Humano
 25 <400> 24

Thr Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr
 1 5 10 15

His Asp Arg Gly
 20

30 <210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Humano
 35 <400> 25

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

40 <210> 26
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Humano
 <220>
 <221> CDS
 <222> (18)..(44)
 45 <400> 26

ES 2 738 798 T3

cagaagctta gaccacc atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc t
45

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe

1

5

5
<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Humano
<400> 27

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe

1

5

10
<210> 28
<211> 44
<212> ADN
<213> Humano

15
<220>
<221> CDS
<222> (2)..(43)

20
<400> 28

a gct ggg tct ttc tct tct tcc tgt cag taa cga ctg gtg tcc a
44

Ala Gly Ser Phe Ser Ser Ser Cys Gln Arg Leu Val Ser

1

5

10

25
<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Humano
<400> 29

Ala Gly Ser Phe Ser Ser Ser Cys Gln

1

5

35
<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Humano
<400> 30

Arg Leu Val Ser

1

40
<210> 31
<211> 42
<212> ADN
<213> Humano

45
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(42)

50
<400>31

ES 2 738 798 T3

tca gta acg act ggt gtc cac tca cag gtc cag ctg gtg cag
 42
 Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln

1 5 10

5
 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 32

Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln
 1 5 10

10
 15
 <210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 33

gtggaggcac tagagacggt gaccagggtg
 30

20
 25
 <210> 34
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 34

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
 20

30
 35
 <210> 35
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Humano
 <220>
 <221> CDS
 <222> (17)..(46)
 <400> 35

cagaagcttg accacc atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg gg
 48

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu

40 1 5 10

45
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 36

ES 2 738 798 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu
 1 5 10

5 <210> 37
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Humano

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(47)
 <400> 37

cc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg cta ttg tgg ttg aga ggt gcc aga t
 48
 Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg
 1 5 10 15

15 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Humano
 20 <400> 38

Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg
 1 5 10 15

25 <210> 39
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Humano

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(43)
 35 <400> 39

g tgg ttg aga ggt gcc aga tgt gaa att gtg atg aca cag tct c
 44
 Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser
 1 5 10

40 <210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 40

45 Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser
 1 5 10

50 <210>41
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Humano

ES 2 738 798 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(31)

5 <400> 41

tttggacgtc gacttatta aca ctc tcc cct g
 32
 Thr Leu Ser Pro
 1

10 <210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Humano

15 <400> 42

Thr Leu Ser Pro
 1

20 <210> 43
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 43

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

25 Ala Val Phe Val Phe Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Arg Arg
 20 25 30

30 <210> 44
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Humano

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(645)

<400> 44

tct cac agt gca ctt gaa att gtg atg acg cag tct cca tcc tcc ctg
 48
 Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 1 5 10 15

ES 2 738 798 T3

tct gcg tct gtt gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag
96

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
20 25 30

agc att agc aga tat tta aat tgg tat cag ctt aaa cca ggg aaa gcc
144

Ser Ile Ser Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

cct agg ctc ctg atc tat ggt gca tcc agt ttg caa agt gga gtc cca
192

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro
50 55 60

tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg gca gag ttc act ctc acc atc
240

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

agc agt cta caa cct gaa gac att gcc act tac tac tgt caa cac act
288

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr
85 90 95

cgg gcg ttc ggc caa ggg acc aag gtt gaa atc aag cga act gtg gct
336

Arg Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct
384

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag
432

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

ES 2 738 798 T3

gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc
 480
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

cag gag agt gcc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc
 528
 Gln Glu Ser Ala Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc
 576
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag
 624
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

agc ttc aac agg gga gag tgt
 645
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 45
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Humano

5

<400> 45

Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30

Ser Ile Ser Arg Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

10

ES 2 738 798 T3

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr
85 90 95

Arg Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Ala Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

5 <210> 46
<211> 645
<212> ADN
<213> Humano

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(645)

<400> 46

ES 2 738 798 T3

tct cac agt gca ctt gaa att gtg ctg act cag tct cca gcc acc ctg
 48
 Ser His Ser Ala Leu Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 1 5 10 15

tct ttt tct ccg ggt gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag
 96
 Ser Phe Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30

agt gtt ggc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aga cct ggc cag gct
 144
 Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
 35 40 45

ccc agg ccc ctc atc tat gat gca acc aac agg gcc act ggc atc cca
 192
 Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 50 55 60

acc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc
 240
 Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 . 70 75 80

agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cac cga
 288
 Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg
 85 90 95

agg act ttt ggc cgg ggg acc aag ttg gag atc aaa cga act gtg gct
 336
 Arg Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct
 384
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

ES 2 738 798 T3

gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag
 432
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc
 480
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc
 528
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc
 576
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

tac gcc tgc gaa gtc act cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag
 624
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

agc ttc aac agg gga gag tgt
 645
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 47
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 47

5

10

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

ES 2 738 798 T3

Ser Phe Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30

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

Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg
 85 90 95

Arg Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 48
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(645)

10

<400> 48

ES 2 738 798 T3

cac agt gca ctt gaa att gtg atg aca cag tct cca ggc acc ctg tct
 48
 His Ser Ala Leu Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 1 5 10 15

ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt
 96
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 20 25 30

gtt agc agc agc tcc tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct
 144
 Val Ser Ser Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 35 40 45

ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca
 192
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc
 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat
 288
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 85 90 95

ggg gct ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct
 336
 Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

ES 2 738 798 T3

gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct
384

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag
432

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc
480

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc
528

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc
576

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg aac tcg ccc gtc aca aag
624

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Asn Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

agc ttc aac agg gga gag tgt
645

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 49
<211> 215
<212> PRT
<213> Humano

5

<400> 49

ES 2 738 798 T3

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

<210> 50
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Humano
 <220>

ES 2 738 798 T3

<221> CDS
 <222> (1)..(654)

<400> 50

5

tct cac agt gca cag tct gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg
 48
 Ser His Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
 1 5 10 15

tcc cca gga cag acg gcc acg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca
 96
 Ser Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro
 20 25 30

aag caa tat gtt tat tgg tac cgg cag aag cca ggc cag gcc cct cta
 144
 Lys Gln Tyr Val Tyr Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Leu
 35 40 45

ttg gtg ata tat gaa gac agt gag agg ccc tca ggg atc cct gaa cga
 192
 Leu Val Ile Tyr Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 50 55 60

ttc tct ggc tcc agt tca ggg act gaa gtc acg ttg agt atc agt gga
 240
 Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Glu Val Thr Leu Ser Ile Ser Gly
 65 70 75 80

gtc cag gca gaa gac gag gct gac tat tat tgt caa tca aca gac agc
 288
 Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Thr Asp Ser
 85 90 95

ES 2 738 798 T3

agt ggg act tat gtc gtc ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta
 336
 Ser Gly Thr Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

agt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct
 384
 Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

115 120 125

gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac
 432
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

130 135 140

ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc
 480
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

145 150 155 160

gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac
 528
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

165 170 175

aag tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag
 576
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

180 185 190

tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg
 624
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val

195 200 205

gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca
 654
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 51
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Humano

5

<400> 51

ES 2 738 798 T3

Ser His Ser Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro
 20 25 30

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

Leu Val Ile Tyr Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Glu Val Thr Leu Ser Ile Ser Gly
 65 70 75 80

Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Thr Asp Ser
 85 90 95

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

Ser Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 130 135 140

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 165 170 175

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 180 185 190

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 195 200 205

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 52
 <211> 690

ES 2 738 798 T3

<212> ADN
<213> Humano

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(690)

<400> 52

gcc cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg
48
Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly

1 5 10 15

gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac gac ttc agt aat
96
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn

20 25 30

tat gct ata cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg
144
Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp

35 40 45

atg gga tgg atc aac gct ggc aat ggg aac aca aaa ttt tca cag aag
192
Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys

50 55 60

ttc cag ggc aga atc acc gtt acc agg gac aca gcc gcg agc aca gcc
240
Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala

10 65 70 75 80

ES 2 738 798 T3

tac atg gag ctg cgc agt ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac
 288
 Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

tgt gcg aga gat tcc tca aat atg gtt cgg gga att att ata gcg tac
 336
 Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr

100 105 110

tat ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc
 384
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120 125

tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc
 432
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser

130 135 140

acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc
 480
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe

145 150 155 160

ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc
 528
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

165 170 175

gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc
 576
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu

180 185 190

agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac
 624
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr

195 200 205

ES 2 738 798 T3

atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa
 672
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220

gtt gag ccc aaa tct tgt
 690
 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

5
 <210> 53
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 53

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn
 20 25 30

Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys
 50 55 60

Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr
 100 105 110

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

10

ES 2 738 798 T3

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175

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

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

<210> 54
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(690)

10

<400> 54

gcc gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg
 48
 Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly
 1 5 10 15

gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac gac ttc agt aat
 96
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn
 20 25 30

tat gct ata cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg
 144

15

ES 2 738 798 T3

Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp
35 40 45

atg gga tgg atc aac gct ggc aat ggg aac aca aaa ttt tca cag aag
192
Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys
50 55 60

ttc cag ggc aga atc acc gtt acc agg gac aca gcc gcg agc aca gcc
240
Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala
65 70 75 80

tac atg gag ctg cgc agt ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac
288
Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

tgt gcg aga gat tcc tca aat atg gtt cgg gga att att ata gcg tac
336
Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr
100 105 110

tat ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc
384
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc
432
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
130 135 140

acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc
480
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145 150 155 160

ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc

ES 2 738 798 T3

528
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175

gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc
 576
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190

agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac
 624
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205

atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa
 672
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220

gtt gag ccc aaa tct tgt
 690
 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

<210> 55
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Humano

5

<400> 55

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn
 20 25 30

Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys

10

ES 2 738 798 T3

gcc gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg
 48
 Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt tta gtc tct gga ttc acc ttc aat aac
 96
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn
 20 25 30

tat cct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg
 144
 Tyr Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

gtg gca gtt ata tca tat gat gga aat aat aaa tac tac gca gac tcc
 192
 Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg
 240
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

tat ttg caa atg aac agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac
 288
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgt gcg agg ggg ggc ggt ggc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg
 336
 Cys Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg
 384
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

ES 2 738 798 T3

| | | |
|---|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
| gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc | | |
| 432 | | |
| Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys | | |
| 130 | 135 | 140 |
| ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca | | |
| 480 | | |
| Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser | | |
| 145 | 150 | 155 |
| ggc gcc ctg acc agc ggc gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc | | |
| 528 | | |
| Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser | | |
| 165 | 170 | 175 |
| tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc | | |
| 576 | | |
| Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser | | |
| 180 | 185 | 190 |
| ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac | | |
| 624 | | |
| Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn | | |
| 195 | 200 | 205 |
| acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt | | |
| 660 | | |
| Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys | | |
| 210 | 215 | 220 |

<210> 57
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 57

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | |

5

10

ES 2 738 798 T3

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn
 20 25 30

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

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

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

<210> 58
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> Humano

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(681)

10

<400> 58

ES 2 738 798 T3

```

gcc gag gtg cag ctg ctg gag tct ggg gga ggc ttg gta caa cct ggc
 48
Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1          5          10          15

agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat gat
 96
Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
          20          25          30

tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg
144
Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
          35          40          45

gtc tca ggt att agt tgg aat agt ggt agg ata ggc tat gcg gac tct
192
Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser
          50          55          60

gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg
240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65          70          75          80

tat ctg caa atg aac agt ctg aga cct gag gac acg gcc ttc tat tac
288
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr
          85          90          95

tgt gca aaa ggg ggt tct aca agc gcg agg tat agc agt ggc tgg tac
336
Cys Ala Lys Gly Gly Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr

```

ES 2 738 798 T3

| | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 100 | | 105 | | 110 |
| tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag 384 | | | | | |
| Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys | | | | | |
| | 115 | | 120 | | 125 |
| ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg 432 | | | | | |
| Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly | | | | | |
| | 130 | | 135 | | 140 |
| ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg 480 | | | | | |
| Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro | | | | | |
| 145 | | 150 | | 155 | 160 |
| gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtc cac acc 528 | | | | | |
| Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr | | | | | |
| | | 165 | | 170 | 175 |
| ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gta 576 | | | | | |
| Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val | | | | | |
| | 180 | | 185 | | 190 |
| gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac 624 | | | | | |
| Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 |
| gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc 672 | | | | | |
| Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro | | | | | |
| | 210 | | 215 | | 220 |
| aaa tct tgt 681 | | | | | |
| Lys Ser Cys | | | | | |

ES 2 738 798 T3

<210> 59
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Humano

5

<400> 59

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

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

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

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

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

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Lys Gly Gly Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

ES 2 738 798 T3

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220

Lys Ser Cys
 225

<210> 60
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 60

5

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser
 100 105 110

Gly Ser Tyr Tyr Asn Ile Thr Met Val Arg Gly Val Ile Ile Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

10

<210>61
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Humano

15

<400> 61

ES 2 738 798 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr
 100 105 110
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 62
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Humano

5

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr
 100 105 110
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

10

<210> 63
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Humano

15

ES 2 738 798 T3

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

5

<210> 64
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 64

10

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

15

<210> 65
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Humano

ES 2 738 798 T3

<400> 65

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Gly Ile Ala Val Ala Gly
 100 105 110
 Val Gln Trp Leu Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

5

<210> 66
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 66

10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Gly Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 738 798 T3

5 <210> 67
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10 <210> 68
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Humano

15 <400> 68

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Arg Ala Phe Gly Gln
 85 90 95
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100

20 <210> 69
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humano

ES 2 738 798 T3

<400> 69

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Tyr
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

5 <210> 70
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Humano

10 <400> 70

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Phe Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile
          35           40           45
Tyr Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Thr Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Arg Arg Thr Phe Gly Arg
          85           90           95
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100

```

15 <210> 71
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humano

20 <400> 71

ES 2 738 798 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 72
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Humano

5

<400> 72

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ala Phe Gly
 85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100

<210> 73
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humano

10

15

<400> 73

ES 2 738 798 T3

Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humano

5

<400> 74

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Val
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Leu Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Glu Val Thr Leu Ser Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Thr Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

10

<210> 75
 <211> 522
 <212> ADN
 <213> Murino

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(513)

20

<400> 75

ES 2 738 798 T3

cat atg gac tac aag gac gac gat gac aag aag ctt aag cct gag gcc
48
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala

1 5 10 15

cag cca ttt gca cac ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg ggt
96
Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly

20 25 30

tcc cat aaa gtc act ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg gcc
144
Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala

35 40 45

ES 2 738 798 T3

aag atc tct aac atg acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac caa
 192
 Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln

50 55 60

gat ggc ttc tat tac ctg tac gct aac att tgc ttt cgg cat cat gaa
 240
 Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu

65 70 75

aca tcg gga gac ctg gct act gaa tat ctt cag ctg atg gtg tat gtc
 288
 Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val

80 85 90 95

gtt aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa gga
 336
 Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly

100 105 110

ggg agc acg aaa aac tgg tcg ggc aat tct gaa ttc cac ttt tat tcc
 384
 Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser

115 120 125

ata aat gtt ggg gga ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att agc
 432
 Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser

130 135 140

att cag gtg tcc aac cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg acg
 480
 Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr

145 150 155

tac ttt ggg gct ttc aaa gtt cag gac ata gac taactcgag
 522
 Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp

160 165 170

<210> 76
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Murina

5

<400> 76

ES 2 738 798 T3

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala Gln
 1 5 10 15

Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser
 20 25 30

His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys
 35 40 45

Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp
 50 55 60

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 65 70 75 80

Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val
 85 90 95

Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly
 100 105 110

Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile
 115 120 125

Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile
 130 135 140

Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr
 145 150 155 160

Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
 165 170

5 <210> 77
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Humano

10 <400> 77

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 1 5 10 15

Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Thr
 20 25 30

Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
 35

<210> 78

ES 2 738 798 T3

<211> 39
 <212> PRT
 <213> Murina

5 <400> 78

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 1 5 10 15
 Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val
 20 25 30
 Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
 35

<210> 79
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Murina

10

<400> 79

15

Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val
 20 25 30
 Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro
 35

<210> 80
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

20

<220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

25

<400> 80

Xaa Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

30

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

35

<220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

40

<400> 81

Asp Xaa Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr

ES 2 738 798 T3

<210> 82
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Sintética

<220>
 <221> misc_feature
 10 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 82

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Xaa | Asn | Met | Val | Arg | Gly | Ile | Ile | Ile | Ala | Tyr | Tyr | Phe | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

Tyr

15 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 83

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Ser | Xaa | Met | Val | Arg | Gly | Ile | Ile | Ile | Ala | Tyr | Tyr | Phe | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

Tyr

30 <210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

35 <220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 84

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ser | Ser | Asn | Xaa | Val | Arg | Gly | Ile | Ile | Ile | Ala | Tyr | Tyr | Phe | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

Tyr

40 <210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

45 <220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

50 <400> 85

ES 2 738 798 T3

Asp Ser Ser Asn Met Xaa Arg Gly Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Sintética

<220>
<221> misc_feature
<223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 86

Asp Ser Ser Asn Met Val Xaa Gly Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 87
<211> 17
<212> PRT
<213> Sintética

<220>
<221 > misc_feature
<223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 87

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Xaa Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> Sintética

<220>
<221> misc_feature
<223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 88

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Xaa Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> Sintética

<220>
<221> misc_feature
<223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

ES 2 738 798 T3

<400> 89

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Xaa Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

5 <210> 90
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 90

15 Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Xaa Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

20 <210> 91
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 91

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Xaa Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

30 <210> 92
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

35 <220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 92

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Xaa Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

45 <210> 93
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sintética

50 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 738 798 T3

<223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 93

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Xaa Phe Asp
 1 5 10 15

5 Tyr

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Sintética

<220>

<221> misc_feature

<223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

15

<400> 94

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Xaa Asp
 1 5 10 15

Tyr

20 <210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Sintética

25 <220>

<221> misc_feature

<223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

30 <400> 95

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Xaa
 1 5 10 15

Tyr

35 <210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Sintética

<220>

<221> misc_feature

40 <223> X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición

<400> 96

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Xaa

45 <210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Sintética

ES 2 738 798 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <223> La primera aparición de X de izquierda a derecha indica cualquier radical de aminoácido distinto de la arginina, la segunda, tercera y cuarta apariciones de X indican cualquier radical de aminoácido
 5
 <400> 97

 Gln His Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Ala
 1 5
 10
 <210> 98
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sintética
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> X es cualquier radical de aminoácido distinto de arginina
 20
 <400> 98

 Gln His Thr Xaa Ala Ala Ala Arg Ala
 1 5
 25
 <210> 99
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sintética
 30
 <400> 99

 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu
 1 5 10
 35
 <210> 100
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sintético
 <400> 100

 cctctcatat ggactacaag gac
 23
 40
 <210> 101
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sintético
 45
 <400> 101

 agtagccagg tctcccgatg tttcatgatg
 30
 50
 <210> 102
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sintético
 55
 <400> 102

ES 2 738 798 T3

ctggctactg aatatcttca gctgatggtg
30

5 <210> 103
<211> 25
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 103

cctctcctcg agttagtcta tgtcc
25

10 <210> 104
<211> 17
<212> PRT
15 <213> Sintética

<400> 104

Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ala Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

20 Tyr
<210> 105
<211> 39
<212> ADN
25 <213> Sintético

<400> 105

agagattcct caaatatggt tcggggaatt attatagcg
39

30 <210> 106
<211> 36
<212> ADN
<213> Sintético

35 <400> 106

gtagtcaaaa tagtagccta taataattcc ccgaac
36

40 <210> 107
<211> 33
<212> ADN
<213> Sintético

45 <400> 107

gtgtattact gtgcgagaga ttcctcaaat atg
33

50 <210> 108
<211> 36
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 108

ES 2 738 798 T3

cagggtgcc tggccccagt agtcaaaata gtacgc
36

5 <210> 109
<211> 39
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 109

10 gtgtattact gtgcgagagc ttcctcaaat atggttcgg
39

15 <210> 110
<211> 39
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 110

20 gtgtattact gtgcgagaga tgcctcaaat atggttcgg
39

25 <210> 111
<211> 42
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 111

aataattccc cgaaccatat ttgcggaatc tctcgcacag ta

42

30 <210> 112
<211> 39
<212> ADN
<213> Sintético

35 <400> 112

aataattccc cgaaccatag ctgaggaatc tctcgcaca
39

40 <210> 113
<211> 36
<212> ADN
<213> Sintético

45 <400> 113

aataattccc cgaacggcat ttgaggaatc tctcgc
36

50 <210> 114
<211> 36
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 114

ES 2 738 798 T3

gattcctcaa atatggctcg ggaattatt atagcg
36

5 <210> 115
<211> 38
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 115

10 gattcctcaa atatggttgc cgaattatt atagcgta
38

15 <210> 116
<211> 45
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 116

20 gtagtcaaaa tagtagcgta taataattgc ccgaaccata ttga
45

25 <210> 117
<211> 42
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 117

30 gtagtcaaaa tagtagcgta taatggctcc ccgaaccata tt
42

35 <210> 118
<211> 39
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 118

40 gtagtcaaaa tagtagcgta tggcaattcc ccgaaccat
39

45 <210> 119
<211> 36
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 119

50 gtagtcaaaa tagtagcgctg caataattcc ccgaac
36

55 <210> 120
<211> 45
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 120

55 ggtgccctgg ccccagtagt caaaataggc cgctataata attcc
45

ES 2 738 798 T3

5 <210> 121
<211> 45
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 121

ggtgccctgg ccccagtagt caaaagcgta cgctataata attcc
45

10 <210> 122
<211> 42
<212> ADN
<213> Sintético

15 <400> 122

cagggtgccc tggccccagt agtcagcata gtacgctata at

42

20 <210> 123
<211> 39
<212> ADN
<213> Sintético

25 <400> 123

cagggtgccc tggccccagt aggcaaaata gtacgctat
39

30 <210> 124
<211> 39
<212> ADN
<213> Sintético

35 <400> 124

cagggtgccc tggccccagg cgtcaaaata gtacgctat
39

40 <210> 125
<211> 42
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 125

agtctgagat ctgaagacac ggctgtgtat tactgtgcga ga
42

50 <210> 126
<211> 33
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 126

gtgtattact gtgcgagaga ttcctcaaat atg
33

ES 2 738 798 T3

<210> 127
<211> 39
<212> ADN
5 <213> Sintético

<400> 127

agagattcct caaatatggt tcggggaatt attatagcg
39
10

<210> 128
<211> 32
<212> ADN
15 <213> Sintético

<400> 128

cttgagacgg tgaccagggt gccctggccc ca
32
20

<210> 129
<211> 36
<212> ADN
<213> Sintético
25 <400> 129

cagggtgccc tggccccagt agtcaaaata gtacgc
36
30

<210> 130
<211> 36
<212> ADN
<213> Sintético
35 <400> 130

gtagtcaaaa tagtacgcta taataattcc ccgaac
36
40

<210> 131
<211> 46
<212> ADN
<213> Sintético
45 <400> 131

aataattccc cgaaccatat ttgagatagc tatctctcgc acagta
46
50

<210> 132
<211> 46
<212> ADN
<213> Sintético
55 <400> 132

aataattccc cgaaccatat ttgagcgcgc tatctctcgc acagta
46
55

<210> 133

ES 2 738 798 T3

<211> 44
<212> ADN
<213> Sintético

5 <400> 133

aataattccc cgaaccatat ttgactcgta tctctcgcac agta

44

10 <210> 134
<211> 44
<212> ADN
<213> Sintético

15 <400> 134

aataattccc cgaaccatat ttgacacata tctctcgcac agta
44

20 <210> 135
<211> 46
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 135

25 aataattccc cgaaccatat tgatcgtgg aatctctcgc acagta
46

30 <210> 136
<211> 46
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 136

35 aataattccc cgaaccatat tgcgacgtgg aatctctcgc acagta
46

40 <210> 137
<211> 44
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 137

aataattccc cgaaccatat tctcgtggaa tctctcgcac agta
44

45 <210> 138
<211> 44
<212> ADN
<213> Sintético

50 <400> 138

aataattccc cgaaccatat tcacatggaa tctctcgcac agta
44

<210> 139

ES 2 738 798 T3

<211> 43
<212> ADN
<213> Sintético

5 <400> 139

aataattccc cgaaccatga tacgttgagg aatctctcgc aca
43

10 <210> 140
<211> 43
<212> ADN
<213> Sintético

15 <400> 140

aataattccc cgaaccatgc gacgttgagg aatctctcgc aca
43

20 <210> 141
<211>41
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 141

aataattccc cgaaccatct cgttgaggaa tctctcgcac a
41

25 <210> 142
<211> 41
<212> ADN
<213> Sintético

30 <400> 142

aataattccc cgaaccatca cattgaggaa tctctcgcac a
41

35 <210> 143
<211> 42
<212> ADN
<213> Sintético

40 <400> 143

agtctgagat ctgaagacac ggctgtgtat tactgtgcga ga
42

45 <210> 144
<211> 52
<212> ADN
<213> Sintético

50 <400> 144

cagcagaagc ttagaccacc atggacatga gggtccegc tcagctcctg gg

52

<210> 145

ES 2 738 798 T3

<211> 36
<212> ADN
<213> Sintético

5 <400> 145

cacagccgtg tcttcagatc tcagactgcg cagctc
36

10 <210> 146
<211> 30
<212> ADN
<213> Sintético

15 <400> 146

gtggaggcac tagagacggt gaccagggcg
30

20 <210> 147
<211> 48
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 147

25 gtgtattact gtgcgagaga tgccgcaaat atggttcggg gaattatt
48

30 <210> 148
<211> 53
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 148

35 gtgtattact gtgcgagaga tgccctcagct atggttcggg gaattattat agc
53

40 <210> 149
<211> 53
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 149

45 gtgtattact gtgcgagaga ttccgcagct atggttcggg gaattattat agc
53

50 <210> 150
<211> 53
<212> ADN
<213> Sintético

<400> 150

55 gtgtattact gtgcgagaga tgccgcagct atggttcggg gaattattat agc
53

<210> 151
<211> 40
<212> ADN

ES 2 738 798 T3

<213> Sintético

<400> 151

5

gtggttgaga ggtgccagat gtcaggcca gctggtgcag
40

<210> 152

<211> 48

10

<212> ADN

<213> Sintético

<400> 152

15

ccgctcagct cctggggctc ctgctattgt ggttgagagg tgccagat
48

<210> 153

<211> 51

20

<212> ADN

<213> Sintético

<400> 153

ccggtaaca cactacgtac gtgtgcggcg gcgcgggctg tcggccaagg g
51

25

<210> 154

<211> 23

<212> ADN

<213> Sintético

30

<400> 154

ccgggcgcgc cttattaaca ctc
23

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Figura 9 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 como se muestra en la Figura 5, donde el anticuerpo o dominio de unión a antígeno se une selectivamente a OPGbp humana con una constante de disociación de 1 nM o menos e inhibe la resorción ósea
2. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 1, donde la cadena ligera comprende una cadena ligera kappa o lambda.
3. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una región Fc humana.
4. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 1 que reconoce un epítipo en OPGbp humana reconocido por un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 53 como se muestra en la Figura 9 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 45 como se muestra en la Figura 5.
5. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende una cadena ligera variable (V_L) y una pesada variable (V_H), donde
- a) la cadena V_L comprende una CDR1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 01 RASQSIERYLN, una CDR2 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 05 GASSLQS y una CDR3 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 09 QHTRA, y
- b) la cadena V_H comprende una CDR1 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 13 NYAIH, una CDR2 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 16 WINAGNGNTKFSQKFQG, y una CDR3 que tiene una o más sustituciones de aminoácido en la secuencia de la SEQ ID NO: 19 DSSNMVIRGIIIAYYFDY,
- donde CDR1, CDR2 y CDR3 en la cadena V_L y V_H están separadas por secuencias de aminoácidos estructurales, y donde el anticuerpo o dominio de unión a antígeno se une selectivamente a OPGbp humana con una constante de disociación de 1 nM o menos e inhibe la resorción ósea
6. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 5, donde la cadena V_H comprende una CDR3 que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- SEQ ID NO: 80: XSSNMVIRGIIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 81: DXSNMVRGIIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 82: DSXNMVRGIIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 83: DSSXMVRGIIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 84: DSSNXVRGIIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 85: DSSNMVRGIIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 86: DSSNMVXGIIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 87: DSSNMVRXIIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 88: DSSNMVRGXIIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 89: DSSNMVRGIXIAYYFDY;
 SEQ ID NO: 90: DSSNMVRGIIAXYFDY;
 SEQ ID NO: 91: DSSNMVRGIIIXYFDY;
 SEQ ID NO: 92: DSSNMVRGIIIAXYFDY;
 SEQ ID NO: 93: DSSNMVRGIIIAYXFDY;
 SEQ ID NO: 94: DSSNMVRGIIIAYYXDY;
 SEQ ID NO: 95: DSSNMVRGIIIAYYFXD; y
 SEQ ID NO: 96: DSSNMVRGIIIAYYFDX;
- donde X es cualquier aminoácido que es diferente del aminoácido normalmente residente en esa posición.
7. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 5, donde la cadena V_H comprende una CDR3 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 19 DSSNMVIRGIIIAYYFDY.
8. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.

10. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
11. La célula huésped de la reivindicación 10, que es una célula CHO.
- 5 12. Un método para producir un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 11 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo o dominio de unión a antígeno.
13. Un método para producir un anticuerpo o dominio de unión a antígeno que comprende cultivar una célula huésped en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10 14. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende un isotipo seleccionado de IgG, IgM, IgA, IgE e IgD.
- 15 15. El anticuerpo de la reivindicación 14, donde el isotipo es IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄.
16. Una composición que comprende el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la inhibición de la formación o activación de osteoclastos.
- 20 18. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la inhibición de la resorción ósea.
- 25 19. Un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida de masa ósea.
20. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en la reivindicación 19, donde la pérdida de masa ósea es el resultado de osteoporosis, metástasis de cáncer al hueso; artritis reumatoide, hipercalcemia de malignidad y osteoporosis inducida por esteroides.
- 30 21. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que se va a administrar junto con una composición que comprende al menos un agente anti-resortivo del hueso adicional.
- 35 22. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en la reivindicación 21, donde el agente anti-resortivo es un estrógeno, un bisfosfonato o un modulador selectivo del receptor de estrógeno.
23. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que se va a administrar junto con una composición que comprende un agente anabólico para el hueso.
- 40 24. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en la reivindicación 23, donde el agente anabólico es hormona paratiroides o un complejo de factor de crecimiento de tipo insulina y proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina.
- 45 25. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, que se va a administrar junto con un inhibidor de interleucina-1 o un inhibidor del factor alfa de necrosis de tumor.
- 50 26. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en la prevención o el tratamiento del crecimiento de células de tumor en el hueso.
27. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en la reivindicación 19, donde la pérdida de masa ósea está asociada con cáncer de pecho, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esófago, rectal, vejiga, cuello uterino, ovario, hígado y gastrointestinal.
- 55 28. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno de la reivindicación 26 para su uso en la prevención o el tratamiento del mieloma múltiple.
- 60 29. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como en las reivindicaciones 20 o 26, que se va a administrar en combinación con un agente de terapia contra el cáncer.
30. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como se define en la reivindicación 29, donde el agente de terapia contra el cáncer es radioterapia o quimioterapia.
- 65 31. El anticuerpo o dominio de unión a antígeno para su uso como en las reivindicaciones 20 o 26, que se va a

administrar con anticuerpos que se unen a células de tumor e inducen un efecto citotóxico o citostático sobre el crecimiento tumoral.

Figura 1
Fago ELISA

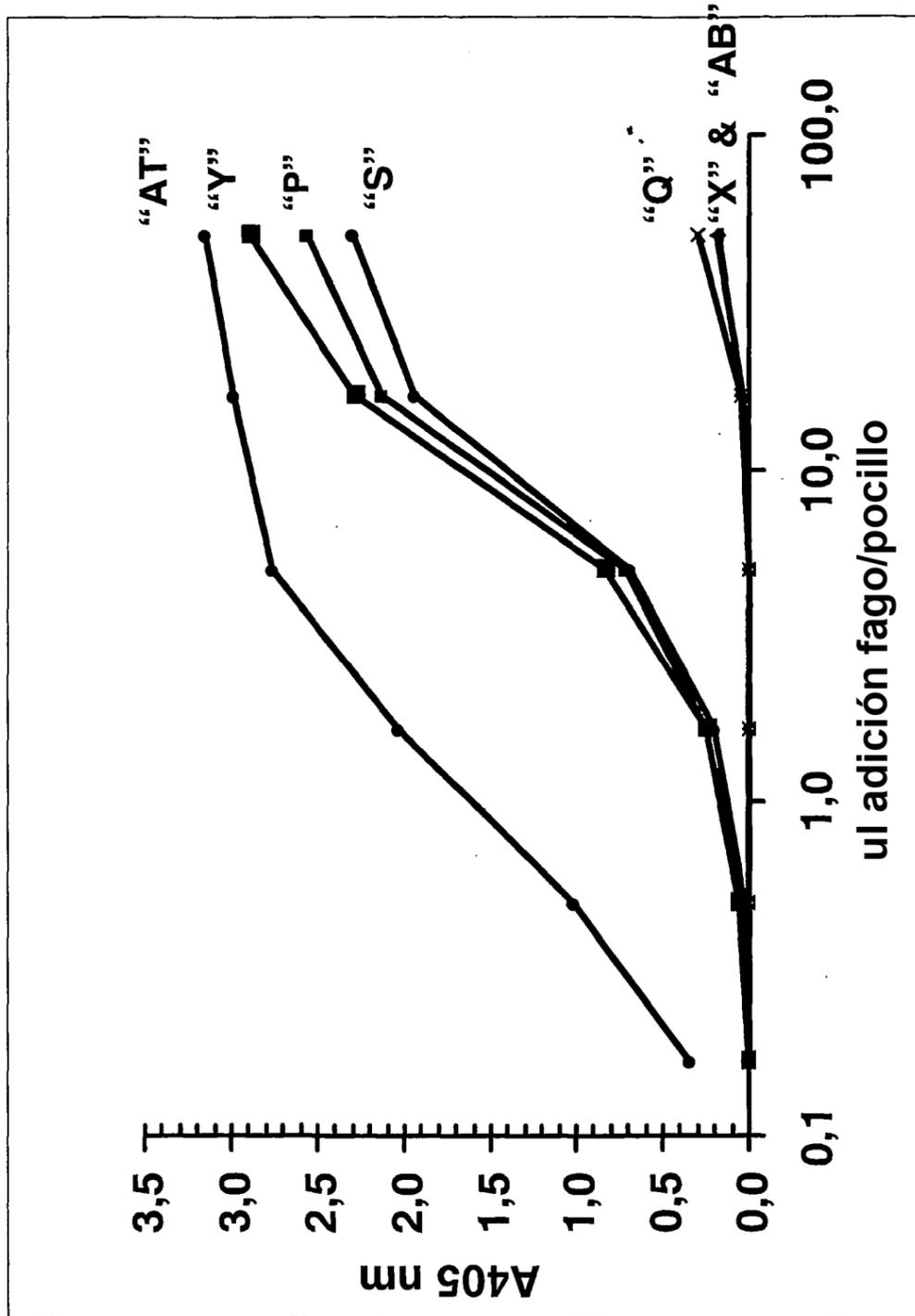


Figura 2
Inhibición de interacción de OPGbp/ODAR por Fabs "AT" e "Y"

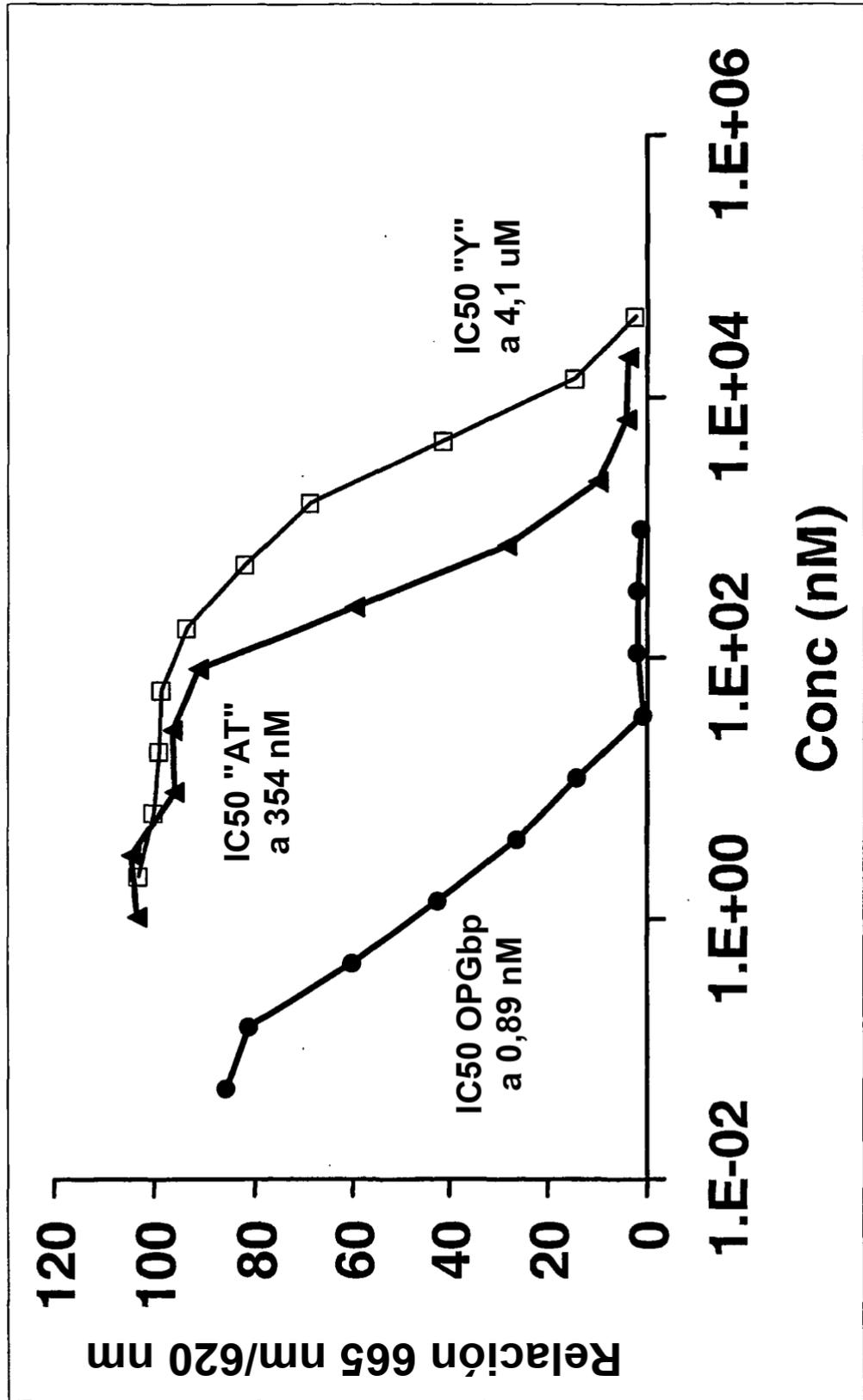


Figura 3
 Ensayo de médula ósea
 Fabs "AT" "Y" "P"

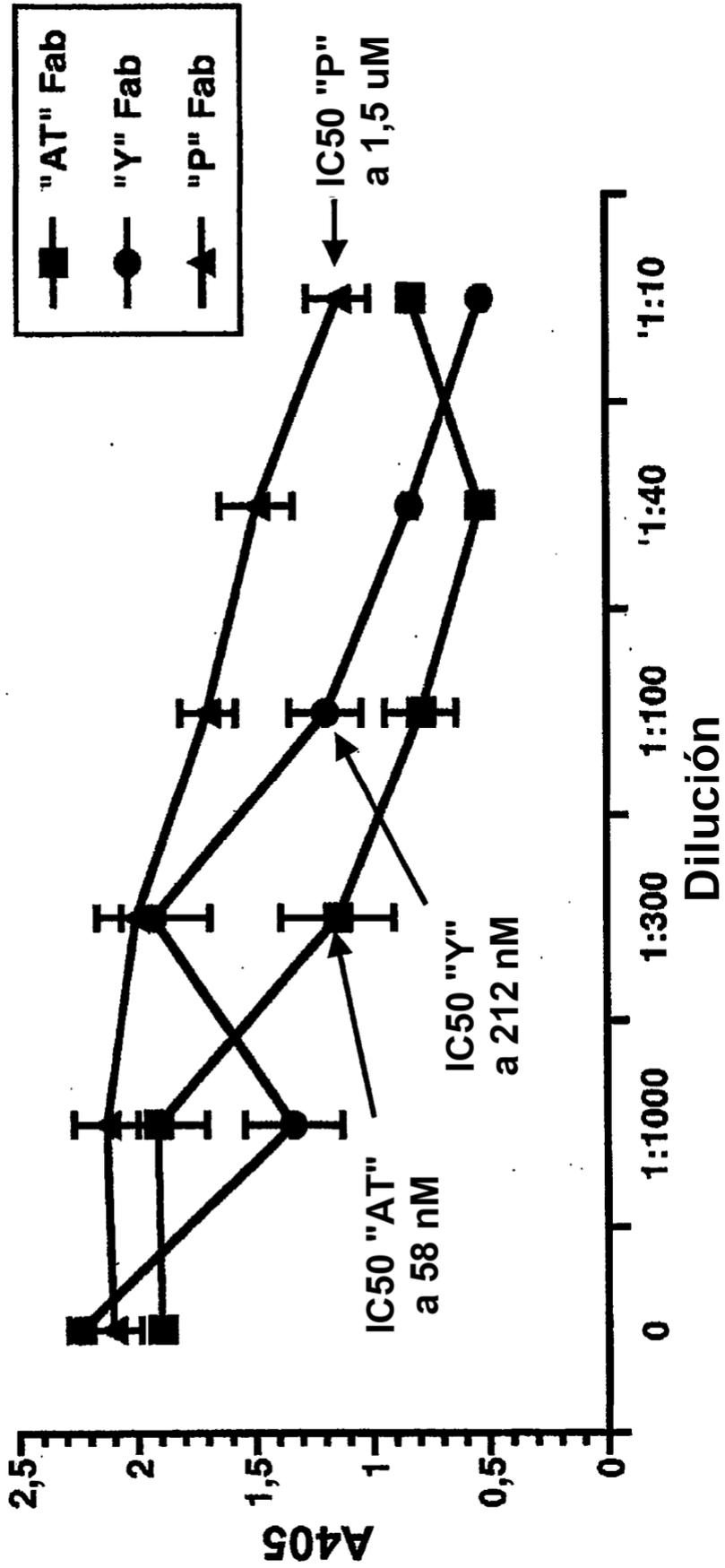


Figura 4
Bioensayo de célula Raw
Fabs "AT" "Y" y "P"

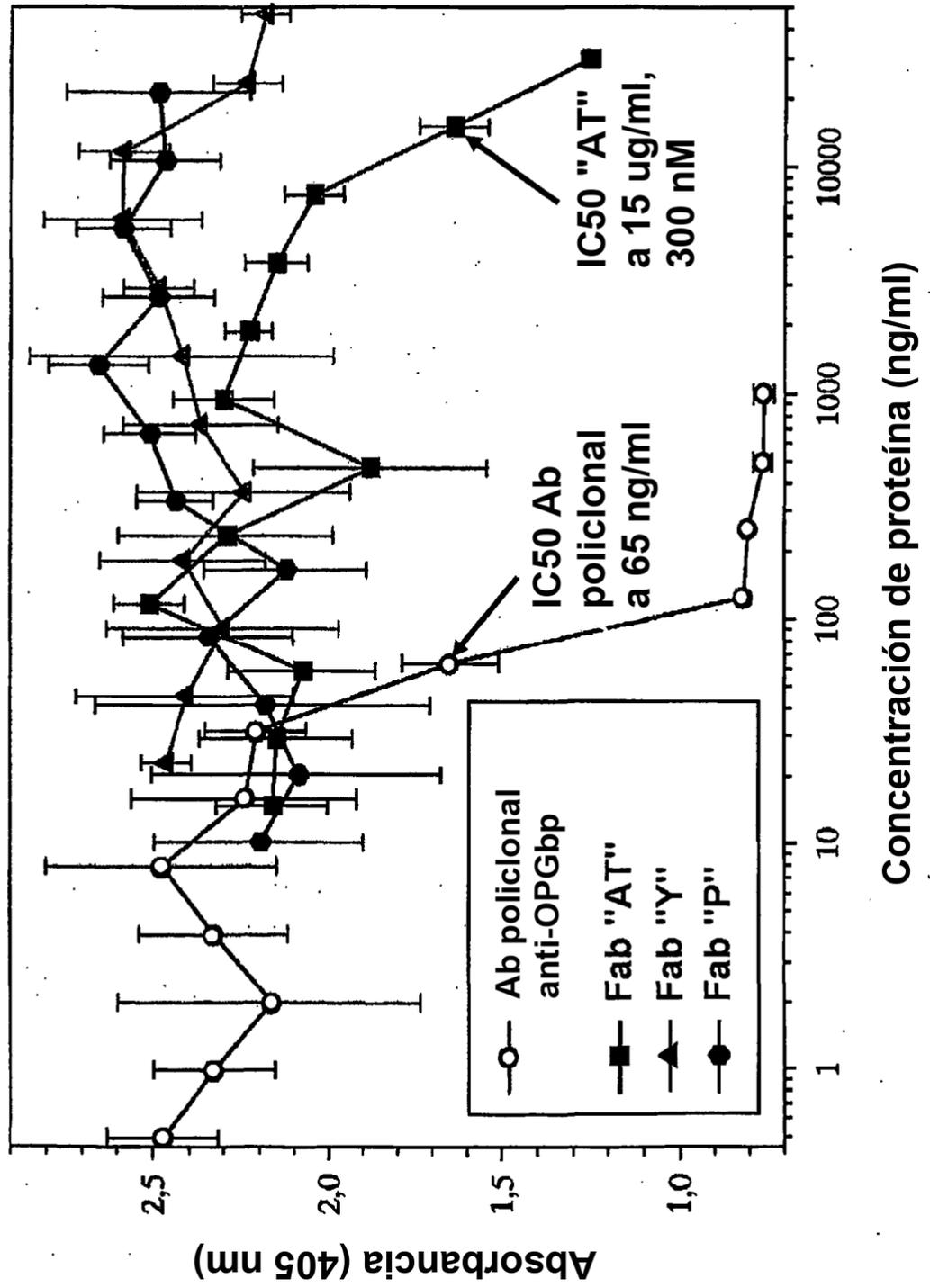


Figura 5

AT LIGERO

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TCT | CAC | AGT | GCA | CTT | GAA | ATT | GTG | ATG | ACG | CAG | TCT | CCA | TCC | TCC | CTG | 48 |
| Ser | His | Ser | Ala | Leu | Glu | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| TCT | GCG | TCT | GTT | GGA | GAC | AGA | GTC | ACC | ATC | ACT | TGC | CGG | GCA | AGT | CAG | 96 |
| Ser | Ala | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| AGC | ATT | AGC | AGA | TAT | TTA | AAT | TGG | TAT | CAG | CTT | AAA | CCA | GGG | AAA | GCC | 144 |
| Ser | Ile | Ser | Arg | Tyr | Leu | Asn | Trp | Tyr | Gln | Leu | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| CCT | AGG | CTC | CTG | ATC | TAT | GGT | GCA | TCC | AGT | TTG | CAA | AGT | GGA | GTC | CCA | 192 |
| Pro | Arg | Leu | Leu | Ile | Tyr | Gly | Ala | Ser | Ser | Leu | Gln | Ser | Gly | Val | Pro | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| TCA | AGG | TTC | AGT | GGC | AGT | GGA | TCT | GGG | GCA | GAG | TTC | ACT | CTC | ACC | ATC | 240 |
| Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Ala | Glu | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| AGC | AGT | CTA | CAA | CCT | GAA | GAC | ATT | GCC | ACT | TAC | TAC | TGT | CAA | CAC | ACT | 288 |
| Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | Glu | Asp | Ile | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | His | Thr | |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | | | 95 | | |
| CGG | GCG | TTC | GGC | CAA | GGG | ACC | AAG | GTT | GAA | ATC | AAG | CGA | ACT | GTG | GCT | 336 |
| Arg | Ala | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Arg | Thr | Val | Ala | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| GCA | CCA | TCT | GTC | TTC | ATC | TTC | CCG | CCA | TCT | GAT | GAG | CAG | TTG | AAA | TCT | 384 |
| Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| GGA | ACT | GCC | TCT | GTT | GTG | TGC | CTG | CTG | AAT | AAC | TTC | TAT | CCC | AGA | GAG | 432 |
| Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| GCC | AAA | GTA | CAG | TGG | AAG | GTG | GAT | AAC | GCC | CTC | CAA | TCG | GGT | AAC | TCC | 480 |
| Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | |
| 145 | | | | | 150 | | | | 155 | | | | | 160 | | |
| CAG | GAG | AGT | GCC | ACA | GAG | CAG | GAC | AGC | AAG | GAC | AGC | ACC | TAC | AGC | CTC | 528 |
| Gln | Glu | Ser | Ala | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | | |
| AGC | AGC | ACC | CTG | ACG | CTG | AGC | AAA | GCA | GAC | TAC | GAG | AAA | CAC | AAA | GTC | 576 |
| Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| TAC | GCC | TGC | GAA | GTC | ACC | CAT | CAG | GGC | CTG | AGC | TCG | CCC | GTC | ACA | AAG | 624 |
| Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| AGC | TTC | AAC | AGG | GGA | GAG | TGT | | | | | | | | | | 645 |
| Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys | | | | | | | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | | | | | | |

Figura 6

Y LIGERO

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TCT | CAC | AGT | GCA | CTT | GAA | ATT | GTG | CTG | ACT | CAG | TCT | CCA | GCC | ACC | CTG | 48 |
| Ser | His | Ser | Ala | Leu | Glu | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Thr | Leu | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| TCT | TTT | TCT | CCG | GGT | GAA | AGA | GCC | ACC | CTC | TCC | TGC | AGG | GCC | AGT | CAG | 96 |
| Ser | Phe | Ser | Pro | Gly | Glu | Arg | Ala | Thr | Leu | Ser | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| AGT | GTT | GGC | AGC | TAC | TTA | GCC | TGG | TAC | CAG | CAG | AGA | CCT | GGC | CAG | GCT | 144 |
| Ser | Val | Gly | Ser | Tyr | Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Ala | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| CCC | AGG | CCC | CTC | ATC | TAT | GAT | GCA | ACC | AAC | AGG | GCC | ACT | GGC | ATC | CCA | 192 |
| Pro | Arg | Pro | Leu | Ile | Tyr | Asp | Ala | Thr | Asn | Arg | Ala | Thr | Gly | Ile | Pro | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| ACC | AGG | TTC | AGT | GGC | AGT | GGG | TCT | GGG | ACA | GAC | TTC | ACT | CTC | ACC | ATC | 240 |
| Thr | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| AGC | AGC | CTA | GAG | CCT | GAA | GAT | TTT | GCA | ACT | TAT | TAC | TGT | CAA | CAC | CGA | 288 |
| Ser | Ser | Leu | Glu | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | His | Arg | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| AGG | ACT | TTT | GGC | CGG | GGG | ACC | AAG | TTG | GAG | ATC | AAA | CGA | ACT | GTG | GCT | 336 |
| Arg | Thr | Phe | Gly | Arg | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | Thr | Val | Ala | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| GCA | CCA | TCT | GTC | TTC | ATC | TTC | CCG | CCA | TCT | GAT | GAG | CAG | TTG | AAA | TCT | 384 |
| Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| GGA | ACT | GCC | TCT | GTT | GTG | TGC | CTG | CTG | AAT | AAC | TTC | TAT | CCC | AGA | GAG | 432 |
| Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| GCC | AAA | GTA | CAG | TGG | AAG | GTG | GAT | AAC | GCC | CTC | CAA | TCG | GGT | AAC | TCC | 480 |
| Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| CAG | GAG | AGT | GTC | ACA | GAG | CAG | GAC | AGC | AAG | GAC | AGC | ACC | TAC | AGC | CTC | 528 |
| Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | |
| | | | | 165 | | | | | | 170 | | | | 175 | | |
| AGC | AGC | ACC | CTG | ACG | CTG | AGC | AAA | GCA | GAC | TAC | GAG | AAA | CAC | AAA | GTC | 576 |
| Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| TAC | GCC | TGC | GAA | GTC | ACT | CAT | CAG | GGC | CTG | AGC | TCG | CCC | GTC | ACA | AAG | 624 |
| Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| AGC | TTC | AAC | AGG | GGA | GAG | TGT | | | | | | | | | | 645 |
| Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys | | | | | | | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | | | | | | |

Figura 7

P LIGERO

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CAC | AGT | GCA | CTT | GAA | ATT | GTG | ATG | ACA | CAG | TCT | CCA | GGC | ACC | CTG | TCT | 48 |
| His | Ser | Ala | Leu | Glu | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Gly | Thr | Leu | Ser | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| TTG | TCT | CCA | GGG | GAA | AGA | GCC | ACC | CTC | TCC | TGC | AGG | GCC | AGT | CAG | AGT | 96 |
| Leu | Ser | Pro | Gly | Glu | Arg | Ala | Thr | Leu | Ser | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Ser | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| GTT | AGC | AGC | AGC | TCC | TTA | GCC | TGG | TAC | CAG | CAG | AAA | CCT | GGC | CAG | GCT | 144 |
| Val | Ser | Ser | Ser | Ser | Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| CCC | AGG | CTC | CTC | ATC | TAT | GGT | GCA | TCC | AGC | AGG | GCC | ACT | GGC | ATC | CCA | 192 |
| Pro | Arg | Leu | Leu | Ile | Tyr | Gly | Ala | Ser | Ser | Arg | Ala | Thr | Gly | Ile | Pro | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| GAC | AGG | TTC | AGT | GGC | AGT | GGG | TCT | GGG | ACA | GAC | TTC | ACT | CTC | ACC | ATC | 240 |
| Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| AGC | AGA | CTG | GAG | CCT | GAA | GAT | TTT | GCA | GTG | TAT | TAC | TGT | CAG | CAG | TAT | 288 |
| Ser | Arg | Leu | Glu | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Tyr | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| GGT | GCT | TTC | GGC | GGA | GGG | ACC | AAG | GTG | GAG | ATC | AAA | CGA | ACT | GTG | GCT | 336 |
| Gly | Ala | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Arg | Thr | Val | Ala | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| GCA | CCA | TCT | GTC | TTC | ATC | TTC | CCG | CCA | TCT | GAT | GAG | CAG | TTG | AAA | TCT | 384 |
| Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| GGA | ACT | GCC | TCT | GTT | GTG | TGC | CTG | CTG | AAT | AAC | TTC | TAT | CCC | AGA | GAG | 432 |
| Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| GCC | AAA | GTA | CAG | TGG | AAG | GTG | GAT | AAC | GCC | CTC | CAA | TCG | GGT | AAC | TCC | 480 |
| Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| CAG | GAG | AGT | GTC | ACA | GAG | CAG | GAC | AGC | AAG | GAC | AGC | ACC | TAC | AGC | CTC | 528 |
| Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| AGC | AGC | ACC | CTG | ACG | CTG | AGC | AAA | GCA | GAC | TAC | GAG | AAA | CAC | AAA | GTC | 576 |
| Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| TAC | GCC | TGC | GAA | GTC | ACC | CAT | CAG | GGC | CTG | AAC | TCG | CCC | GTC | ACA | AAG | 624 |
| Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Asn | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| AGC | TTC | AAC | AGG | GGA | GAG | TGT | | | | | | | | | | 645 |
| Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys | | | | | | | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | | | | | | |

Figura 8

S LIGERO

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TCT | CAC | AGT | GCA | CAG | TCT | GTG | CTG | ACT | CAG | CCA | CCC | TCG | GTG | TCA | GTG | 48 |
| Ser | His | Ser | Ala | Gln | Ser | Val | Leu | Thr | Gln | Pro | Pro | Ser | Val | Ser | Val | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| TCC | CCA | GGA | CAG | ACG | GCC | ACG | ATC | ACC | TGC | TCT | GGA | GAT | GCA | TTG | CCA | 96 |
| Ser | Pro | Gly | Gln | Thr | Ala | Thr | Ile | Thr | Cys | Ser | Gly | Asp | Ala | Leu | Pro | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| AAG | CAA | TAT | GTT | TAT | TGG | TAC | CGG | CAG | AAG | CCA | GGC | CAG | GCC | CCT | CTA | 144 |
| Lys | Gln | Tyr | Val | Tyr | Trp | Tyr | Arg | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Leu | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| TTG | GTG | ATA | TAT | GAA | GAC | AGT | GAG | AGG | CCC | TCA | GGG | ATC | CCT | GAA | CGA | 192 |
| Leu | Val | Ile | Tyr | Glu | Asp | Ser | Glu | Arg | Pro | Ser | Gly | Ile | Pro | Glu | Arg | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| TTC | TCT | GGC | TCC | AGT | TCA | GGG | ACT | GAA | GTC | ACG | TTG | AGT | ATC | AGT | GGA | 240 |
| Phe | Ser | Gly | Ser | Ser | Ser | Gly | Thr | Glu | Val | Thr | Leu | Ser | Ile | Ser | Gly | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| GTC | CAG | GCA | GAA | GAC | GAG | GCT | GAC | TAT | TAT | TGT | CAA | TCA | ACA | GAC | AGC | 288 |
| Val | Gln | Ala | Glu | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Ser | Thr | Asp | Ser | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| AGT | GGG | ACT | TAT | GTC | GTC | TTC | GGC | GGA | GGG | ACC | AAG | CTG | ACC | GTC | CTA | 336 |
| Ser | Gly | Thr | Tyr | Val | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| AGT | CAG | CCC | AAG | GCT | GCC | CCC | TCG | GTC | ACT | CTG | TTC | CCG | CCC | TCC | TCT | 384 |
| Ser | Gln | Pro | Lys | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Thr | Leu | Phe | Pro | Pro | Ser | Ser | |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| GAG | GAG | CTT | CAA | GCC | AAC | AAG | GCC | ACA | CTG | GTG | TGT | CTC | ATA | AGT | GAC | 432 |
| Glu | Glu | Leu | Gln | Ala | Asn | Lys | Ala | Thr | Leu | Val | Cys | Leu | Ile | Ser | Asp | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| TTC | TAC | CCG | GGA | GCC | GTG | ACA | GTG | GCC | TGG | AAG | GCA | GAT | AGC | AGC | CCC | 480 |
| Phe | Tyr | Pro | Gly | Ala | Val | Thr | Val | Ala | Trp | Lys | Ala | Asp | Ser | Ser | Pro | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| GTC | AAG | GCG | GGA | GTG | GAG | ACC | ACC | ACA | CCC | TCC | AAA | CAA | AGC | AAC | AAC | 528 |
| Val | Lys | Ala | Gly | Val | Glu | Thr | Thr | Thr | Pro | Ser | Lys | Gln | Ser | Asn | Asn | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| AAG | TAC | GCG | GCC | AGC | AGC | TAT | CTG | AGC | CTG | ACG | CCT | GAG | CAG | TGG | AAG | 576 |
| Lys | Tyr | Ala | Ala | Ser | Ser | Tyr | Leu | Ser | Leu | Thr | Pro | Glu | Gln | Trp | Lys | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| TCC | CAC | AGA | AGC | TAC | AGC | TGC | CAG | GTC | ACG | CAT | GAA | GGG | AGC | ACC | GTG | 624 |
| Ser | His | Arg | Ser | Tyr | Ser | Cys | Gln | Val | Thr | His | Glu | Gly | Ser | Thr | Val | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| GAG | AAG | ACA | GTG | GCC | CCT | ACA | GAA | TGT | TCA | | | | | | | 654 |
| Glu | Lys | Thr | Val | Ala | Pro | Thr | Glu | Cys | Ser | | | | | | | |
| | | 210 | | | | 215 | | | | | | | | | | |

Figura 9

AT PESADO

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GCC | CAG | GTC | CAG | CTG | GTG | CAG | TCT | GGG | GCT | GAG | GTG | AGG | AAG | CCT | GGG | 48 |
| Ala | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Arg | Lys | Pro | Gly | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | |
| GCC | TCA | GTG | AAG | GTT | TCC | TGC | AAG | GCT | TCT | GGA | TAC | GAC | TTC | AGT | AAT | 96 |
| Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Asp | Phe | Ser | Asn | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
| TAT | GCT | ATA | CAT | TGG | GTG | CGC | CAG | GCC | CCC | GGA | CAA | AGG | CTT | GAG | TGG | 144 |
| Tyr | Ala | Ile | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Arg | Leu | Glu | Trp | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | | 45 | | | |
| ATG | GGA | TGG | ATC | AAC | GCT | GGC | AAT | GGG | AAC | ACA | AAA | TTT | TCA | CAG | AAG | 192 |
| Met | Gly | Trp | Ile | Asn | Ala | Gly | Asn | Gly | Asn | Thr | Lys | Phe | Ser | Gln | Lys | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| TTC | CAG | GGC | AGA | ATC | ACC | GTT | ACC | AGG | GAC | ACA | GCC | GCG | AGC | ACA | GCC | 240 |
| Phe | Gln | Gly | Arg | Ile | Thr | Val | Thr | Arg | Asp | Thr | Ala | Ala | Ser | Thr | Ala | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| TAC | ATG | GAG | CTG | CGC | AGT | CTG | AGA | TCT | GAA | GAC | ACG | GCT | GTG | TAT | TAC | 288 |
| Tyr | Met | Glu | Leu | Arg | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| TGT | GCG | AGA | GAT | TCC | TCA | AAT | ATG | GTT | CGG | GGA | ATT | ATT | ATA | GCG | TAC | 336 |
| Cys | Ala | Arg | Asp | Ser | Ser | Asn | Met | Val | Arg | Gly | Ile | Ile | Ile | Ala | Tyr | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| TAT | TTT | GAC | TAC | TGG | GGC | CAG | GGC | ACC | CTG | GTC | ACC | GTC | TCA | AGC | GCC | 384 |
| Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| TCC | ACC | AAG | GGC | CCA | TCG | GTC | TTC | CCC | CTG | GCA | CCC | TCC | TCC | AAG | AGC | 432 |
| Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| ACC | TCT | GGG | GGC | ACA | GCG | GCC | CTG | GGC | TGC | CTG | GTC | AAG | GAC | TAC | TTC | 480 |
| Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| CCC | GAA | CCG | GTG | ACG | GTG | TCG | TGG | AAC | TCA | GGC | GCC | CTG | ACC | AGC | GGC | 528 |
| Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | | |
| GTC | CAC | ACC | TTC | CCG | GCT | GTC | CTA | CAG | TCC | TCA | GGA | CTC | TAC | TCC | CTC | 576 |
| Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| AGC | AGC | GTA | GTG | ACC | GTG | CCC | TCC | AGC | AGC | TTG | GGC | ACC | CAG | ACC | TAC | 624 |
| Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |

Figura 9 (continuación)

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ATC | TGC | AAC | GTG | AAT | CAC | AAG | CCC | AGC | AAC | ACC | AAG | GTG | GAC | AAG | AAA | 672 |
| Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GTT | GAG | CCC | AAA | TCT | TGT | | | | | | | | | | | 690 |
| Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | | | | | | | | | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | | | | | | | |

Figura 10

Y PESADO

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GCC | GAG | GTC | CAG | CTG | GTG | CAG | TCT | GGG | GCT | GAG | GTG | AGG | AAG | CCT | GGG | 48 |
| Ala | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Arg | Lys | Pro | Gly | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | |
| GCC | TCA | GTG | AAG | GTT | TCC | TGC | AAG | GCT | TCT | GGA | TAC | GAC | TTC | AGT | AAT | 96 |
| Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Asp | Phe | Ser | Asn | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| TAT | GCT | ATA | CAT | TGG | GTG | CGC | CAG | GCC | CCC | GGA | CAA | AGG | CTT | GAG | TGG | 144 |
| Tyr | Ala | Ile | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Arg | Leu | Glu | Trp | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| ATG | GGA | TGG | ATC | AAC | GCT | GGC | AAT | GGG | AAC | ACA | AAA | TTT | TCA | CAG | AAG | 192 |
| Met | Gly | Trp | Ile | Asn | Ala | Gly | Asn | Gly | Asn | Thr | Lys | Phe | Ser | Gln | Lys | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| TTC | CAG | GGC | AGA | ATC | ACC | GTT | ACC | AGG | GAC | ACA | GCC | GCG | AGC | ACA | GCC | 240 |
| Phe | Gln | Gly | Arg | Ile | Thr | Val | Thr | Arg | Asp | Thr | Ala | Ala | Ser | Thr | Ala | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| TAC | ATG | GAG | CTG | CGC | AGT | CTG | AGA | TCT | GAA | GAC | ACG | GCT | GTG | TAT | TAC | 288 |
| Tyr | Met | Glu | Leu | Arg | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | |
| | | | | 85 | | | | 90 | | | | | | 95 | | |
| TGT | GCG | AGA | GAT | TCC | TCA | AAT | ATG | GTT | CGG | GGA | ATT | ATT | ATA | GCG | TAC | 336 |
| Cys | Ala | Arg | Asp | Ser | Ser | Asn | Met | Val | Arg | Gly | Ile | Ile | Ile | Ala | Tyr | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| TAT | TTT | GAC | TAC | TGG | GGC | CAG | GGC | ACC | CTG | GTC | ACC | GTC | TCA | AGC | GCC | 384 |
| Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| TCC | ACC | AAG | GGC | CCA | TCG | GTC | TTC | CCC | CTG | GCA | CCC | TCC | TCC | AAG | AGC | 432 |
| Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| ACC | TCT | GGG | GGC | ACA | GCG | GCC | CTG | GGC | TGC | CTG | GTC | AAG | GAC | TAC | TTC | 480 |
| Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| CCC | GAA | CCG | GTG | ACG | GTG | TCG | TGG | AAC | TCA | GGC | GCC | CTG | ACC | AGC | GGC | 528 |
| Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | | |
| GTC | CAC | ACC | TTC | CCG | GCT | GTC | CTA | CAG | TCC | TCA | GGA | CTC | TAC | TCC | CTC | 576 |
| Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| AGC | AGC | GTA | GTG | ACC | GTG | CCC | TCC | AGC | AGC | TTG | GGC | ACC | CAG | ACC | TAC | 624 |
| Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | |
| | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | | | |

Figura 10 (continuación)

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ATC | TGC | AAC | GTG | AAT | CAC | AAG | CCC | AGC | AAC | ACC | AAG | GTG | GAC | AAG | AAA | 672 |
| Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GTT | GAG | CCC | AAA | TCT | TGT | | | | | | | | | | | 690 |
| Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | | | | | | | | | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | | | | | | | |

Figura 11

P PESADO

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GCC | GAG | GTC | CAG | CTG | GTG | CAG | TCT | GGG | GGA | GGC | TTG | GTC | CAG | CCT | GGG | 48 |
| Ala | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| GGG | TCC | CTG | AGA | CTC | TCC | TGT | TTA | GTC | TCT | GGA | TTC | ACC | TTC | AAT | AAC | 96 |
| Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Leu | Val | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Asn | Asn | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| TAT | CCT | ATG | CAC | TGG | GTC | CGC | CAG | GCT | CCA | GGC | AAG | GGG | CTG | GAG | TGG | 144 |
| Tyr | Pro | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| GTG | GCA | GTT | ATA | TCA | TAT | GAT | GGA | AAT | AAT | AAA | TAC | TAC | GCA | GAC | TCC | 192 |
| Val | Ala | Val | Ile | Ser | Tyr | Asp | Gly | Asn | Asn | Lys | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| GTG | AAG | GGC | CGA | TTC | ACC | ATC | TCC | AGA | GAC | AAT | TCC | AAG | AAC | ACG | CTG | 240 |
| Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn | Thr | Leu | |
| 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | | 80 | |
| TAT | TTG | CAA | ATG | AAC | AGC | CTG | AGA | TCT | GAG | GAC | ACG | GCC | GTG | TAT | TAC | 288 |
| Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| TGT | GCG | AGG | GGG | GGC | GGT | GGC | TTT | GAC | TAC | TGG | GGC | CAG | GGA | ACC | CTG | 336 |
| Cys | Ala | Arg | Gly | Gly | Gly | Gly | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| GTC | ACC | GTC | TCA | AGC | GCC | TCC | ACC | AAG | GGC | CCA | TCG | GTC | TTC | CCC | CTG | 384 |
| Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| GCA | CCC | TCC | TCC | AAG | AGC | ACC | TCT | GGG | GGC | AÇA | GCG | GCC | CTG | GGC | TGC | 432 |
| Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| CTG | GTC | AAG | GAC | TAC | TTC | CCC | GAA | CCG | GTG | ACG | GTG | TCG | TGG | AAC | TCA | 480 |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | |
| 145 | | | | | 150 | | | | 155 | | | | | | 160 | |
| GGC | GCC | CTG | ACC | AGC | GGC | GTC | CAC | ACC | TTC | CCG | GCT | GTC | CTA | CAG | TCC | 528 |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| TCA | GGA | CTC | TAC | TCC | CTC | AGC | AGC | GTA | GTG | ACC | GTG | CCC | TCC | AGC | AGC | 576 |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| TTG | GGC | ACC | CAG | ACC | TAC | ATC | TGC | AAC | GTG | AAT | CAC | AAG | CCC | AGC | AAC | 624 |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | |
| | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | | | |
| ACC | AAG | GTG | GAC | AAG | AAA | GTT | GAG | CCC | AAA | TCT | TGT | | | | | 660 |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |

Figura 12

S PESADO

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GCC | GAG | GTG | CAG | CTG | CTG | GAG | TCT | GGG | GGA | GGC | TTG | GTA | CAA | CCT | GGC | 48 |
| Ala | Glu | Val | Gln | Leu | Leu | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | |
| AGG | TCC | CTG | AGA | CTC | TCC | TGT | GCA | GCC | TCT | GGA | TTC | ACC | TTT | GAT | GAT | 96 |
| Arg | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Asp | Asp | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| TAT | GCC | ATG | CAC | TGG | GTC | CGG | CAA | GCT | CCA | GGG | AAG | GGC | CTG | GAG | TGG | 144 |
| Tyr | Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| GTC | TCA | GGT | ATT | AGT | TGG | AAT | AGT | GGT | AGG | ATA | GGC | TAT | GCG | GAC | TCT | 192 |
| Val | Ser | Gly | Ile | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Arg | Ile | Gly | Tyr | Ala | Asp | Ser | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| GTG | AAG | GGC | CGA | TTC | ACC | ATC | TCC | AGA | GAC | AAC | GCC | AAG | AAC | TCC | CTG | 240 |
| Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Ser | Leu | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| TAT | CTG | CAA | ATG | AAC | AGT | CTG | AGA | CCT | GAG | GAC | ACG | GCC | TTC | TAT | TAC | 288 |
| Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Pro | Glu | Asp | Thr | Ala | Phe | Tyr | Tyr | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| TGT | GCA | AAA | GGG | GGT | TCT | ACA | AGC | GCG | AGG | TAT | AGC | AGT | GGC | TGG | TAC | 336 |
| Cys | Ala | Lys | Gly | Gly | Ser | Thr | Ser | Ala | Arg | Tyr | Ser | Ser | Gly | Trp | Tyr | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| TAC | TGG | GGC | CAG | GGC | ACC | CTG | GTC | ACC | GTC | TCA | AGC | GCC | TCC | ACC | AAG | 384 |
| Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| GGC | CCA | TCG | GTC | TTC | CCC | CTG | GCA | CCC | TCC | TCC | AAG | AGC | ACC | TCT | GGG | 432 |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| GGC | ACA | GCG | GCC | CTG | GGC | TGC | CTG | GTC | AAG | GAC | TAC | TTC | CCC | GAA | CCG | 480 |
| Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| GTG | ACG | GTG | TCG | TGG | AAC | TCA | GGC | GCC | CTG | ACC | AGC | GGC | GTC | CAC | ACC | 528 |
| Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| TTC | CCG | GCT | GTC | CTA | CAG | TCC | TCA | GGA | CTC | TAC | TCC | CTC | AGC | AGC | GTA | 576 |
| Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| GTG | ACC | GTG | CCC | TCC | AGC | AGC | TTG | GGC | ACC | CAG | ACC | TAC | ATC | TGC | AAC | 624 |
| Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| GTG | AAT | CAC | AAG | CCC | AGC | AAC | ACC | AAG | GTG | GAC | AAG | AAA | GTT | GAG | CCC | 672 |
| Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |

Figura 12 (continuación)

AAA TCT TGT
Lys Ser Cys
225

681

Figura 13
Comparación de secuencia de aminoácido Fab

| | | <u>Matriz cadena pesada de secuencia</u> | | | <u>Matriz cadena ligera de secuencia</u> | | | | |
|-----------|-----------|--|------|------|--|------|------|------|------|
| SIMILITUD | IDENTIDAD | IDENTIDAD | | | IDENTIDAD | | | | |
| | | AT | Y | P | S | AT | Y | P | S |
| AT | --- | 99,6 | 76,9 | 72,3 | AT | --- | 85,7 | 86,9 | 46,9 |
| Y | 100 | --- | 78,6 | 72,8 | Y | 89,0 | --- | 91,5 | 47,4 |
| P | 80,5 | 81,6 | --- | 88,6 | P | 89,4 | 92,3 | --- | 47,4 |
| S | 78,6 | 79,0 | 91,8 | --- | S | 59,3 | 59,8 | 60,8 | --- |

Figura 14
Comparación CDRs Fab

| Patrón | | Cadena pesada | | |
|--------|-------------|-------------------|--------------------|------|
| | | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| AT | NYAIIH | WINAGNGNTKFSQKFQG | DSSNMVRGIIIIAAYFDY | |
| Y | NYAIIH | WINAGNGNTKFSQKFQG | DSSNMVRGIIIIAAYFDY | |
| P | NYPMH | VISYDGNKYYADSVKG | GGGFDY | |
| S | DYAMH | GISWNSGRIGYADSVKG | GGTSARYSSGWYY | |
| Patrón | | Cadena ligera | | |
| | | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
| AT | RASQISRYLN | GASSLQS | QHTRA | |
| Y | RASQSVGSYLA | DATNRAT | QHRRRT | |
| P | RASQSVSSSLA | GASSRAT | QQYGA | |
| S | SGDALPKQY | EDSERPS | QSTDSSGTYVV | |

Figura 15
Clases Fab

| Patrón | Cadena pesada | | Cadena ligera | |
|--------|---------------|----------------|------------------|------------|
| | Familia | V | Familia | V |
| AT | VH1 | 1-03 3-10 JH4b | VK1 | 012/02 JK1 |
| Y | VH1 | 1-03 3-10 JH4b | VK3 | L6 JK2 |
| P | VH3 | 3-30 * JH4b | VK3 | A27 JK4 |
| S | VH3 | 3-09 6-19 JH4b | V _L 3 | ** JL2/JL3 |

Figura 16

COMPARACIÓN DE SECUENCIA DE CADENA PESADA FABS "AT" E "Y"
CON LÍNEA GERMINAL

| | | H1 | | | | | | | | | |
|-------------------|------|--------------------------------|------------------------------------|----------------|--------------------------|---|--|--------------------|--|--|--|
| | | FR1 | | | CDR1 | | | FR2 | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | | | | 4 | | | |
| Locus | | 123456789012345678901234567890 | 1ab2345 | 67890123456789 | | | | | | | |
| 1-03 | | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT | S--YAMH | WVRQAPGQRLEWMG | | | | | | | |
| "AT" | | QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYDFS | N YAIH | WVRQAPGQRLEWMG | | | | | | | |
| "Y" | | EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYDFS | N YAIH | WVRQAPGQRLEWMG | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | | | | | |
| | | CDR2 | | | FR3 | | | | | | |
| | | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | | | | |
| Locus | | 012abc3456789012345 | 67890123456789012abc345678901234 | | | | | | | | |
| 1-03 | | WINA--GNGNTKYSQKFQG | RVTITRDTSASTAYMELSSLRSED | TAVYYCAR | | | | | | | |
| "AT" | | WINA GNGNTK F SQKFQG | RITVTRDTA A ASTAYMELRSLRSED | TAVYYCAR | | | | | | | |
| "Y" | | WINA GNGNTK F SQKFQG | RITVTRDTA A ASTAYMELRSLRSED | TAVYYCAR | | | | | | | |
| CDR3 | | | | | | | | | | | |
| Diversidad | | VLLWFGELL* | | | YYYGSGSYYN | | | ITMVRGVII | | | |
| 3-10 | | | | | DS | | | SNMVRGIIIAY | | | |
| "AT" | | | | | DS | | | SNMVRGIIIAY | | | |
| "Y" | | | | | | | | | | | |
| H3 | | | | | | | | | | | |
| CDR3 | | | | | | | | | | | |
| | | 100 | | | 110 | | | | | | |
| Unión | JH4 | YFDYWGQGT L VTVSS | | | YFDYWGQGT L VTVSS | | | | | | |
| | "AT" | YFDYWGQGT L VTVSS | | | YFDYWGQGT L VTVSS | | | | | | |
| | "Y" | YFDYWGQGT L VTVSS | | | YFDYWGQGT L VTVSS | | | | | | |

Figura 17

COMPARACIÓN SECUENCIA DE CADENA PESADA FAB "P" CON LÍNEA GERMINAL

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------------------------------------|---|----------------|-----|------|--|---|--|-----|---|--|--|
| | H1 | | | | | | | | | | | |
| | FR1 | | | | CDR1 | | | | FR2 | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | |
| | 1 | | | 2 | | | 3 | | | 4 | | |
| Locus | 123456789012345678901234567890 | 1ab2345 | 67890123456789 | | | | | | | | | |
| 3-30 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS | S--YGMH | WVRQAPGKGLEWVA | | | | | | | | | |
| "P" | EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCLVSGFTFN | N YPMH | WVRQAPGKGLEWVA | | | | | | | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | |
| | H2 | | | | | | | | | | | |
| | CDR2 | | | FR3 | | | | | | | | |
| | ----- | | | | | | | | | | | |
| | 5 | | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | | | |
| Locus | 012abc3456789012345 | 67890123456789012abc345678901234 | | | | | | | | | | |
| 3-30 | VISY--DGSNKYYADSVKG | RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK | | | | | | | | | | |
| "P" | VISY DGN NKYYADSVKG | RFTISRDN SKNTLYLQMNSL R SED TAVYYCAR | | | | | | | | | | |

Diversidad desconocida

"P" GGG

| | | |
|-------|------------------------|-----|
| | H3 | |
| | ----- | |
| | CDR3 | |
| | ----- | |
| | 100 | 110 |
| Unión | | |
| JH4 | -----YFDYWGQGLVTVSS | |
| "P" | G FDYWGQGLVTVSS | |

Figura 18

COMPARACIÓN DE SECUENCIA DE CADENA PESADA FAB "S" CON LÍNEA GERMINAL

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------------------------|-----------|----------------|----------------|------|--|---|--|-----|---|--|--|
| | H1 | | | | | | | | | | | |
| | FR1 | | | | CDR1 | | | | FR2 | | | |
| | 1 | | | 2 | | | 3 | | | 4 | | |
| Locus | 123456789012345678901234567890 | 1ab2345 | 67890123456789 | | | | | | | | | |
| 3-09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS | CAASGFTFD | D--YAMH | WVRQAPGKGLEWVS | | | | | | | | |
| "S" | EVQLLESGGGLVQPGRSLRLS | CAASGFTFD | D YAMH | WVRQAPGKGLEWVS | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------------------|----------------------------------|------------|-----------------|---|--|-----|--|---|--|--|--|
| | H2 | | | | | | | | | | | |
| | CDR2 | | | | | | FR3 | | | | | |
| | 5 | | 6 | | 7 | | 8 | | 9 | | | |
| Locus | 012abc3456789012345 | 67890123456789012abc345678901234 | | | | | | | | | | |
| 3-09 | GISW--NSGSIGYADSVKG | RFTISRDN | AKNSLYLQMN | SLRAEDTALYYCAKD | | | | | | | | |
| "S" | GISW NSGRIGYADSVKG | RFTISRDN | AKNSLYLQMN | SLRPEDTAFYYCAKG | | | | | | | | |

Diversidad

| | | | |
|------|---------|--------|--------|
| 6-19 | GYSSGWY | GIAVAG | V*QWLV |
| "S" | GSTSARY | SS | |

| | | | | |
|-------|------|-----------|--------|--|
| | H3 | | | |
| | CDR3 | | | |
| | 100 | | 110 | |
| Unión | JH4 | YFDYWGQGT | LVTVSS | |
| "S" | | GWYYWGQGT | LVTVSS | |

Figura 19

COMPARACIÓN DE SECUENCIA DE CADENA LIGERA FAB "AT" CON LÍNEA GERMINAL

| | L1 | | | L2 | |
|-------|-------------------------|-----------------------|-----------------|---------|-------|
| | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Locus | 12345678901234567890123 | 456789012345678901234 | 567890123456789 | 0123456 | |
| O12 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC | RASQSISS-----YLN | WYQQKPGKAPKLLIY | AASSLQS | |
| "AT" | EIVMTQSPSSLSASVGDRTITC | RASQSISS YLN | WYQLKPGKAPRLLIY | GASSLQS | |

| | L3 | | | |
|-------|----------------------------------|---------|---|---|
| | FR3 | CDR3 | | |
| | ----- | ----- | | |
| | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Locus | 7890123456789012345678 | 9012345 | | |
| O12 | GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC | QQSYSTP | | |
| "AT" | GVPSRFSGSGSGAEFTLTITSSLPEDIATYYC | QHTRA-- | | |

| | L3 |
|-------|--------------|
| | ----- |
| | CDR3 |
| | ----- |
| Unión | 100 |
| JK1 | WTFGQGTKVEIK |
| "AT" | --FGQGTKVEIK |

Figura 21

COMPARACIÓN DE SECUENCIA DE CADENA LIGERA FAB "P" CON LÍNEA GERMINAL

| | FR1 | | L1 ----- CDR1 | | FR2 | L2 --- |
|---------|----------------------------------|-----------------------|---------------------|---------|-----------------|-----------|
| CDR2 | ----- | | ----- | | ----- | --- |
| | 1 | 2 | 3 | | 4 | 5 |
| Locus | 12345678901234567890123 | 456789012345678901234 | 567890123456789 | | 567890123456789 | |
| 0123456 | | | | | | |
| A27 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC | RASQSVSS-----YLA | WYQOKPGQAPRLLIY | | | |
| DASNRAT | | | | | | |
| "P" | EIVMTQSPGTLSSLSPGERATLSC | RASQSVSS | SSLA | | WYQOKPGQAPRLLIY | |
| GASSRAT | | | | | | |
| | FR3 | | L3 ----- CDR3 | | | |
| | 6 | 7 | 8 | 9 | | |
| Locus | 7890123456789012345678 | 90123456789012345678 | 9012345678 | 9012345 | | |
| A27 | GIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC | QQRSNWP | | | | |
| "P" | GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC | QQY---- | | | | |
| | L3 - CDR3 -- | | | | | |
| Unión | 100 | | | | | |
| JK4 | LTFGGGTKVEIK | | | | | |
| "P" | G AFGGGTKVEIK | | | | | |

Figura 22

COMPARACIÓN DE SECUENCIA DE CADENA LIGERA FAB "S" CON LÍNEA GERMINAL

| | FR1 | | CDR1 | FR2 | CDR2 |
|-------|---|----------------|-----------------|-----------------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Locus | 1234567891234567890123 | 45678901abc234 | 567890123456789 | 01abcde23456 | |
| *3m | SYELMQPPSVSVSPGQTARITC | SG-DA-LPKQ-YAY | WYQQKPGQAPVLVIY | KD-----SERPS | |
| "S" | QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC | SG DA LPKQ YVY | WYRQKPGQAPLLVIY | ED SERPS | |
| | FR3 | | CDR3 | | |
| | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| Locus | 789012345678ab90123456789012345678 | 9012345abcde | | | |
| *3m | GIPERFSGSSSG--TTVTLTISGVQAEDEADYYC | QSDSSGT | | | |
| "S" | GIPERFSGSSSG . TEVTL SISGVQAEDEADYYC | QSTDSSGT | | | |
| | CDR3 | | | | |
| | --- | | | | |
| | 100 | | | | |
| Unión | | | | | |
| JL2 | VVFGGGTKLTVL | | | | |
| "S" | VVFGGGTKLTVL | | | | |

*Se identificó la región variable pero no fue nombrada todavía.
La pareja más próxima siguiente es "3m" mostrada.

Figura 23
Bioensayo de célula Raw
"AT" 405, "AT" 406, "AT" 407

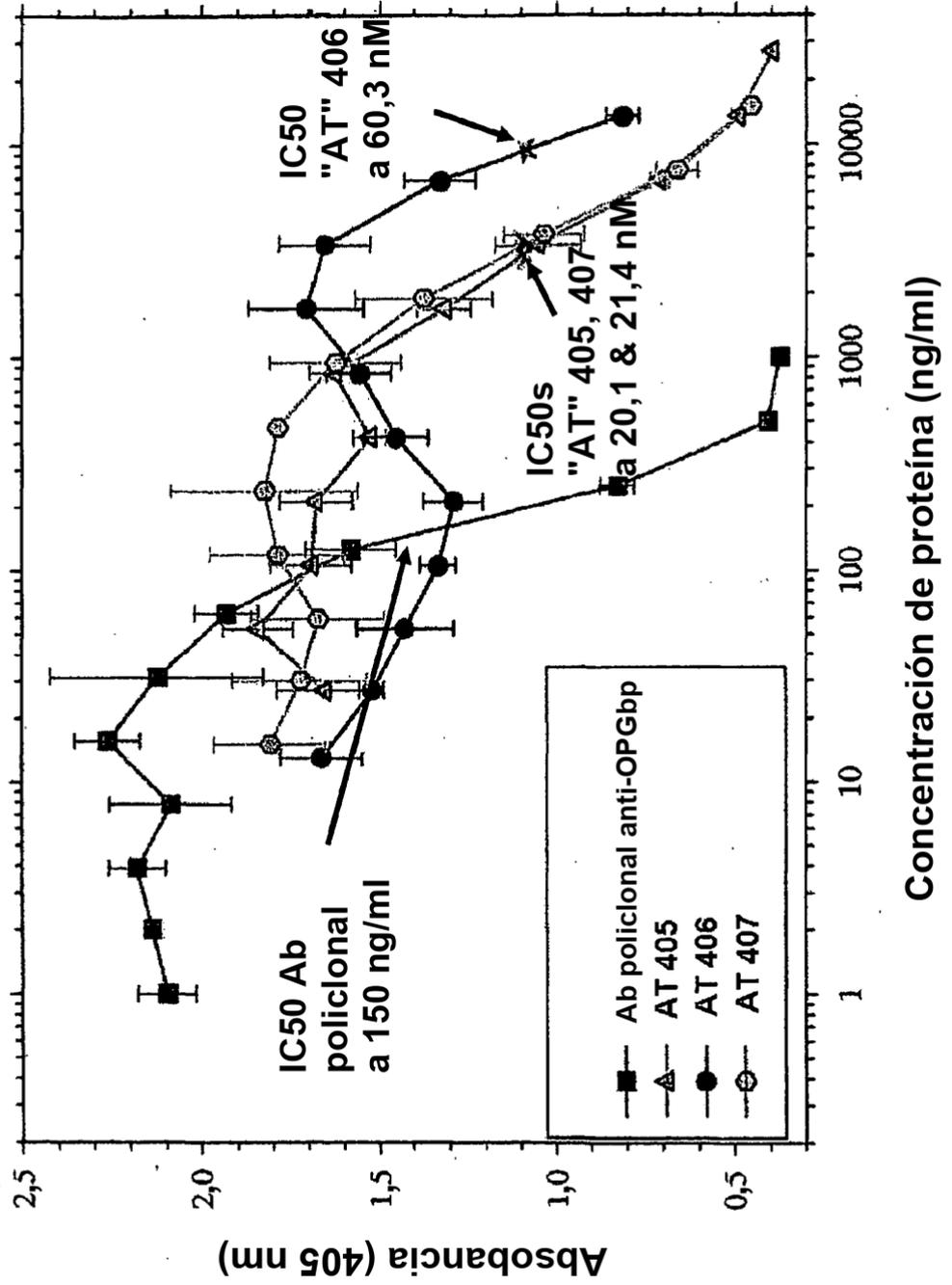


Figura 24
Ensayo de médula ósea
"AT" 405, "AT" 407

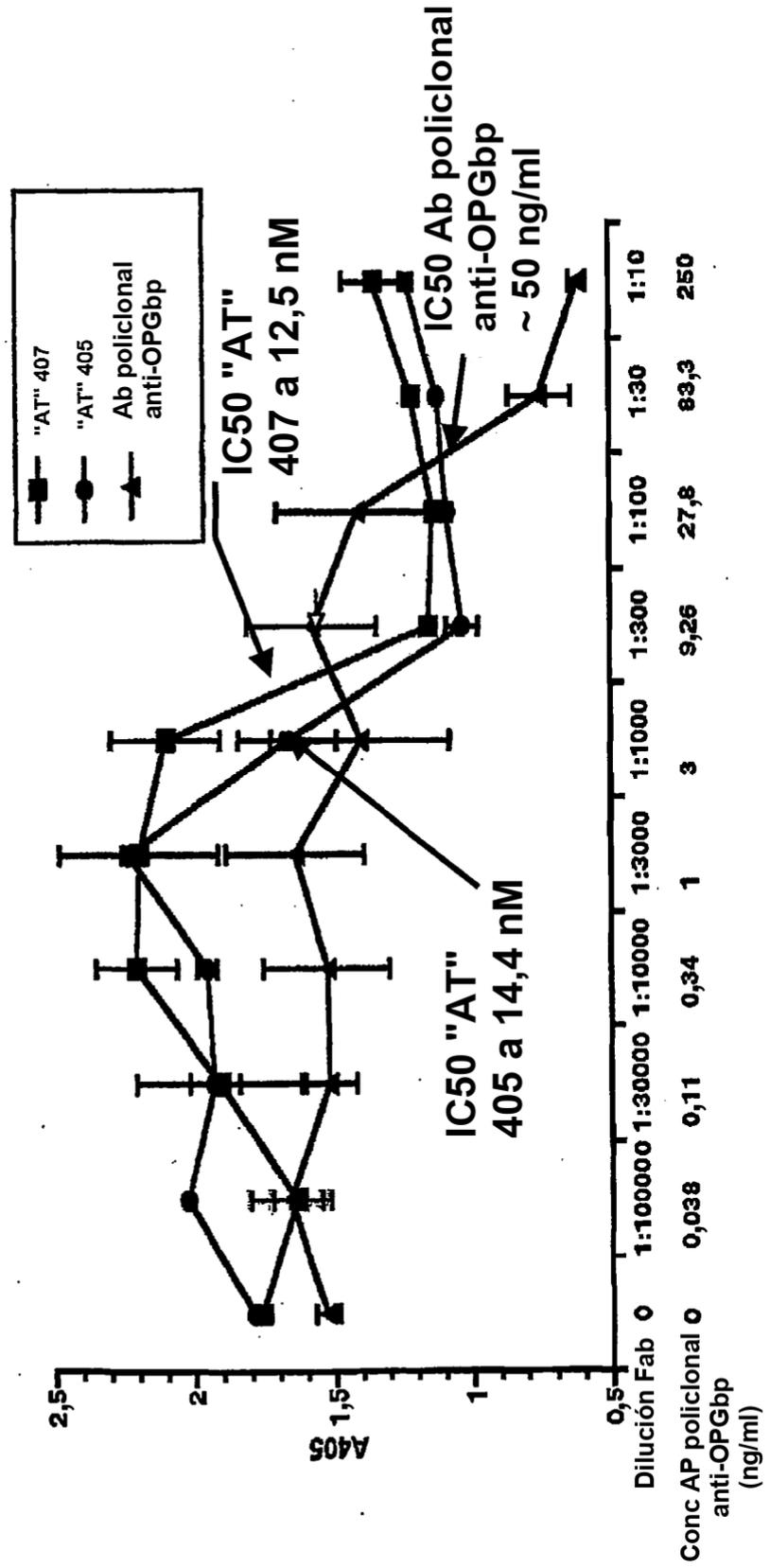


Figura 25
Ensayo de médula ósea "AT" 406

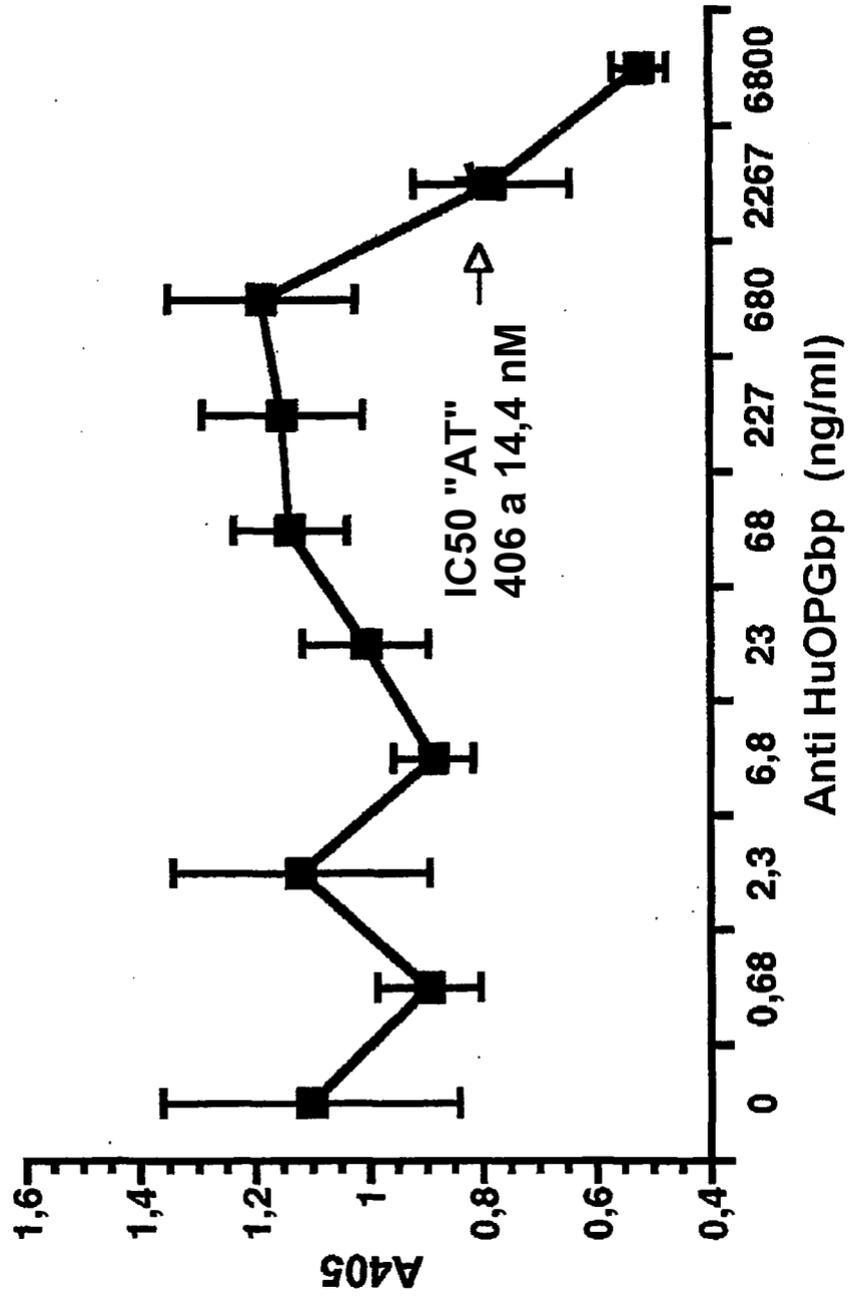


Figura 26
 Ensayo de médula ósea
 "S" 435 e "Y" 429

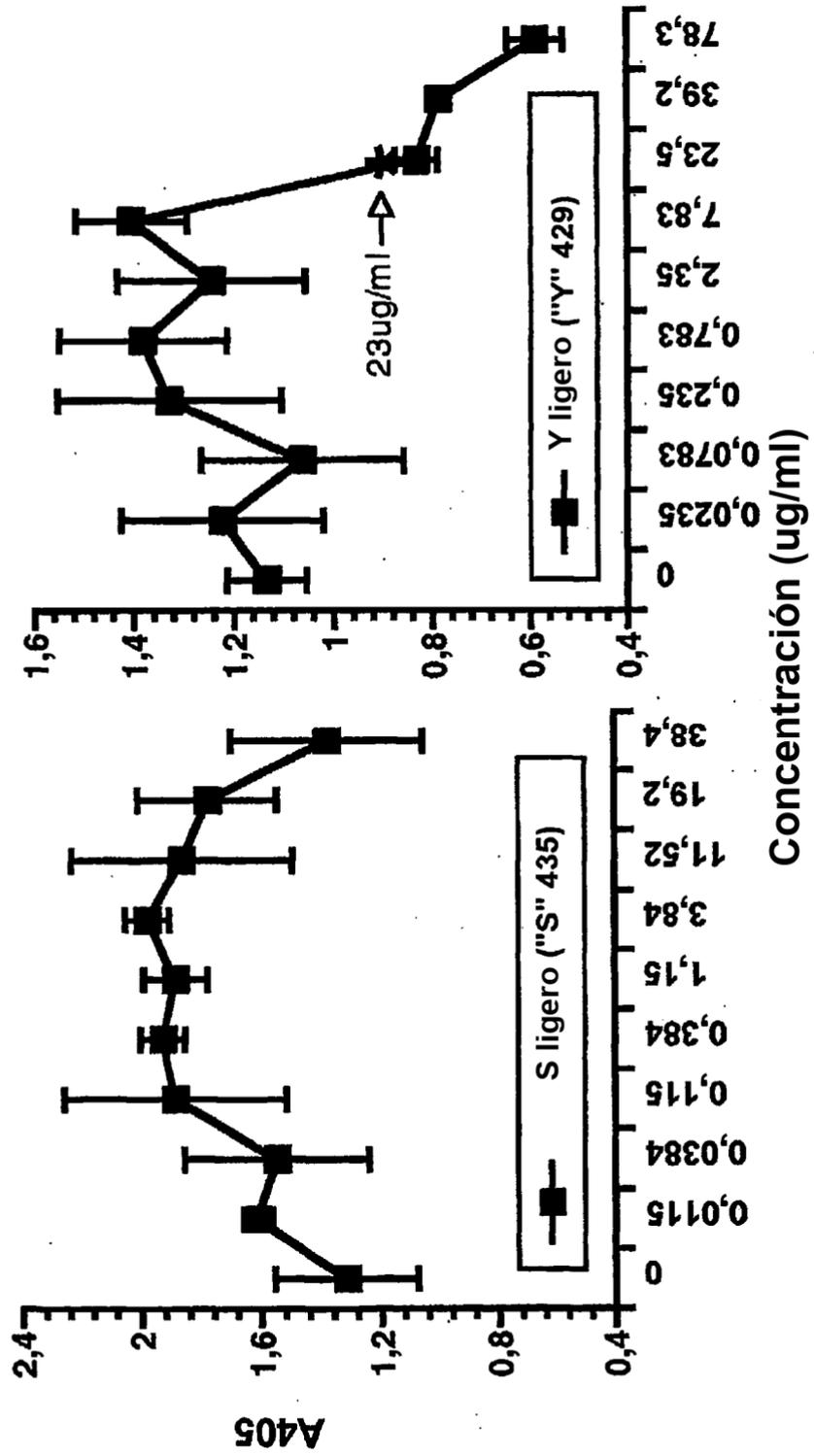


Figura 27
 Ensayo de médula ósea
 "Y" 442 y "P" 444

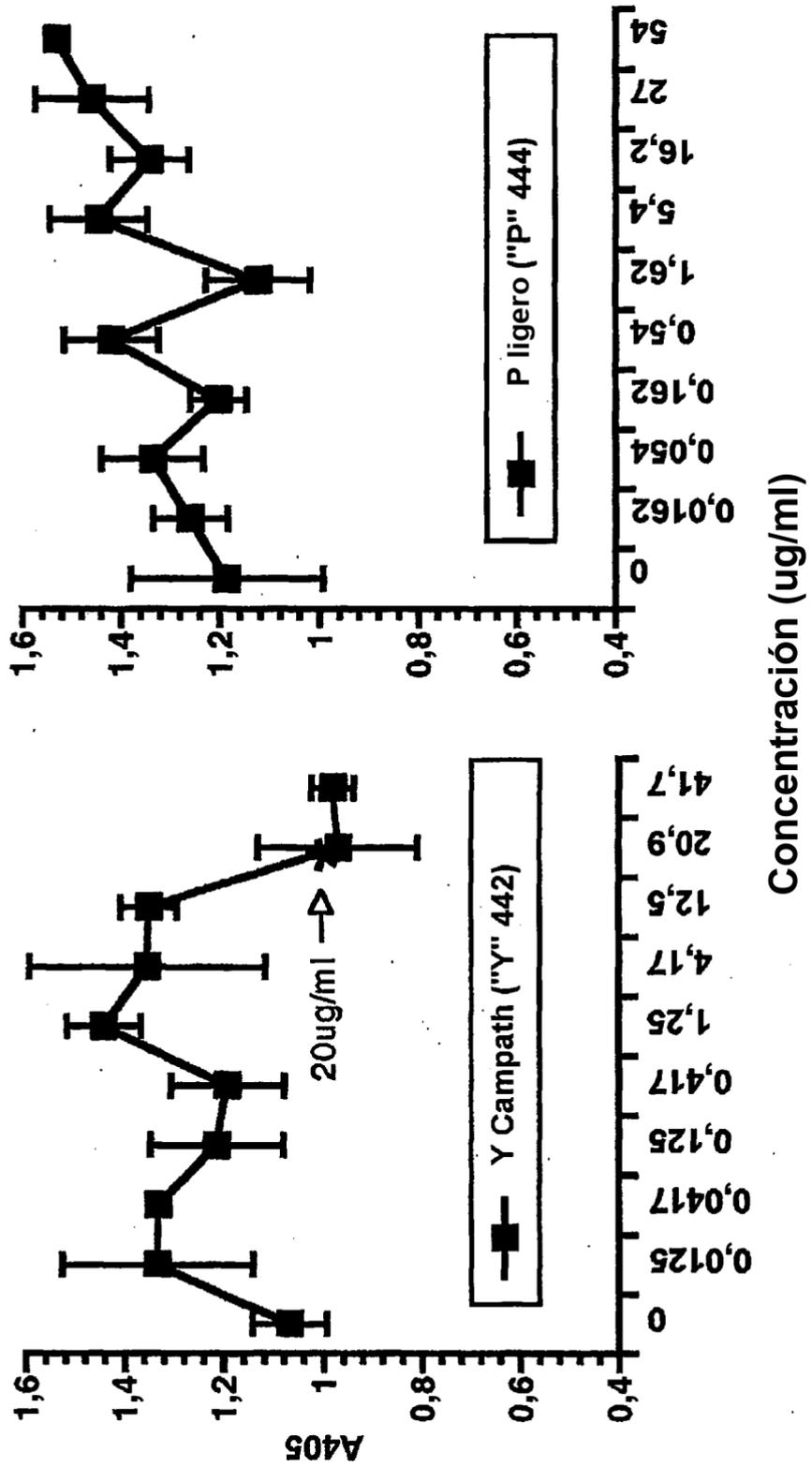


FIGURA 28

| | |
|---|-----|
| cat atg gac tac aag gac gac gat gac aag aag ctt aag cct gag gcc | 48 |
| Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Lys Pro Glu Ala | |
| 1 5 10 15 | |
| cag cca ttt gca cac ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg ggt | 96 |
| Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly | |
| 20 25 30 | |
| tcc cat aaa gtc act ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg gcc | 144 |
| Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala | |
| 35 40 45 | |
| aag atc tct aac atg acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac caa | 192 |
| Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln | |
| 50 55 60 | |
| gat ggc ttc tat tac ctg tac gct aac att tgc ttt cgg cat cat gaa | 240 |
| Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu | |
| 65 70 75 | |
| aca tcg gga gac ctg gct act gaa tat ctt cag ctg atg gtg tat gtc | 288 |
| Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val | |
| 80 85 90 95 | |
| ggt aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa gga | 336 |
| Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly | |
| 100 105 110 | |
| ggg agc acg aaa aac tgg tcg ggc aat tct gaa ttc cac ttt tat tcc | 384 |
| Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser | |
| 115 120 125 | |
| ata aat gtt ggg gga ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att agc | 432 |
| Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser | |
| 130 135 140 | |
| att cag gtg tcc aac cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg acg | 480 |
| Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr | |
| 145 150 155 | |
| tac ttt ggg gct ttc aaa gtt cag gac ata gac taa ctc gag | 522 |
| Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp | |
| 160 165 170 | |

FIGURA 29

| | |
|---|--|
| <p>OPGbp humana [143-317]</p> <p>OPGbp murínica [158-316]</p> <p>OPGbp FLAG-murínico [158-316] /DE</p> | <p>212 GFYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVVYVVKTSIKIP 250</p> <p> : </p> <p>211 GFYLYANICFRHHETSGSVPTDYQLMVVYVVKTSIKIP 249</p> <p> : </p> <p>GFYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVVYVVKTSIKIP</p> |
|---|--|

FIGURA 30

