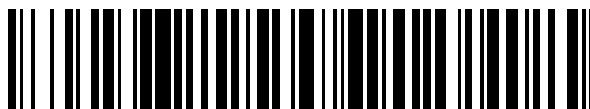


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 881**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2001** **E 16198812 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019** **EP 3184545**

54 Título: **Agentes de unión selectiva antagonistas de proteína que se une 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:
06.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 758 881 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 de unión selectiva antagonistas de proteína que se une a osteoprotegerina

Campo de la Invención

- 5 La invención se refiere a anticuerpos monoclonales y dominios de unión a antígeno que se unen selectivamente a OPGbp y se pueden usar para prevenir o tratar afecciones que relacionadas con la pérdida de masa ósea.

Antecedentes de la invención

- 10 El tejido óseo vivo exhibe un equilibrio dinámico entre la deposición y la resorción de hueso. Estos procesos están mediados principalmente por dos tipos de células: los osteoblastos, que secretan moléculas que comprenden la matriz orgánica del hueso; y los osteoclastos, que promueven la disolución de la matriz ósea y la solubilización de sales óseas. En individuos jóvenes con el hueso en crecimiento, la velocidad de deposición ósea supera a la velocidad de resorción ósea, mientras que en los individuos más viejos la velocidad de resorción puede superar a la de deposición. En la última situación, el incremento de la descomposición de hueso conduce a una reducción de la masa y la resistencia óseas, un incremento del riesgo de fracturas y una reparación lenta o incompleta de los huesos rotos.

- 15 Los osteoclastos son células multinucleadas fagocíticas grandes que se forman a partir de células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea. Aunque el crecimiento y la formación de osteoclastos funcionales maduros no se entiende bien, se cree que los osteoclastos maduran a lo largo del linaje celular de monocitos/macrófagos en respuesta a la exposición a diversos factores promotores del crecimiento. Se cree que el desarrollo temprano de células precursoras de la médula ósea está mediado por factores solubles tales como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de necrosis tumoral β (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 estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) añadido. Estos factores actúan principalmente en las etapas previas de desarrollo de osteoclastos.

- 25 Se ha descrito que un factor polipeptídico, la proteína que se une a osteoprotegerina (OPGbp), estimula la formación de osteoclastos y la resorción ósea y parece actuar en una fase de desarrollo tardía. Véase el documento PCT WO98/46751. La OPGbp estimula la formación de osteoclastos a partir de células precursoras de la médula ósea sin el requisito de cocultivar en presencia de una línea de células estromáticas. La estimulación de la resorción ósea mediante OPGbp requería interacción con su receptor cognado, el receptor de la diferenciación y la activación de osteoprotegerina (ODAR), y la inhibición de la interacción ODAR/OPGbp mediante osteoprotegerina (OPG) también inhibía la resorción ósea. Por consiguiente, la regulación de la unión de OPGbp a ODAR afecta a la formación de osteoclastos y la pérdida de hueso.

- 35 Un objetivo de la invención es identificar agentes de unión selectivos que regulen la interacción de OPGbp y ODAR, especialmente los agentes que bloqueen la interacción de OPGbp y ODAR y/o inhiban al menos una actividad de OPGbp, tal como la resorción ósea. Un objetivo adicional de la invención es identificar los agentes de unión selectiva que se puedan usar para prevenir y tratar la pérdida de masa ósea. Un objetivo adicional de la invención es identificar un anticuerpo, o un dominio de unión a antígeno, o uno de sus fragmentos o variantes, que regule la interacción de OPGbp y ODAR y neutralice al menos una actividad de OPGbp. Los anticuerpos se pueden usar para prevenir y tratar la pérdida de masa ósea.

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

- 45 Sumario de la invención

Son realizaciones de la invención:

1. Un anticuerpo monoclonal o su dominio de unión a antígeno

que comprende uno o más cambios de aminoácido en una o más CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo, en donde

- 50 a) la CDR1 de VL tiene la secuencia RASQISRYLN de SEQ ID NO: 01,

la CDR2 de VL tiene la secuencia GASSLQS de SEQ ID NO: 05 y

la CDR3 de VL tiene la secuencia QHTRA de SEQ ID NO: 09, y

b) la CDR1 de VH tiene la secuencia NYAIH de SEQ ID NO: 13,

la CDR2 de VH tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG de SEQ ID NO: 16,

y la CDR3 de VH tiene la secuencia DSSNMVRGIIIAYYFDY de SEQ ID NO: 19,

5 que se une a una porción de la secuencia de aminoácidos GGFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIP de SEQ ID NO: 76 desde el residuo de aminoácido 212 hasta el residuo de aminoácido 250 de OPGbp humana,

en donde el anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno inhibe la formación o la activación de osteoclastos mediada por OPGbp humana.

10 2. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según la realización 1, que se une a la secuencia de aminoácidos DLATE dentro de SEQ ID NO: 76.

3. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según las realizaciones 1 o 2, que es un anticuerpo recombinante o uno de sus dominios que se unen a antígeno.

15 4. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en donde el uno o más cambios de aminoácido comprenden sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de residuos de aminoácido.

5. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las realizaciones 1 a 4, que es un anticuerpo totalmente humano o uno de sus dominios que se unen a antígeno.

6. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, que es un anticuerpo monocatenario o uno de sus dominios que se unen a antígeno.

20 7. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las realizaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.

8. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las realizaciones 1 a 6, para el uso en la inhibición de la formación o activación de osteoclastos.

25 9. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las realizaciones 1 a 6, para el uso en la inhibición de la resorción ósea.

10. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las realizaciones 1 a 6, para el uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida de masa ósea.

30 11. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según la realización 10, en donde la pérdida de masa ósea resulta de osteoporosis, metástasis de cáncer de huesos; artritis reumatoide, hipercalcemia maligna y osteoporosis inducida por esteroides.

12. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según cualquiera de las realizaciones 8 a 11, en donde se va a administrar además una composición que comprende al menos un agente contra la resorción ósea.

35 13. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según la realización 12, en donde el agente contra la resorción ósea es estrógeno, un bisfosfonato o un modulador selectivo de receptores de estrógenos.

14. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según cualquiera de las realizaciones 8 a 11, en donde se va a administrar además una composición que comprende un agente anabolizante.

15. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según la realización 14, en donde el agente anabolizante es hormona paratiroidea o un complejo de factor de crecimiento insulinoide y proteína que se une a factor de crecimiento insulinoide.

Un anticuerpo se puede preparar al inmunizar a un animal con OPGbp tal como OPGbp murina o humana, preferiblemente OPGbp humana, o con uno de sus fragmentos inmunogénicos, derivados o variantes. Además, un animal se puede inmunizar con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica OPGbp de modo que la OPGbp se exprese y se asocie con la superficie de las células transfectadas. Alternativamente, agentes de unión selectiva que son anticuerpos se pueden obtener al cribar una biblioteca que comprende secuencias de dominios de unión a anticuerpos o antígenos para la unión a OPGbp. Esta biblioteca se prepara convenientemente en un bacteriófago como fusiones de proteínas o péptidos a una proteína de revestimiento del bacteriófago que se expresan sobre la superficie de partículas fágicas ensambladas y las secuencias de ADN codificantes contenidas dentro de las partículas fágicas (denominada "biblioteca de exposición en fagos"). En un ejemplo, una biblioteca expuesta en fagos contiene secuencias de ADN que codifican anticuerpos humanos, tales como cadenas ligeras y pesadas variables.

Agentes de unión selectiva que son anticuerpos o dominios que se unen a antígeno pueden ser glicoproteínas tetrámeras similares a anticuerpos naturales, o pueden ser anticuerpos monocatenarios; fragmentos Fv, Fab, Fab' o F(ab)', anticuerpos biespecíficos, heteroanticuerpos, u otros de sus fragmentos, variantes o derivados, que son capaces de unirse a OPGbp y neutralizan parcialmente o completamente la actividad de OPGbp. Anticuerpos o dominios que se unen a antígeno se pueden producir en líneas celulares de hibridoma (células productoras de anticuerpo tales como esplenocitos fusionados a células de mieloma de ratón, por ejemplo) o se pueden producir en líneas celulares heterólogas transfectadas con moléculas de ácido nucleico que codifican dicho anticuerpo o dominio que se une a antígeno.

Un anticuerpo o un dominio que se une a antígeno de la invención puede comprender:

(a) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Fab según se muestra en la Figura 9 (SEQ ID NO: 51) o la Figura 10 (SEQ ID NO: 53);

(b) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende sustituciones de aminoácidos conservativas de la secuencia de (a);

(c) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que es al menos 80% idéntica a la secuencia de (a); o

(d) un fragmento o derivado de (a), (b) o (c);

en donde el anticuerpo o dominio que se une a antígeno se une selectivamente a OPGbp.

En otra realización, un anticuerpo o dominio que se une a antígeno según se define en la reivindicación 1 reconoce un epítipo sobre OPGbp humana reconocido por un anticuerpo o dominio que se une a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Fab según se muestra en la Figura 9 (SEQ ID NO: 51) o la Figura 10 (SEQ ID NO: 53) y una secuencia de aminoácidos ligera de Fab según se muestra en la Figura 5 (SEQ ID NO: 43) o la Figura 6 (SEQ ID NO: 45). También se proporciona para esto un anticuerpo anti-OPGbp o dominio que se une a antígeno que reconoce un epítipo DE sobre OPGbp.

En otra realización, un anticuerpo o dominio que se une a antígeno según se define en la reivindicación 1 comprende una cadena V_L y V_H :

en donde cada cadena V_L comprende secuencias de aminoácidos de CDR denominadas CDR1(V_L), CDR2(V_L) y CDR3(V_L) separadas por secuencias de aminoácidos marco, seleccionándose CDR1(V_L) del grupo que consiste en:

RASQSIERYLN (SEQ ID NO: 01);

RASQSVGSYLA (SEQ ID NO: 02);

RASQSVSSSLA (SEQ ID NO: 03); y

SGDALPKQY (SEQ ID NO: 04);

seleccionándose CDR2(V_L) del grupo que consiste en:

GASSLQS (SEQ ID NO: 05);

DATNRAT (SEQ ID NO: 06);

GASSRAT (SEQ ID NO: 07); y

EDSERPS (SEQ ID NO: 08);

5 y seleccionándose CDR3(V_i) 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);

10 en donde CDR1(V_i), CDR2 (V_i) y CDR3 (V_i) se seleccionan independientemente entre sí; y

en donde cada cadena V_h comprende secuencias de aminoácidos de CDR denominadas CDR1(V_h), CDR2(V_h) y CDR3(V_h) separadas por secuencias de aminoácidos marco, seleccionándose CDR1(V_h) del grupo que consiste en:

NYAIH (SEQ ID NO: 13);

15 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);

VISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 17); y

20 GISWNSGRIGYADSVKG (SEQ ID NO: 18)

seleccionándose CDR3(V_h) del grupo que consiste en:

DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);

GGGGFDY (SEQ ID NO: 20); y

GGSTSARYSSGWYY (SEQ ID NO: 21)

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

En otra realización, un anticuerpo o dominio que se une a antígeno según se define en la reivindicación 1 comprende una cadena V_i y una V_h en donde:

30 la cadena V_i comprende CDR1 que tiene la secuencia RASQISRYLN (SEQ ID NO: 01), CDR2 que tiene la secuencia GASSLQS (SEQ ID NO: 05) y CDR3 que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09); y

la cadena V_h comprende 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 DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19);

en donde CDR1, CDR2 y CDR3 en cada cadena V_L y V_H están separadas por secuencias de aminoácidos marco.

Los anticuerpos y dominios que se unen a antígeno de la invención se derivan de secuencias de ácido nucleico germinales presentes en ADN genómico que codifican secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada. Los anticuerpos son codificados por secuencias de ácido nucleico que son los productos de la reordenación y la mutación somática de la secuencia germinal.

En una realización, un anticuerpo o dominio que se une a antígeno de la invención comprende una cadena V_L y una V_H en donde la cadena V_L comprende una variante somática o reordenada de un gen germinal V_{H1} tal como en la Figura 19 (SEQ ID NO: 66); y la cadena V_H comprende una variante somática o reordenada de un gen germinal V_{H1} tal como en la Figura 16 (SEQ ID NO: 59); y el anticuerpo se une selectivamente a un polipéptido de OPGbp.

En otra realización, la cadena V_L comprende una variante somática o reordenada de un gen germinal V_{K3} tal como en la Figura 20 (SEQ ID NO: 68); y la cadena V_H comprende una variante somática o reordenada de un gen germinal V_{H1} tal como en la Figura 16 (SEQ ID NO: 59).

En otra realización, la cadena V_L comprende una variante somática o reordenada de un gen germinal V_{K3} tal como en la Figura 21 (SEQ ID NO: 70); y la cadena V_H comprende una variante somática o reordenada de un gen germinal V_{H3} tal como en la Figura 17 (SEQ ID NO: 62).

En otra realización, la cadena V_L comprende una variante somática o reordenada de un gen germinal V_{I3} tal como en la Figura 22 (SEQ ID NO: 72); y la cadena V_H comprende una variante somática o reordenada de un gen germinal V_{H3} tal como en la Figura 18 (SEQ ID NO: 64).

Los agentes de unión selectiva de la invención (anticuerpo o dominio que se une a antígeno) inhiben parcialmente o completamente al menos una actividad de OPGbp, tal como la unión de OPGbp a ODAR, la formación o la activación de osteoclastos o la resorción ósea mediada por OPGbp y se usan para prevenir y/o tratar enfermedades óseas. En una realización, un antagonista de OPGbp, tal como un anticuerpo o dominios que se unen a antígeno, se administra a un animal que ha experimentado pérdida de masa ósea, o tiene riesgo de pérdida de masa ósea, a fin de prevenir y/o tratar la pérdida de masa ósea. Un antagonista de OPGbp se puede usar para prevenir y/o tratar osteoporosis, pérdida de masa ósea debida a metástasis de cáncer de huesos; pérdida de masa ósea debida a artritis reumatoide, hipercalcemia maligna y osteoporosis inducida por esteroides.

También se proporcionan composiciones que comprenden los anticuerpos o dominios que se unen a antígeno de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra un ELISA de patrones de Fab predominantes para la reactividad para OPGbp[143-317] humana. Se realizaron valoraciones usando un máximo de 50 μ l de solución de fagos por pocillo para dar un intervalo típico de 10^9 - 10^{11} fagos/pocillo en el ELISA. Se prepararon soluciones madre para ELISA según se describe en el Ejemplo 1. Los valores procedían de determinaciones puntuales individuales. Los patrones "AB" y "X" estaban superpuestos sobre la misma línea.

La Figura 2 muestra la inhibición de la unión de OPGbp a ODAR por Fabs "AT" y "Y". Los Fabs se purificaron según se describe en el Ejemplo 4 y se añadieron hasta concentraciones de pocillo finales según se muestra en la figura. Detalles del ensayo de unión de OPGbp/ODAR se indican en el Ejemplo 1. Los valores eran promedios de determinaciones por duplicado.

La Figura 3 muestra ensayos de médula ósea de Fabs "AT" "Y" y "P". Se mostraban los resultados de una preparación libre de endotoxinas (0,5 EU/ml o menos) de cada uno de los Fabs "AT", "Y" y "P". Los Fabs se purificaron según se describe en el Ejemplo 4 y se añadieron hasta diluciones de pocillos finales como las mostradas en la figura (las soluciones madre de Fab eran de 750 μ g/ml a 1 mg/ml). El formato de ensayo incluye una preincubación de 1 hora del Fab anti-hu-OPGbp con 10 ng/ml de concentración celular final de OPGbp en los pocillos [143-317] humana. Los valores eran promedios de determinaciones por triplicado.

La Figura 4 muestra ensayos en células Raw de Fabs "AT" "Y" y "P". Se mostraban los resultados de una preparación libre de endotoxinas (0,5 EU/ml o menos) de cada uno de los Fabs "AT", "Y" y "P". Los Fabs se purificaron según se describe en el Ejemplo 4. Los Fabs se preincubaron con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de una dilución 1/20 hasta la concentración celular final en los pocillos mostrada en la gráfica. La concentración celular final de OPGbp en los pocillos era 20 ng/ml. La concentración celular era 1×10^5 /ml. Los valores procedían de determinaciones por triplicado con barras de error que indican 2 desviaciones estándar (2 STD).

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera de Fab "AT".

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera de Fab "Y".

La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera de Fab "P".

La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera de Fab "S".

5 La Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada de Fab "AT".

La Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada de Fab "Y".

La Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada de Fab "P".

La Figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada de Fab "S".

10 La Figura 13 muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos de Fab mostradas en la Figuras 5-12. Las secuencias de aminoácidos predichas de Fabs de cadena pesada y ligera "AT", "Y", "P" y "S" se compararon con respecto a la identidad y la similitud. Las cadenas pesadas "AT" y "Y" difieren solamente en una posición de aminoácido. Según indicaba la biblioteca, los cuatro Fabs tienen regiones CH1 de la cadena pesada idénticas que comprenden 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 solamente difieren en de 1 a 2 aminoácidos en la mitad carboxílica de la cadena, incluido en los cálculos

20 La Figura 14 muestra una comparación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la cadena pesada y ligera predichas de Fabs "AT", "Y", "P" y "S". Para comparaciones de las cadenas pesadas, CDR1 incluye los residuos de aminoácido 32-36 inclusive para todos los Fabs; CDR2 incluye los residuos de aminoácido 51-67 inclusive para todos los Fabs; y CDR3 incluye los residuos de aminoácido 100-116 inclusive para los Fabs "AT" y "Y", 100-106 inclusive para el Fab "P" y 100-113 inclusive para el Fab "S". Para comparaciones de las cadenas ligeras, CDR1 incluye los residuos de aminoácido 29-39 inclusive para Fabs "AT" y "Y", 28-39 inclusive para Fab "P" y 27-35 inclusive para el Fab "S"; CDR2 incluye los residuos de aminoácido 55-61 inclusive para los Fabs "AT", "Y" y "P", y 53-59 inclusive para el Fab "S"; y CDR3 incluye residuos de aminoácido 94-98 inclusive para los Fabs "AT", "Y" y "P" y 92-102 inclusive para el Fab "S".

25 La Figura 15 muestra una comparación de clases de Fab. La comparación de clases de Fab se obtuvo a partir del análisis V-Base DNA PLOT. El símbolo (*) indica que la región de diversidad (D) coincidente más cercana, aunque estaba relacionada con secuencias germinales, no se podía determinar. El símbolo (**) indica que la secuencia de la región variable (V) germinal de la coincidencia más cercana se ha identificado pero no se ha nombrado formalmente hasta la fecha, siendo de la familia lambda más rara.

30 La Figura 16 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de Fab "AT" y "Y" predichas (residuos 2-127 inclusive en las Figuras 9 y 10, respectivamente) con una secuencia germinal procedente de la familia VH1. La secuencia germinal comprende la secuencia 1-03 de la región V, la secuencia 3-10 de la región D y la secuencia JH4 de la región J (SEQ. ID NO: 44). FR1, FR2 y FR3 indican las tres regiones marco, CDR1, CDR2 y CDR3 indican las tres regiones determinantes de la complementariedad, y H1, H2 y H3 indican las correspondientes secuencias de unión entre las regiones marco y las CDRs. Las diferencias entre "AT", "Y" y las secuencias V, D o J germinales están en negrita. La numeración de los residuos de aminoácido germinales en las Figuras 16-22 es como se describe en Kabat y cols. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 4ª ed. (1991).

40 La Figura 17 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de Fab "P" predichas (residuos 2-117 inclusive en la Figura 11) con una secuencia germinal procedente de la familia VH3. La secuencia comprende la secuencia 3-30 de la región V y la secuencia JH4 de la región J. La secuencia de la región D se desconoce.

45 La Figura 18 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de Fab "S" predichas (residuos 2-124 inclusive en la Figura 12) con una secuencia germinal procedente de la familia VH3. La secuencia germinal comprende la secuencia 3-09 de la región V, la secuencia 6-19 de la región D y la secuencia JH4 de la región J.

La Figura 19 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de Fab "AT" predichas (residuos 6-108 inclusive en la Figura 5) con una secuencia germinal procedente de la familia Vkappa1. La secuencia germinal comprende la secuencia 012 de la región V y la secuencia JK1 de la región J.

- 5 La Figura 20 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de Fab "Y" predichas (residuos 6-108 inclusive en la Figura 6) con una secuencia germinal procedente de la familia Vkappa3. La secuencia germinal comprende la secuencia L6 de la región V y la secuencia JK2 de la región J.

La Figura 21 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de Fab "P" predichas (residuos 5-108 inclusive en la Figura 7) con una secuencia germinal procedente de la familia Vkappa3. La secuencia germinal comprende la secuencia A27 de la región V y la secuencia JK4 de la región J.

- 10 La Figura 22 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de Fab "S" predichas (residuos 5-112 inclusive en la Figura 8) con una secuencia germinal procedente de la familia VL3. La secuencia germinal comprende la secuencia 3m de la región V y la secuencia JL2 de la región J.

- 15 La Figura 23 muestra ensayos en células RAW de aislados de "AT" 405, "AT" 406 y "AT" 407. ADNc que codifica Fab "AT" se fusionó a ADNc que codifica las regiones CH1, CH2 y CH3 de IgG1 humana según se describe en el Ejemplo 7. Se usaron diferentes secuencias líder para producir los aislados resultantes denominados "AT" 405, "AT" 406 y "AT" 407. "AT" 405-407 se preincubaron con OPGbp durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la dilución hasta la concentración celular final en los pocillos mostrada en la gráfica. La concentración celular final de OPGbp en los pocillos era 40 ng/ml. Los valores procedían de determinaciones por triplicado con barras de error que indican 2 desviaciones estándar (2 STD).

- 20 La Figura 24 muestra ensayos de médula ósea de "AT" 405 y "AT" 407. Se mostraban los resultados de una preparación libre de endotoxinas (0,5 EU/ml o menos) de "AT" 405 y "AT" 407. Las muestras se preincubaron con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La dilución celular final de los pocillos para "AT" 405 y "AT" 407 procedentes de la solución madre de muestra se indica en el eje x. La concentración celular final de OPGbp en los pocillos era 20 ng/ml.

- 25 La Figura 25 muestra un ensayo de médula ósea de "AT" 406. Se muestran los resultados de una preparación libre de endotoxinas (0,5 EU/ml o menos) de "AT" 406. Las muestras se preincubaron con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración celular final de la muestra en los pocillos se indica en el eje x. La concentración celular final de OPGbp en los pocillos era 20 ng/ml.

- 30 La Figura 26 muestra un ensayo de médula ósea de "S" 435 y "Y" 429. La construcción de "S" 435 y "Y" 429 se describe en el Ejemplo 7. Se muestran los resultados de una preparación libre de endotoxinas (0,5 EU/ml o menos) de cada uno de "S" 435 y "Y" 429. Las muestras se preincubaron con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración celular final de la muestra en los pocillos se indica en el eje x. La concentración celular final de OPGbp en los pocillos era 20 ng/ml.

- 35 La Figura 27 muestra un ensayo de médula ósea de "Y" 442 y "P" 444. La construcción de "Y" 442 y "P" 444 se describe en el Ejemplo 7. Se muestran los resultados de una preparación libre de endotoxinas (0,5 EU/ml o menos) de cada uno de "Y" 442 y "P" 444. Las muestras se preincubaron con OPGbp [143-317] humana durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición a las células. La concentración celular final de la muestra en los pocillos se indica en el eje x. La concentración celular final de OPGbp en los pocillos era 20 ng/ml.

La Figura 28 muestra la secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de FLAG-[153-316] OPGbp murino/DE.

- 40 La Figura 29 es un alineamiento de secuencias de aminoácidos de OPGbp[143-317] humana, OPGbp[158-316] murina y FLAG-OPGbp [158-316] murina/DE en la región del bucle DE. Están subrayados los residuos de aminoácido de OPGbp humana introducidos en OPGbp de ratón para generar la molécula de FLAG-OPGbp de ratón/DE.

- 45 La Figura 30 es un inmunoensayo enzimático que examina la unión y la reactividad del anticuerpo AT a placas revestidas bien con OPGbp[143-317] humana, bien con OPGbp[158-316] murina o bien con FLAG-OPGbp [158-316] murina/DE.

Descripción Detallada de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a OPGbp de modo que bloquee parcialmente o completamente la unión de OPGbp a su receptor cognado e inhiba parcialmente o completamente la formación de osteoclastos y/o la resorción ósea.

El término "agente de unión selectiva" se refiere a una molécula que se une preferentemente a OPGbp. Un agente de unión selectiva puede incluir una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato, un lípido o un compuesto de peso molecular pequeño. En una realización preferida, un agente de unión selectiva es un anticuerpo, tal como anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) para anticuerpos que se pueden marcar en forma soluble o unida, así como sus fragmentos, regiones o derivados, proporcionados mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a, escisión enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes. Los agentes de unión selectiva anti-OPGbp de la presente invención son capaces de unirse a porciones de OPGbp que inhiben la unión de OPGbp a receptores ODAR.

Los anticuerpos y los dominios que se unen a antígeno de la invención se unen selectivamente a OPGbp, esto es, se unen preferentemente a OPGbp con una afinidad de unión mayor que a otros antígenos. Los anticuerpos se pueden unir selectivamente a OPGbp humana, pero también se unen detectablemente a OPGbp no humana, tal como OPGbp murina. Alternativamente, los anticuerpos se pueden unir selectivamente a OPG no humana, pero también se unen detectablemente a OPG humana. Alternativamente, los anticuerpos se pueden unir exclusivamente a OPGbp humana, sin unión detectable a OPGbp no humana.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos en donde cada anticuerpo monoclonal típicamente reconocerá un solo epítipo sobre el antígeno. El término "monoclonal" no se limita ningún método particular para elaborar el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden elaborar mediante el método del hibridoma que se describe en Kohler y cols. *Nature* 256, 495 (1975) o se pueden aislar de bibliotecas de fagos usando las técnicas que se describen en la presente, por ejemplo.

El término "dominio que se une a antígeno" o "región que se une a antígeno" se refiere a la porción del agente de unión selectiva (tal como una molécula de anticuerpo) que contiene los residuos de aminoácido que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad para el antígeno. Preferiblemente, la región que se une a antígeno será de origen humano. En otras realizaciones, la región que se une a antígeno se puede derivar de otra especie animal, en particular roedores tales como conejo, rata o hámster.

El término "epítipo" se refiere a la porción de cualquier molécula capaz de ser reconocida por y unirse a un agente de unión selectiva (tal como un anticuerpo) en una o más de las regiones que se unen a antígeno del agente de unión. Los epítipos consisten habitualmente en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Por "epítipo inhibidor y/o neutralizador" se entiende un epítipo que, cuando se une a un agente de unión selectiva, da como resultado una pérdida de la 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 usa en referencia a un anticuerpo, se refiere a dos tipos distintos, llamados kappa (κ) o lambda (λ) basándose en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes.

El término "cadena pesada", cuando se usa en referencia a un anticuerpo, se refiere a cinco tipos distintos, llamados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, basándose en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. Estos tipos distintos de cadenas pesadas dan lugar a cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases de IgG, a saber IgG₁, IgG₂, IgG₃ y IgG₄.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere a una porción de las cadenas ligera y pesada, típicamente aproximadamente los 120 a 130 aminoácidos aminotermiales de la cadena pesada y aproximadamente los 100 a 110 aminoácidos de la cadena ligera, que difieren profundamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en las regiones denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) mientras que las regiones más altamente conservadas en el dominio variable se denominan regiones marco (FR). Las CDRs de las cadenas ligera y pesada son responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno.

El término "región constante" o "dominio constante" se refiere a una porción carboxiterminal de la cadena ligera y pesada que no está implicada directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero exhibe diversas funciones efectoras, tales como una interacción con el receptor de Fc.

El término "OPGbp" o "polipéptido de OPGbp" se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 4 de la publicación PCT WO98/46757 y polipéptidos relacionados. Polipéptidos relacionados incluyen variantes alélicas; variantes de empalme; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, eliminación e inserción; polipéptidos de fusión; y homólogos entre especies. También están abarcadas formas solubles de OPGbp, tales como los residuos 69-317 inclusive de OPGbp humana (según se numeran en el documento WO 98/46757), o uno de sus subgrupos que sea suficiente para generar una respuesta inmunológica. En una realización, OPGbp humana soluble incluye los residuos 140-317 inclusive, 143-317 inclusive, o sus fragmentos inmunogénicos. OPGbp puede ser un polipéptido maduro, según se define en la presente, y puede tener o no un residuo de metionina aminoterminal, dependiendo del método mediante el que se prepare.

El término "fragmento", cuando se usa con relación a OPGbp o a un agente de unión selectiva proteínico de OPGbp, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Este fragmento puede surgir, por ejemplo, de un truncamiento en el extremo amino, un truncamiento en el extremo carboxi y/o una eliminación interna de un residuo o residuos de la secuencia de aminoácidos. Los fragmentes pueden resultar del empalme de ARN alternativo o de la actividad de proteasas *in vivo*.

El término "variante", cuando se usa en relación con OPGbp o con un agente de unión selectiva proteínico de OPGbp, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una o más sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de la secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia natural o no modificada. Por ejemplo, una variante de OPGbp puede resultar de uno o más cambios en una secuencia de aminoácidos de OPGbp natural. Además, a modo de ejemplo, una variante de un agente de unión selectiva de OPGbp puede resultar de uno o más cambios en una secuencia de aminoácidos de un agente de unión selectiva natural o previamente no modificado. Las variantes pueden estar presentes en la naturaleza, tales como variantes alélicas o de empalme, o se pueden construir artificialmente. Las variantes de polipéptidos se pueden preparar a partir de las moléculas de ácidos nucleico correspondientes que codifican dichas variantes.

El término "derivado", cuando se usa en relación con OPGbp o con un agente de unión selectiva proteínico de OPGbp, se refiere a un péptido o polipéptido, o uno de sus variantes, fragmentos o derivados, que se ha modificado químicamente. Ejemplos incluyen la ligazón covalente de uno o más polímeros, tales como polímeros hidrosolubles, carbohidratos conectados en N o conectados en O, azúcares, fosfatos y/u otras de estas moléculas. Los derivados se modifican de un modo que es diferente de un péptido o polipéptidos presentes en la naturaleza o de partida, bien en el tipo o bien en la localización de las moléculas ligadas. Los derivados incluyen además la eliminación de uno o más grupos químicos que están presentes naturalmente en el péptido o polipéptido.

El término "fusión", cuando se usa en relación con OPGbp o con un agente de unión selectiva proteínico de OPGbp, se refiere a la conexión de un péptido o polipéptido, o uno de sus fragmentos, variantes y/o derivados, con un péptido o polipéptido heterólogo.

El término "biológicamente activo", cuando se usa en relación con OPGbp o con un agente de unión selectiva proteínico, se refiere a un péptido o un polipéptido que tiene al menos una actividad característica de OPGbp o un agente de unión selectiva. Un agente de unión selectiva de OPGbp puede tener una actividad agonista, antagonista o neutralizadora o bloqueadora con respecto a al menos una actividad biológica de OPGbp.

El término "presente en la naturaleza", cuando se usa con respecto a materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras y similares, se refiere a los que se encuentran en la naturaleza y no están manipulados por un ser humano.

El término "aislado", cuando se usa en relación con OPGbp o con un agente de unión selectiva proteínico de OPGbp, se refiere a un péptido o polipéptido que está libre de al menos un polipéptido contaminante que se encuentra en su ambiente natural, y preferiblemente sustancialmente libre de cualesquiera otros polipéptidos de mamífero contaminantes que interfieran con su uso terapéutico o diagnóstico.

El término "maduro", cuando se usa en relación con OPGbp o con un agente de unión selectiva proteínico de OPGbp, se refiere a un péptido o polipéptido que carece de una secuencia líder. El término también puede incluir otras modificaciones de un péptido o polipéptido tales como el procesamiento proteolítico del extremo amino (con o sin una secuencia líder) y/o el extremo carboxi, la escisión de un polipéptido más pequeño de un precursor más grande, la glicosilación conectada en N y/o conectada en O, y similares.

Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz", cuando se usan en relación con un agente de unión selectiva de OPGbp, se refiere a una cantidad de un agente de unión selectiva que es útil o necesaria para soportar un cambio observable en el nivel de una o más actividades biológicas de OPGbp. Dicho cambio puede ser bien un incremento o bien una disminución en el nivel de actividad de OPGbp.

El término "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a una sustitución de un residuo de aminoácido natural por un residuo no natural que tiene poco o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del residuo de aminoácido en esa posición. Por ejemplo, una sustitución conservativa resulta del cambio de un residuo apolar de un

polipéptido por otro residuo apolar. Por otra parte, cualquier residuo natural de un polipéptido también se puede sustituir por alanina, como se ha descrito previamente para la mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y cols. Science 244, 1081-1085 (1989). Reglas ejemplares para sustituciones de aminoácidos conservativas se indican en la Tabla I.

5

Tabla I
Sustituciones de aminoácidos conservativas

Residuos Originales	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
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

10 Las sustituciones de aminoácidos conservativas también abarcan residuos de aminoácido no presentes en la naturaleza que típicamente se incorporan mediante síntesis química de péptidos en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácido.

15 Las modificaciones conservativas en la secuencia de aminoácidos (y las correspondientes modificaciones en los nucleótidos codificantes) son capaces de producir polipéptidos de OPGbp (y sus agentes de unión selectiva proteínicos) que tienen características funcionales y químicas similares a las de OPGbp o agentes de unión selectiva presentes en la naturaleza. En contraste, se pueden efectuar modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de OPGbp (y sus agentes de unión selectiva proteínicos) al seleccionar sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto molecular en la zona de sustitución, por ejemplo, como una conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobia de la molécula en el sitio elegido o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos presentes en la naturaleza se pueden dividir en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

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

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

La "identidad o similitud" de uno o más moléculas de ácido nucleico y/o polipéptidos proporciona una medida de la relación de dos o más secuencias distintas. El término "identidad" se refiere a aminoácidos que son idénticos en las posiciones correspondientes en dos secuencias de aminoácidos distintas. El término "similitud" se refiere a aminoácidos que bien son idénticos o bien son sustituciones conservativas según se define anteriormente en posiciones correspondientes en dos secuencias de aminoácidos distintas.

El grado de identidad o similitud se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo, pero no limitados 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., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Secuencia Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y cols., SIAM J. Applied Math., 48, 1073 (1988).

Métodos preferidos para determinar la identidad y/o la similitud se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Métodos para determinar la identidad y la similitud se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Métodos de programas informáticos ejemplares para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, 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 X está disponible públicamente de the National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y cols. NCB NLM NIH Bethesda, MD). También se puede usar para determinar la identidad el bien conocido algoritmo de Smith Waterman.

Polipéptidos de OPGbp

Se usan polipéptidos de OPGbp, y sus fragmentos, variantes y derivados, como moléculas diana para cribar e identificar agentes de unión selectiva. Cuando se desee preparar anticuerpos como agentes de unión selectiva, los polipéptidos de OPGbp son preferiblemente inmunogénicos, esto es, provocan una respuesta inmunitaria cuando se administran a un animal. Alternativamente, cuando se preparan anticuerpos mediante técnicas *in vitro*, los polipéptidos de OPGbp usados como moléculas diana son capaces de unirse detectablemente a un anticuerpo o dominio que se une a antígeno.

Los polipéptidos de OPG se preparan por medios biológicos o químicos. Se conocen en la especialidad métodos biológicos tales como la expresión de secuencias de ADN que codifican OPGbp recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook y cols. anteriormente). También se pueden usar métodos de síntesis química tales como los indicados por Merrifield y cols., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 (1963), Houghten y cols., *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 82:5132 (1985) y Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) para preparar polipéptidos de OPGbp. Estos polipéptidos se pueden sintetizar con o sin una metionina en el extremo amino. Los polipéptidos de OPGbp sintetizados químicamente, o sus fragmentos o variantes, se pueden oxidar usando métodos indicados en estas referencias para formar puentes de disulfuro. Los polipéptidos de OPGbp de la invención preparados mediante síntesis química tendrán al menos una actividad biológica comparable a los polipéptidos de OPGbp correspondientes producidos recombinantemente o purificados a partir de fuentes naturales.

Los polipéptidos de OPGbp se pueden obtener mediante aislamiento de muestras biológicas tales como tejidos y/o fluidos fuente en los que se encuentran naturalmente los polipéptidos de OPGbp. Las fuentes para polipéptidos de OPGbp pueden ser de origen humano o no humano. El aislamiento de polipéptidos de OPGbp presentes en la naturaleza se puede efectuar usando métodos conocidos en la especialidad, tales como separación mediante electroforesis seguida por electroelución, diversos tipos de cromatografía (afinidad, inmuoafinidad, tamiz molecular y/o intercambio iónico) y/o cromatografía de líquidos de alta presión. La presencia del polipéptido de OPGbp durante la purificación se puede comprobar usando, por ejemplo, un anticuerpo preparado contra polipéptido de OPGbp producido recombinantemente o sus fragmentos peptídicos.

Los polipéptidos incluyen polipéptidos de OPGbp aislados y polipéptidos relacionados con los mismos incluyendo fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión y derivados según se definen anteriormente en la presente. Los fragmentos de OPGbp de la invención pueden resultar de truncamientos en el extremo amino (con o sin una secuencia líder), truncamientos en el extremo carboxi y/o eliminaciones internas al polipéptido. Opcionalmente, estos fragmentos de polipéptidos de OPGbp pueden comprender un residuo de metionina aminoterminal. Los polipéptidos serán inmunogénicos ya que serán capaces de provocar una respuesta de anticuerpos.

Las variantes de polipéptidos de OPGbp pueden incluir una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos de OPGbp naturales. Las sustituciones de

aminoácidos pueden ser conservativas, según se definen anteriormente, o no conservativas o cualquiera de sus combinaciones. Las variantes pueden tener adiciones de residuos de aminoácido bien en el extremo carboxi o bien en el extremo amino (donde el extremo amino puede comprender o no una secuencia líder).

- 5 Variantes de glicosilación de OPGbp incluyen variantes en las que el número y/o el tipo de sitios de glicosilación se ha alterado en comparación con el polipéptido de OPGbp natural. Las variantes de glicosilación de OPGbp pueden comprender un número mayor o menor de sitios de glicosilación conectados a N en comparación con OPGbp natural. También se ilustran variantes de glicosilación de OPGbp que comprenden una reorganización de cadenas de carbohidrato conectadas en N en las que se eliminan uno o más sitios de glicosilación conectados a N
10 (típicamente los que están presentes en la naturaleza) y se crean uno o más sitios conectados a N nuevos. Las variantes de cisteína de OPGbp comprenden un número mayor o alternativamente un número menor de residuos de cisteína en comparación con OPGbp natural. En una realización, uno o más residuos de cisteína se eliminan o se sustituyen por otro aminoácido (p. ej., serina). Las variantes de cisteína de OPGbp pueden mejorar la recuperación de OPGbp biológicamente activa al ayudar al repliegue de OPGbp en una conformación biológicamente activa
15 después del aislamiento a partir de un estado desnaturalizado.

- La preparación de variantes de polipéptidos de OPGbp está dentro del nivel de experiencia en la especialidad. En un enfoque, se pueden introducir una o más sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos en OPGbp natural en donde la variante de OPGbp retiene la estructura natural de OPGbp y/o al menos una de las actividades
20 biológicas. Un enfoque es comparar secuencias de polipéptidos de OPG de una variedad de especies diferentes a fin de identificar regiones de identidad y/o similitud relativamente bajas y altas. Se aprecia que es menos probable que las regiones de un polipéptido de OPGbp que tienen identidad y/o similitud relativamente bajas sean esenciales para la estructura y la actividad y por lo tanto pueden ser más tolerantes a alteraciones de aminoácidos, especialmente las que no son conservativas. También se aprecia que incluso en regiones relativamente
25 conservadas, se podrían introducir sustituciones de aminoácidos conservativas mientras que se retiene la actividad.

- En otro enfoque, se pueden usar relaciones de estructura-función para identificar residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. Por ejemplo, se puede comparar un residuo de aminoácido conservado entre OPGbp y otros miembros de la familia de factores de necrosis tumoral para los que estén
30 disponibles análisis de estructura-función y, basándose en esta comparación, predecir qué residuos de aminoácido en OPGbp son importantes para la actividad o la estructura. Un experto en la especialidad puede elegir sustituciones de aminoácidos químicamente similares para estos residuos de aminoácido de OPGbp importantes predichos.

- En otro enfoque más, se puede llevar a cabo un análisis de una estructura secundaria o terciaria de OPGbp (bien determinada por difracción de rayos X de cristales de OPGbp o bien por métodos de predicción de la estructura) para determinar la localización de residuos de aminoácido específicos en relación con estructuras reales o predichas dentro de un polipéptido de OPGbp. Usando esta información, se pueden introducir cambios de aminoácido de un modo que busque retener tanto como sea posible la estructura secundaria y/o terciaria de un polipéptido de OPGbp.
35

- En otro enfoque más, los efectos de alterar aminoácidos en posiciones específicas se pueden probar experimentalmente al introducir sustituciones de aminoácidos y probar los polipéptidos de OPGbp alterados con respecto a la actividad biológica usando ensayos descritos en la presente. Técnicas tales como la mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y cols., anteriormente) son particularmente adecuadas para este enfoque. Muchas secuencias alteradas se pueden probar convenientemente al introducir muchas sustituciones en diversas posiciones
40 de aminoácidos en OPGbp y cribar la población de polipéptidos alterados como parte de una biblioteca de exposición en fagos. Usando este enfoque, se pueden determinar fácilmente las regiones de un polipéptido de OPGbp que son esenciales para la actividad.
45

- Los métodos anteriores son útiles para generar variantes de OPGbp que retienen la estructura natural. Así, es probable que anticuerpos producidos contra cada una de las variantes reconozcan un determinante estructural, o epítipo, natural de OPGbp y también es probable que se unan a OPGbp natural. Sin embargo, en algunos casos, puede ser deseable producir variantes de OPGbp que no retengan la estructura de OPGbp natural o estén parcialmente o completamente sin rellenar. Los anticuerpos producidos contra estas proteínas reconocerán epítopos enterrados sobre OPGbp.
50

- La invención también ilustra polipéptidos de fusión de OPGbp que comprenden polipéptidos de OPGbp, y sus fragmentes, variantes y derivados, fusionados a un péptido o una proteína heterólogos. Péptidos y proteínas heterólogos incluyen, pero no se limitan a: un epítipo para permitir la detección y/o el aislamiento de un polipéptido de fusión de OPGbp; una proteína receptora transmembranaria o una de sus porciones, tal como un dominio extracelular, o un dominio transmembranario e intracelular; un ligando o una de sus porciones que se une a una proteína receptora transmembranaria; una enzima o una de sus porciones que es catalíticamente activa; una proteína o un péptido que promueve la oligomerización, tal como el dominio de cremallera de leucina; y una proteína o un péptido que incrementa la estabilidad, tal como una región constante de inmunoglobulina. Un polipéptido de OPGbp puede estar fusionado a sí mismo o a uno de sus fragmentos, variantes o derivados. Las fusiones se pueden
55 realizar bien en el extremo amino o bien en el extremo carboxi de un polipéptido de OPGbp, y pueden ser directas sin molécula conectora o adaptadora o pueden ser a través de una molécula conectora o adaptadora. Una molécula
60
65

conectora o adaptadora también se puede diseñar con un sitio de escisión para que una endonucleasa de restricción de ADN o para que una proteasa permita la separación de moléculas fusionadas.

Un polipéptido de OPGbp, un fragmento, una variante y/o un derivado se puede fusionar a una región Fc de IgG humana. En un ejemplo, una bisagra de IgG humana, una región CH2 y CH3 se pueden fusionar bien en el extremo N o bien en el extremo C de los polipéptidos de OPGbp usando métodos conocidos para el experto en la especialidad. En otro ejemplo, se puede fusionar una porción de una región de bisagra y las regiones CH2 y CH3. El polipéptido de fusión de OPGbp-Fc así producido se puede purificar mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A. Además, se ha encontrado que péptidos y proteínas fusionados a una región Fc exhiben una semivida *in vivo* sustancialmente mayor que el homólogo no fusionado. Además, una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc presente en la naturaleza, o puede estar alterada para mejorar ciertas cualidades, tales como cualidades terapéuticas, tiempo de circulación, agregación reducida, etc.

Los derivados de polipéptidos de OPGbp son composiciones de polipéptidos de OPGbp químicamente modificados en las que el polipéptido de OPGbp está conectado a un polímero. Típicamente, el polímero seleccionado es hidrosoluble de modo que la proteína a la que está ligado no precipite en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. Se incluye dentro del alcance de polímeros de polipéptido de OPGbp una mezcla de polímero. Para el uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

El polímero hidrosoluble o su mezcla puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), monometoxipolietilenglicol, dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular, de, por ejemplo aproximadamente 6 kD), celulosa, u otros polímeros basados en carbohidrato, poli-(N-vinilpirrolidona), polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxi etilenados (p. ej., glicerol) y poli(alcohol vinílico).

Un polímero hidrosoluble es polietilenglicol. Según se usa en la presente, se entiende que polietilenglicol abarca cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivar otras proteínas, tales como mono-alcoxi(C₁-C₁₀)- o ariloxi-polietilenglicol. También son abarcadas por la invención moléculas de reticulación de PEG bifuncionales que se pueden usar para preparar multímeros de OPGbp ligados covalentemente.

Se conocen en la especialidad métodos para preparar polipéptidos de OPGbp químicamente derivados. A modo de ejemplo, la derivación de polipéptidos de OPGbp con PEG se puede llevar a cabo usando procedimientos descritos en Francis y cols., Focus on Growth Factors, 3, 4-10 (1992); los documentos EP 0 154 316; EP 0 401 384 y la Patente de EE. UU. N° 4.179.337. En una realización preferida, un derivado de polipéptido de OPGbp tendrá un solo resto de PEG en el extremo amino. Véase la Patente de EE. UU. N° 5.234.784.

Los derivados de polipéptidos de OPGbp divulgados en la presente pueden exhibir una mejora o una reducción de al menos una actividad biológica de OPGbp en comparación con el polipéptido no modificado, o pueden exhibir un incremento o una disminución de la semivida o la estabilidad.

Agentes de unión selectiva de OPGbp

Se pueden usar polipéptidos de OPGbp, y sus fragmentos, variantes y derivados, para identificar agentes de unión selectiva de OPGbp. Según se define anteriormente, un agente de unión selectiva de OPGbp abarca agentes de unión tanto proteínicos como no proteínicos y, en una realización preferida de la invención, el agente de unión selectiva es proteínico. El agente de unión selectiva puede ser un anticuerpo o uno de sus fragmentos que se une a OPGbp, preferiblemente OPGbp humana. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos agonistas, que mejoran 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. Anticuerpos antagonistas de OPGbp también se puede referir a anticuerpos de OPGbp inhibidores o neutralizadores.

Según se describe en los ejemplos posteriores, se han identificado anticuerpos anti-OPGbp y dominios que se unen a antígeno que inhiben al menos una actividad de OPGbp. Realizaciones de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia de Fab de la cadena pesada según se muestra en cualquiera de las Figuras 9, 10, 11 o 12 y que comprenden además una secuencia de la cadena ligera kappa o lambda. Secuencias de Fab de la cadena ligera pueden ser como las mostradas en las Figuras 5, 6, 7 u 8. Por ejemplo, el anticuerpo "AT" tiene las secuencias de las cadenas ligera y pesada de las Figuras 5 y 9, respectivamente; el anticuerpo "Y" tiene las secuencias de las cadenas ligera y pesada de las Figuras 6 y 10, respectivamente; el anticuerpo "S" tiene las secuencias de las cadenas ligera y pesada de las Figuras 7 y 11, respectivamente; y el anticuerpo "P" tiene las secuencias de las cadenas ligera y pesada de las Figuras 8 y 12, respectivamente. Los anticuerpos de la invención comprenden además una región Fc humana procedente de cualquier isotipo, bien IgG, bien IgM, bien IgA, bien IgE o bien IgD. Preferiblemente, la región Fc procede de IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, humana.

La invención también proporciona anticuerpos o dominios que se unen a antígeno que comprenden fragmentos, variantes o derivados de las secuencias de Fab divulgadas en la presente. Los fragmentos incluyen dominios variables de secuencias de Fab de la cadena bien ligera o bien pesada que típicamente están enlazados a dominios constantes ligeros o pesados. Las variantes incluyen anticuerpos que comprenden secuencias de Fab de la cadena ligera que son al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idénticas o similares a las secuencias de Fab, o los correspondientes dominios variables, en una cualquiera de las Figuras 5-8, o anticuerpos que comprenden secuencias de Fab de la cadena pesada, o los correspondientes dominios variables, que son al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idénticas o similares a las secuencias de Fab en una cualquiera de las Figuras 9-12. Típicamente, los anticuerpos pueden estar asociados con regiones constantes de las cadenas pesada y ligera para formar anticuerpos de longitud completa.

Los anticuerpos y dominios que se unen a antígeno, y sus fragmentos, variantes y derivados, de la invención retendrán la capacidad para unirse selectivamente a polipéptido de OPGbp humano. En una 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 observaba que el anticuerpo "AT" se une a OPGbp con una KD de aproximadamente 0,33 a 0,43 nM.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, recombinantes, quiméricos, humanizados, totalmente humanos, monocatenarios y/o biespecíficos. Fragmentos de anticuerpo incluyen las porciones de un anticuerpo anti-OPGbp que se unen a un epítipo sobre un polipéptido de OPGbp. Ejemplos de estos fragmentos incluyen fragmentos Fab F(ab'), F(ab)'₂, Fv y sFv. Los anticuerpos se pueden generar mediante escisión enzimática de anticuerpos de longitud completa o mediante técnicas de ADN recombinante, tales como expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de anticuerpo.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno. Un antígeno es una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse con un anticuerpo que adicionalmente es capaz 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 entiende que la reacción específica mencionada anteriormente indica que el antígeno reaccionará, de un modo muy selectivo, con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser provocados por otros antígenos.

Los anticuerpos policlonales dirigidos hacia un polipéptido de OPGbp generalmente son producidos en animales (p. ej., conejos o ratones) mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de OPGbp y un adyuvante. Según la invención, puede ser útil conjugar un polipéptido de OPGbp, o uno de sus variantes, fragmentos o derivados, a una proteína portadora que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, tal como hemocianina de lapa californiana, suero, albúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja. Además, se usan agentes de agregación tales como alumbre para mejorar la respuesta inmunitaria. Después de la inmunización, los animales son sangrados y el suero se ensaya con respecto al título de anticuerpo anti-OPGbp.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) contienen una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, población que contiene sitios de unión al epítipo sustancialmente similares. Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase inmunoglobulínica incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualesquiera de sus subclases. Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede cultivar *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. La producción de títulos altos *in vivo* o *in situ* es un método de producción preferido.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia OPGbp se producen usando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos del hibridoma de Kohler y cols., Nature 256, 495-497 (1975), y el método del 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 y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Agentes de unión selectiva anti-OPGbp preferidos incluyen anticuerpos monoclonales que inhibirán parcialmente o completamente la unión de OPGbp humana a su receptor cognado, ODAR, o un anticuerpo que tenga sustancialmente las mismas características de unión específica, así como sus fragmentos y regiones. Métodos preferidos para determinar la especificidad y la afinidad de anticuerpos monoclonales mediante inhibición competitiva se pueden encontrar 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. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, Meth. Enzymol., 92:589-601 (1983).

También se proporcionan líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con polipéptidos de OPGbp.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas en las que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región

constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para incrementar los rendimientos en la producción, por ejemplo, cuando los anticuerpos monoclonales murinos tienen rendimientos superiores a partir de hibridomas pero una inmunogenicidad superior en seres humanos, de modo que se usan anticuerpos monoclonales quiméricos humanos/murinos.

Se conocen en la especialidad anticuerpos quiméricos y métodos para su producción. Cabilly y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3273-3277 (1984); Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 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. USA*, 84:3439-3443 (1987); y Harlow y Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales quiméricos de la invención se pueden usar como un agente terapéutico. En este anticuerpo quimérico, una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico u homólogo a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de estos anticuerpos, con la condición de que exhiban la actividad biológica deseada (véase la Patente de EE. UU. N° 4.816.567; Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 6851-6855 (1985).

Según se usa en la presente, 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. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H_2L_2) formado por dos dímeros de HL asociados a través de al menos un puente de disulfuro. Un anticuerpo quimérico polivalente se puede producir, por ejemplo, al emplear una región C_H que se agrega (p. ej., a partir de una cadena H de IgM, o cadena μ).

Anticuerpos, fragmentos y regiones murinos y quiméricos de la presente invención pueden comprender cadenas inmunoglobulínicas pesadas (H) y/o ligeras (L) individuales. Una cadena H quimérica comprende una región que se une a antígeno derivada de la cadena H de un anticuerpo no humano específico para OPGbp, que está conectado a al menos una porción de una región C de la cadena H (C_H) humana, tal como CH_1 o CH_2 .

Una cadena L quimérica según la presente invención comprende una región que se une a antígeno derivada de la cadena L de un anticuerpo no humano específico para OPGbp, conectada a al menos una porción de una región C de la cadena L (C_L) humana.

Los agentes de unión selectiva, tales como anticuerpos, fragmentos o derivados, que tienen cadenas H y cadenas L quiméricas de una especificidad de unión a la región variable igual o diferente, también se pueden preparar mediante una asociación apropiada de las cadenas de polipéptido individuales, según etapas del método conocidas, p. ej., según 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 enfoque, los hospedadores que expresan cadenas H quiméricas (o sus derivados) se cultivan separadamente de hospedadores que expresan cadenas L quiméricas (o sus derivados), y las cadenas inmunoglobulínicas se recuperan separadamente y a continuación se asocian. Alternativamente, los hospedadores se pueden cocultivar y se puede dejar que las cadenas se asocien espontáneamente en el medio de cultivo, seguido por recuperación de la inmunoglobulina, el fragmento o el derivado ensamblados.

Como un ejemplo, la región que se une a antígeno del agente de unión selectiva (tan como un anticuerpo quimérico) de la presente invención se deriva preferiblemente de un anticuerpo no humano específico para OPGbp humana. Fuentes preferidas para el ADN que codifica este anticuerpo no humano incluyen líneas celulares que producen anticuerpos, tales como líneas celulares híbridas conocidas comúnmente como hibridomas.

La invención también proporciona fragmentos, variantes y derivados, y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp, en donde los términos "fragmentos", "variantes", "derivados" y "fusiones" se definen en la presente. La invención abarca fragmentos, variantes, derivados y fusiones de anticuerpos anti-OPGbp que son funcionalmente similares al anticuerpo anti-OPGbp no modificado, esto es, retienen al menos una de las actividades del anticuerpo no modificado. Además de las modificaciones indicadas anteriormente, también se incluye la adición de secuencias genéticas que codifican proteínas citotóxicas tales como toxinas vegetales y bacterianas. Los fragmentos, las variantes, los derivados y las fusiones de anticuerpos anti-OPGbp se pueden producir a partir de cualquiera de los hospedadores de esta invención.

Fragmentos adecuados incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se depuran más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión a tejidos inespecífica que un anticuerpo intacto. Véase Wahl y cols., *J. Nucl. Med.*, 24:316-325 (1983). Estos fragmentos se producen a partir de anticuerpos intactos usando métodos bien conocidos en la especialidad, por ejemplo mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$). La identificación de estas regiones que se unen a antígeno y/o epítopos reconocidos por

anticuerpos monoclonales de la presente invención proporciona la información necesaria para generar anticuerpos monoclonales adicionales con características de unión y utilidad terapéutica o diagnóstica similares que son parejas a las realizaciones de esta solicitud.

La invención proporciona anticuerpos anti-OPGbp, o dominios que se unen a antígeno, que reconocen y se unen para inhibir y/o neutralizar epítomos sobre OPGbp. Como resultado de esta unión, un anticuerpo anti-OPGbp puede inhibir parcialmente o completamente la unión de OPGbp a su receptor, o puede inhibir parcialmente o completamente la formación de osteoclastos, la resorción ósea y/o la pérdida de hueso. Más particularmente, la invención proporciona anticuerpos anti-OPGbp que reconocen y se unen a un epítipo que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos de una región DE de OPGbp (un "epítipo DE"). Una región DE de OPGbp se extiende aproximadamente por las regiones de lámina beta D y E y la secuencia de bucle intercalada (un "bucle DE"). La región DE en OPGbp humana comprende desde aproximadamente el residuo de aminoácido 212 hasta aproximadamente el residuo de aminoácido 250 inclusive (véase la Figura 29).

Aunque se contempla que un anticuerpo anti-OPGbp, o un dominio que se une a antígeno, se puede unir a cualquier localización dentro de una región DE, una realización preferida es un anticuerpo anti-OPGbp que se une a al menos parte de un bucle DE. El bucle DE en OPGbp humana se extiende aproximadamente cinco aminoácidos y está situado en aproximadamente los residuos 230-234 inclusive. El bucle DE en OPGbp humana tiene la secuencia DLATE. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos y los puntos extremos del bucle DE de OPGbp humana son meramente ejemplares y se entiende que los bucles DE podrían tener secuencias y puntos extremos que varían con respecto a los de OPGbp humana. La invención abarca anticuerpos que se unen a estos bucles DE variables.

Según se muestra en el Ejemplo 10, la introducción de la secuencia DLATE en el bucle DE correspondiente de OPGbp murina daba como resultado la unión del anticuerpo "AT" mientras que el anticuerpo no tenía afinidad detectable para OPGbp murina con el bucle DE natural hasta una concentración de anticuerpo de aproximadamente 2 µg/ml. En otra realización, un anticuerpo anti-OPGbp se une a la secuencia de aminoácidos DLATE en OPGbp humana, o a una porción de dicha secuencia. En otra realización, un anticuerpo anti-OPGbp, o un dominio que se une a antígeno, se une a OPGbp murina que comprende las sustituciones de aminoácidos S229D, V230L, P231A y D233E, pero no se une a OPGbp murina que carece de dichas sustituciones bajo condiciones similares.

Aunque los anticuerpos de la invención se caracterizan en parte por las secuencias de aminoácidos en la OPGbp a la que se unen, se entiende y aprecia por un experto en la especialidad que un epítipo DE sobre 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 de OPGbp, los aminoácidos que comprenden el epítipo DE pueden estar distantes de la región DE, pero en una estructura tridimensional de OPGbp, los aminoácidos del epítipo DE probablemente estará próximos a la región DE. Así, se entiende que la unión de un anticuerpo anti-OPGbp a un epítipo DE puede implicar aminoácidos distintos a los de la región DE. No obstante, se ha mostrado que los residuos de aminoácido del bucle DE, especialmente algunos o todos los residuos en la secuencia DLATE, están implicados en la unión del anticuerpo a OPGbp y la inhibición de la actividad de OPGbp.

También se proporcionan variantes de agentes de unión selectiva. En una realización, las variantes de anticuerpos y dominios que se unen a antígeno comprenden cambios en las secuencias de aminoácidos de las cadena ligera y/o pesada que están presentes en la naturaleza o se introducen mediante manipulación *in vitro* de secuencias naturales usando técnicas de ADN recombinante. Variantes presentes en la naturaleza incluyen variantes "somáticas" que se generan *in vivo* en las secuencias nucleotídicas germinales correspondientes durante la generación de una respuesta de anticuerpo a un antígeno extraño. Variantes codificadas por mutaciones somáticas en secuencias de las cadenas ligera y pesada variables germinales que generan los Fabs ejemplares de la presente invención en secuencias se muestran en las Figuras 16 y 19 para Fab "AT", las Figuras 16 y 20 para Fab "Y", las Figuras 17 y 21 para Fab "P" y las Figuras 18 y 22 para Fab "S".

Las variantes de anticuerpos anti-OPGbp y dominios que se unen a antígeno también se preparan mediante técnicas de mutagénesis conocidas en la especialidad. En un ejemplo, se pueden introducir cambios de aminoácido aleatoriamente a través de una región codificante de anticuerpo y las variantes resultantes se pueden cribar con respecto a una actividad deseada, tal como afinidad de unión para OPGbp. Alternativamente, se pueden introducir cambios de aminoácido en regiones seleccionadas de un anticuerpo para OPGbp, tal como en las CDRs de la cadena ligera y/o pesada, y regiones marco, y los anticuerpos resultantes se pueden cribar con respecto a la unión a OPGbp o alguna otra actividad. Los cambios de aminoácido abarcan una o más sustituciones de aminoácido en una CDR, que varían de una diferencia de un solo aminoácido a la introducción de todas las permutaciones posibles de aminoácidos dentro de una CDR dada, tal como CDR3. En otro método, la contribución de cada residuo dentro de una CDR a la unión a OPGbp se puede determinar al sustituir por alanina al menos un residuo dentro de la CDR (Lewis y cols., Mol. Immunol. 32, 1065-1072 (1995)). A continuación, los residuos que no son óptimos para la unión a OPGbp se pueden cambiar a fin de determinar una secuencia más óptima. También están abarcadas variantes generadas mediante inserción de aminoácidos para incrementar el tamaño de una CDR, tal como CDR3. Por ejemplo, la mayoría de la secuencias de CDR3 de la cadena ligera tiene una longitud de nueve aminoácidos. Las secuencias de CDR3 de la cadena ligera en un anticuerpo que sean más cortas de nueve residuos se pueden

optimizar para la unión a OPGbp mediante la inserción de aminoácidos apropiados para incrementar la longitud de la CDR.

5 En una realización, las variantes de anticuerpo o dominio que se une a antígeno comprenden uno o más cambios de aminoácido en una o más de las CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada o ligera y opcionalmente una o más de las regiones marco de la cadena pesada o ligera FR1, FR2 o FR3. Los cambios de aminoácido comprenden sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de residuos de aminoácido. Variantes ejemplares incluyen una variante de la región variable de la cadena pesada de "AT" con uno o más cambios de aminoácido en las secuencias NYAIH (SEQ ID NO: 13); WINAGNGNTKFSQKFQG (SEQ ID NO: 16); o DSSNMVGRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 19), o una
10 variante de la región variable de la cadena ligera de "AT" con uno o más cambios de aminoácido en las secuencias RASQSIIRYLN (SEQ ID NO: 01); GASSLQS (SEQ ID NO: 05); o QHTRA (SEQ ID NO: 09). Las susodichas variantes de la región variable de la cadena pesada y ligera de "AT" pueden comprender además uno o más cambios de aminoácido en las regiones marco. En un ejemplo, se pueden introducir uno o más cambios de aminoácido para sustituir un residuo marco mutado somáticamente con el residuo germinal en esa posición. Cuando
15 los susodichos cambios de aminoácido son sustituciones, los cambios pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas.

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

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

XSSNMVGRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 80);

DXSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 81);

DSXNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 82);

30 DSSXMVGRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 83);

DSSNXVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 84);

DSSNMXRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 85);

DSSNMVXGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 86);

DSSNMVRXIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 87);

35 DSSNMVRGXIIAYYFDY (SEQ ID NO: 88);

DSSNMVRGIXIAYYFDY (SEQ ID NO: 89);

DSSNMVRGIIIXAYYFDY (SEQ ID NO: 90);

DSSNMVRGIIIYXYFDY (SEQ ID NO: 91);

DSSNMVRGIIIAXYFDY (SEQ ID NO: 92);

40 DSSNMVRGIIIAYXFDY (SEQ ID NO: 93);

DSSNMVRGIIIAYYXDY (SEQ ID NO: 94);

DSSNMVRGIIIAYYFXD (SEQ ID NO: 95); y

DSSNMVRGIIIAYYFDX (SEQ ID NO: 96);

en donde X puede ser cualquier residuo de aminoácido que sea diferente del residuo de aminoácido normalmente residente en esa posición, y en donde el anticuerpo resultante se une selectivamente a una OPGbp.

La invención también proporciona anticuerpos anti-OPGbp que comprenden cadenas pesadas ligeras y pesadas variables y que comprenden además una secuencia de CDR3 de la cadena ligera que se incrementa de cinco aminoácidos hasta nueve aminoácidos. Más particularmente, la secuencia de CDR3 de la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en:

QHTXXXXRA (SEQ ID NO: 97)

en donde la primera presencia de X de izquierda a derecha indica cualquier residuo de aminoácido distinto de arginina, la segunda, tercera y cuarta presencias de X indican cualquier residuo de aminoácido, pero preferiblemente alanina, y en donde el anticuerpo resultante se une selectivamente a una OPGbp. En otra realización de la invención, una secuencia de CDR3 de la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en:

QHTXAAARA (SEQ ID NO: 98)

en donde X es cualquier residuo de aminoácido distinto de arginina.

En otra realización, las variantes de anticuerpo de la invención comprenden cadenas V_L que tienen una secuencia de CDR1 como en SEQ ID NO:1 y una secuencia de CDR2 como en SEQ ID NO:5, y comprenden cadenas V_H que tienen cadenas V_H que tienen una secuencia de CDR1 como en SEQ ID NO:13 y una secuencia de CDR2 como en SEQ ID NO:16. En otra realización, las variantes de anticuerpo comprenden una cadena V_L procedente de un anticuerpo "AT" con las susodichas variantes de CDR3 de la cadena ligera y una cadena V_H procedente de un anticuerpo "AT" con las susodichas variantes de CDR3 de la cadena pesada. Las variantes también se pueden preparar mediante "barajado de cadenas" de cadenas bien ligeras o bien pesadas (Marks y cols. *Biotechnology* 10, 779-783 (1992)). Típicamente, una sola cadena ligera (o pesada) se combina con una biblioteca que tiene un repertorio de cadenas pesadas (o ligeras) y la población resultante se criba con respecto a una actividad deseada, tal como unión a OPGbp. Esta técnica permite el cribado de una muestra de cadenas pesadas (o ligeras) diferentes en combinación con una sola cadena ligera (o pesada) mayor de lo que es posible con bibliotecas que comprenden repertorios de cadenas tanto pesadas como ligeras.

Los agentes de unión selectiva de la invención pueden ser biespecíficos. Los agentes de unión selectiva biespecíficos de esta invención pueden ser de varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se asemejan a anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) simples pero tienen dos sitios de unión a antígeno (regiones variables) diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante técnicas químicas (véase, p. ej., Kranz y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:5807 (1981)), mediante técnicas de "polidoma" (véase la Pat. de EE. UU. N° 4.474.893 de Reading) o mediante técnicas de ADN recombinante.

Los agentes de unión selectiva de la invención también pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión del anticuerpo (Fab), conectados entre sí, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

La invención también se refiere a anticuerpos "humanizados". Métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la especialidad. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en un anticuerpo humano procedente de una fuente que no es humana. En general, los residuos no humanos estarán presentes en CDRs. La humanización se puede realizar siguiendo métodos conocidos en la especialidad (Jones y cols., *Nature* 321, 522-525 (1986); Riechmann y cols., *Nature*, 332, 323-327 (1988); Verhoeyen y cols., *Science* 239, 1534-1536 (1988)), al sustituir regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de roedor por las correspondientes regiones de un anticuerpo humano.

Los agentes de unión selectiva de la invención, incluyendo anticuerpos quiméricos, injertados en CDR y humanizados, se pueden producir mediante métodos recombinantes conocidos en la especialidad. Ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos se introducen en células hospedadoras y se expresan usando materiales y procedimientos descritos en la presente y conocidos en la especialidad. En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células hospedadoras de mamífero, tales como células CHO. Se pueden producir anticuerpos totalmente humanos mediante expresión de ADN recombinante transfectado en células hospedadoras o mediante expresión en células de hibridoma según se describe anteriormente.

Técnicas para crear versiones de ADN recombinante de las regiones que se unen a antígeno de las moléculas de anticuerpo que sortean la generación de anticuerpos monoclonales están abarcadas dentro de la práctica de esta invención. Para hacer esto, moléculas de ARN mensajero específicas para el anticuerpo se extraen de células del sistema inmunitario tomadas de un animal inmunizado, y se transcriben a ADN complementario (ANDc). A continuación, el ANDc se clona en un sistema de expresión bacteriano. Un ejemplo de esta técnica adecuado para la práctica de esta invención usa un sistema vectorial de bacteriófago lambda que tiene una secuencia líder que hace que la proteína de Fab expresada migre al espacio periplásmico (entre la membrana celular bacteriana y la pared

celular) o se secrete. Se pueden generar y cribar rápidamente grandes números de fragmentos Fab funcionales para los que se unen al antígeno. Estos agentes de unión selectiva de OPGbp (fragmentos Fab con especificidad para un polipéptido de OPGbp) están abarcados específicamente dentro del término "anticuerpo" según se define, analiza y reivindica en la presente.

También están dentro del alcance de la invención técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos al empalmar los genes procedentes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad para el antígeno apropiada junto con genes procedentes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada, tal como la capacidad para activar el complemento humano y mediar en ADCC. (Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851 (1984); Neuberger y cols., *Nature*, 312:604 (1984)). Un ejemplo es el cambio de una región Fc por la de un isotipo diferente. Agentes de unión selectiva tales como los anticuerpos producidos mediante esta técnica están dentro del alcance de la invención.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos anti-OPGbp son anticuerpos totalmente humanos. Así, están abarcados por la invención anticuerpos que se unen a polipéptidos de OPGbp y son codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas presentes en la naturaleza de una secuencia de ácido nucleico inmunoglobulínica germinal humana, y sus fragmentos, variantes sintéticas, derivados y fusiones. Estos anticuerpos se pueden producir mediante cualquier método conocido en la especialidad. Métodos ejemplares incluyen la inmunización con un antígeno de OPGbp (cualquier polipéptido de OPGbp capaz de provocar una respuesta inmunitaria, y opcionalmente conjugado a un portador) de animales (p. ej., ratones) transgénicos que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 2551-2555 (1993); Jakobovits y cols., *Nature*, 362, 255-258 (1993); Bruggermann y cols., *Year in Immunol.*, 7, 33 (1993).

Alternativamente, se pueden generar anticuerpos humanos a través del cribado *in vitro* de bibliotecas de anticuerpos de exposición en fagos. Véanse Hoogenboom y cols., *J. Mol. Biol.*, 227, 381 (1991); Marks y cols., *J. Mol. Biol.*, 222, 581 (1991). Se han descritos diversas bibliotecas de exposición en fagos que contienen anticuerpos y pueden ser preparadas fácilmente por un experto en la especialidad. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpo humano, tales como fragmentos Fab, Fv y scFv humanos, que se pueden cribar frente a una diana apropiada. El Ejemplo 1 describe el cribado de una biblioteca de fagos de Fab frente a OPGbp para identificar las moléculas que se unen selectivamente a OPGbp. Se apreciará que las bibliotecas de exposición en fagos pueden comprender péptidos o proteínas distintos de los anticuerpos que se pueden cribar para identificar agentes de unión selectiva de OPGbp.

Un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id se puede preparar al inmunizar a un animal de la misma especie y tipo genético (p. ej., cepa de ratón) como la fuente del anticuerpo monoclonal con el anticuerpo monoclonal para el que se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizador al producir un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la Pat. EE. UU. N° 4.699.880, que se incorpora totalmente en la presente mediante referencia. El anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo un llamado anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al anticuerpo monoclonal original que inducía el anti-Id. Así, al usar anticuerpos para los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

Producción de agentes de unión selectiva de OPGbp

Cuando el agente de unión selectiva de OPGbp que se va a preparar es un agente de unión selectiva proteínico, este anticuerpo o un dominio que se une a antígeno, están disponibles diversos métodos biológicos o químicos para producir dicho agente.

Los métodos biológicos son preferibles para producir suficientes cantidades de un agente de unión selectiva para uso terapéutico. Las técnicas de ADN recombinante estándar son particularmente útiles para la producción de anticuerpos y dominios que se unen a antígeno de la invención. Se describen posteriormente vectores de expresión, células hospedadoras y métodos para la recuperación del producto expresado ejemplares.

Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo para OPGbp o un dominio que se une a antígeno se inserta en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligación estándar. Típicamente, el vector se selecciona para que sea funcional en la célula hospedadora particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora de modo que se pueda producir la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-OPGbp se puede amplificar/expresar en células hospedadoras procarióticas, de levadura, de insecto (sistemas baculovirales) y/o eucarióticas. La selección de la célula hospedadora dependerá en parte de si un anticuerpo anti-OPGbp se va a modificar (p. ej., glicosilar y/o fosforilar) postransicionalmente. Si es así, son preferibles células hospedadoras de levadura, insecto o mamífero.

Para una revisión de los vectores de expresión, véase Meth. Enz. v. 185, D.V. Goeddel, ed. Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)

Típicamente, los vectores de expresión usados en cualesquiera células hospedadoras contendrán uno o más de los siguientes componentes: un promotor, una o más secuencias mejoradoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio de empalme donante y aceptor, una secuencia líder para secreción, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región policonectora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar y un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se analiza con más detalle posteriormente.

Los componentes del vector pueden ser secuencias homólogas (es decir, procedentes de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogas (es decir, procedentes de un especie distinta de la especie o la cepa de la célula hospedadora), híbridas (es decir, una combinación de diferentes secuencias procedentes de más de una fuente), sintéticas o naturales que normalmente funcionan para regular la expresión inmunoglobulínica. Como tal, una fuente de componentes del vector puede ser cualquier organismo procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, con la condición de que los componentes sean funcionales en, y puedan ser activados por, la maquinaria de la célula hospedadora.

Un origen de replicación se selecciona basándose en el tipo de célula hospedadora que se use para la expresión. Por ejemplo, el origen de replicación procedente del plásmido pBR322 (Producto N° 303-3s, New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas mientras que diversos orígenes procedentes de SV40, poliovirus, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o papillomavirus (tales como HPV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el componente del origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen de SV40 se usa a menudo debido a que contiene el promotor temprano).

Una secuencia de terminación de la transcripción está situada típicamente 3' del extremo de un polipéptido que codifica regiones y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procarióticas es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia de poliT. Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también se puede sintetizar fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como los descritos anteriormente.

Un elemento génico marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora desarrollada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, tetraciclina o kanamicina, para células hospedadoras procarióticas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos. Marcadores seleccionables preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. También se puede usar un gen de resistencia a neomicina para la selección en células hospedadoras procarióticas y eucarióticas.

Se pueden usar otros genes de selección para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el procedimiento en el que genes que tienen mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Los transformantes de células de mamífero se ponen a una baja presión de selección a la que solo los transformantes están singularmente adaptados para sobrevivir en virtud del marcador presente en el vector. La presión de selección se impone al cultivar las células transformadas bajo condiciones en las que la concentración de agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, conduciendo de ese modo a una amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica un anticuerpo anti-OPGbp. Como resultado, se sintetizan cantidades incrementadas de un anticuerpo a partir de ADN amplificado.

Habitualmente, un sitio de unión al ribosoma es necesario para el inicio de la traducción de ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). Típicamente, el elemento está situado 3' con respecto al promotor y 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que se va a expresar. La secuencia de Shine-Dalgarno es variada pero típicamente es una polipurina (es decir, que tiene un alto contenido de A-G). Se han identificado muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de las cuales se puede sintetizar fácilmente usando métodos indicados anteriormente y usados en un vector procariótico.

Se usa una secuencia líder, o de señal, para dirigir la secreción de un polipéptido. Una secuencia de señalización puede estar situada dentro de o directamente en el extremo 5' de una secuencia codificante del polipéptido. Se han identificado muchas secuencias de señalización y se pueden seleccionar basándose en la célula hospedadora usada para la expresión. En la presente invención, una secuencia de señalización puede ser homóloga (presente en la naturaleza) o heteróloga a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-OPGbp o un dominio que se une a antígeno. Una secuencia de señalización heteróloga debe ser una que sea reconocida y procesada, es

decir, escindida, por una peptidasa de señal, por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procarióticas que no reconocen y procesan una secuencia de señalización inmunoglobulínica natural, la secuencia de señalización se sustituye por una secuencia de señalización procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasas o enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, una secuencia de señalización inmunoglobulínica natural se puede sustituir por los líderes de invertasa, factor alfa o fosfatasa ácida de levadura. En la expresión de células de mamífero, la secuencia de señalización natural es satisfactoria, aunque pueden ser adecuadas otras secuencias de señalización de mamífero.

En la mayoría de los casos, la secreción de un anticuerpo anti-OPGbp o dominio que se une a antígeno de una célula hospedadora dará como resultado la retirada del péptido de señalización del anticuerpo. Así, el anticuerpo maduro carecerá de secuencia líder o de señalización.

En algunos casos, tal como cuando se desea la glicosilación en un sistema de expresión de células hospedadoras eucarióticas, se pueden manipular las diversas presecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de peptidasa de un péptido de señalización particular, o añadir prosequencias, lo que también puede afectar a la glicosilación. El producto proteínico final puede tener, en la posición -1 (con relación al primer aminoácido de la proteína madura), uno o más aminoácidos adicionales incidentes en la expresión, que pueden no haberse retirado totalmente. Por ejemplo, el producto proteínico final puede tener uno o dos aminoácidos encontrados en el sitio de escisión de peptidasa, ligados en el extremo N. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido de OPGbp deseado, si la enzima corta esta área dentro del polipéptido maduro.

Típicamente, los vectores de expresión de la presente invención contendrán un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está conectado operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-OPGbp o un dominio que se une a antígeno. Se puede usar un promotor bien natural o bien heterólogo dependiendo de la célula hospedadora usada para la expresión y el rendimiento de proteína deseado.

Promotores adecuados para el uso con hospedadores procarióticos incluyen los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp); y promotores híbridos tales como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias se han publicado, permitiendo de ese modo que un experto en la especialidad las ligue a la secuencia o las secuencias de ADN deseadas, usando conectores o adaptadores según sea necesario para suministrar cualesquiera sitios de restricción requeridos.

Promotores adecuados para el uso con hospedadores de levadura son muy conocidos en la especialidad. Los mejoradores de levadura se usan ventajosamente con promotores de levadura. Promotores adecuados para el uso con células hospedadoras de mamífero son muy conocidos e incluyen los obtenidos a partir de los genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), papilomavirus bovino, sarcomavirus aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente virus símico (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, p. ej., promotores del choque térmico y el promotor de actina.

Promotores adicionales que se pueden usar para expresar los agentes de unión selectiva de la invención incluyen, pero no se limitan a: la región promotora temprana de SV40 (Berneis y Chambon, *Nature*, 290:304-310, 1981); el promotor de CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del 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. U.S.A.*, 78; 144-1445, 1981); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster y cols., *Nature*, 296; 39-42, 1982); vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff, y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75; 3727-3731, 1978); o el promotor tac (DeBoer, y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80; 21-25, 1983). También son de interés las siguientes regiones de control de la transcripción animales, que exhiben especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del 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 del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, *Nature*, 315; 115-122, 1985); la región de control del 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 del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder y cols., *Cell*, 45; 485-495, 1986); la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert y cols., *Genes y Devel.*, 1; 268-276, 1987); la región de control del gen de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf y cols., *Mol. Cell. Biol.*, 5; 1639-1648, 1985; Hammer y cols., *Science*, 235; 53-58, 1987); la región de control del gen de 1-antitripsina alfa que es activa en el hígado (Kelsey y cols., *Genes y Devel.*, 1; 161-171, 1987); la región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogam y cols., *Nature*, 315; 338-340, 1985; Kollias y cols., *Cell*, 46; 89-94, 1986); la región de control del gen de proteína básica de mielina que es activa en oligodendrocitos del cerebro (Readhead y cols., *Cell*, 48; 703-712, 1987); la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, *Nature*, 314; 283-

286, 1985); y la región de control del gen de hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason y cols., Science, 234: 1372-1378, 1986).

Una secuencia mejoradora se puede insertar en el vector para incrementar la transcripción en células hospedadoras eucarióticas. Se conocen varias secuencias mejoradoras disponibles de genes de mamífero (p. ej., globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e y insulina). Sin embargo, típicamente, se usará un mejorador procedente de un virus. El mejorador de SV40, el mejorador del promotor temprano citomegaloviral, el mejorador de polio y mejoradores adenovirales son elementos mejoradores ejemplares para la activación de promotores eucarióticos. Aunque un mejorador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' a la región codificante del polipéptido, típicamente se sitúa en un sitio 5' del promotor.

Vectores para poner en práctica esta invención pueden ser los que sean compatibles con células hospedadoras bacterianas, de insecto y de mamífero. Estos 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-alpha (Publicación PCT N° WO90/14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY).

Posibles vectores adicionales incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vectorial debe ser compatible con la célula hospedadora seleccionada. Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos tales como derivados del plásmido Bluescript® (un fagémido basado en ColE1 de alto número de copias, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), plásmidos de clonación por PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados por Taq (p. ej., TOPO™ TA Cloning® Kit, derivados del plásmido PCR2.1®, Invitrogen, Carlsbad, CA), y vectores de mamífero, levadura o virus tales como un sistema de expresión baculoviral (derivados del plásmido pBacPAK, Clontech, Palo Alto, CA). Las moléculas recombinantes se pueden introducir en células hospedadoras a través de transformación, transfección, infección, electroporación u otras técnicas conocidas.

Las células hospedadoras pueden ser células hospedadoras procarióticas (tales como *E. coli*) o células hospedadoras eucarióticas (tales como una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de vertebrado). La célula hospedadora, cuando se cultiva bajo condiciones apropiadas, expresa un anticuerpo o dominio que se une a un antígeno de la invención que posteriormente se puede recoger del medio de cultivo (si la célula hospedadora lo secreta en el medio) o directamente de la célula hospedadora que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula hospedadora apropiada dependerá de diversos factores, tales como los niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptido que son deseables o necesarias para la actividad, tales como glicosilación o fosforilación, y la facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa.

Se conoce en la especialidad un número de células hospedadoras adecuadas y muchas están disponibles de the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Ejemplos incluyen células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (ATCC N° CCL61) células CHO DHFR- (Urlaub y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4216-4220 (1980)), células 293 o 293T de riñón embrionario humano (HEK) (ATCC N° CRL1573) o células 3T3 (ATCC N° CCL92). Se conocen en la especialidad la selección de células hospedadoras de mamífero adecuadas y métodos para la transformación, el cultivo, la amplificación, el cribado y la producción y purificación del producto. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares de mono COS-1 (ATCC N° CRL1650) y COS-7 (ATCC N° CRL1651) y la línea celular CV-1 (ATCC N° CCL70). Células hospedadoras de mamífero ejemplares adicionales incluyen líneas celulares de primate y líneas celulares de roedor, incluyendo líneas celulares transformadas. También son adecuadas células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, así como explantes primarios. Las posibles células pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección que actúa predominantemente. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones suizos, ratones Balb-c o NIH, líneas celulares de hámster BHK o HaK, que están disponibles de the American Type Culture Collection, Manassas, VA). Cada una de estas líneas celulares es conocida por y está disponible para los expertos en la especialidad de la expresión de proteínas.

De forma similar, son útiles como células hospedadoras adecuadas para la presente invención células bacterianas. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* (p. ej., HB101, (ATCC N° 33694) DH5α, DH10, y MC1061 (ATCC N° 53338)) son muy conocidas como células hospedadoras en el campo de la biotecnología. También se pueden emplear en este método diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., otras *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., y similares.

Muchas cepas de células de levadura conocidas por los expertos en la especialidad también están disponibles como células hospedadoras para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Células de levadura preferidas incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

Adicionalmente, cuando se desee, se pueden usar sistemas celulares de insecto en los métodos de la presente invención. Estos sistemas se describen, por ejemplo, en Kitts y cols. (Biotechniques, 14, 810-817 (1993)), Lucklow

(Curr. Opin. Biotechnol., 4, 564-572 (1993) y Lucklow y cols. (J. Virol., 67, 4566-4579 (1993)). Células de insecto preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La transformación o transfección de una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-OPGbp o dominio que se une a antígeno en una célula hospedadora seleccionada se puede efectuar mediante métodos muy conocidos, incluyendo métodos tales como cloruro cálcico, electroporación, microinyección, lipofección o el método de DEAE-dextrano. El método seleccionado será en parte función del tipo de célula hospedadora que se use. Estos métodos y otros métodos adecuados son muy conocidos por el experto, y se indican, por ejemplo, en Sambrook y cols., anteriormente.

También se pueden usar animales transgénicos para expresar agentes de unión selectiva glicosilados, tales como anticuerpos y un dominio que se une a antígeno. Por ejemplo, se puede usar un animal productor de leche transgénico (una vaca o una cabra, por ejemplo) y obtener agentes de unión glicosilados en la leche del animal. Alternativamente, se pueden usar plantas para producir agentes de unión selectiva glicosilados.

Células hospedadoras que comprenden (es decir, transformadas o transfectadas) un vector de expresión que codifica un agente de unión selectiva de OPGbp se pueden cultivar usando medios estándar muy conocidos para el experto. Habitualmente, los medios contienen todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Medios adecuados para cultivar células de *E. coli* son, por ejemplo, caldo de Luria (LB) y/o caldo Terrific (TB). Medios adecuados para cultivar células eucarióticas son RPMI 1640, MEM, DMEM, todos los cuales pueden estar complementados con suero y/o factores de crecimiento según se requiera para la línea celular particular que se cultive. Un medio adecuado para cultivos en insectos es medio de Grace complementado con levadurato, hidrolizado de lactoalbúmina y/o suero de ternero fetal según sea necesario.

Típicamente, un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de células transfectadas o transformadas se añade como un complemento al medio. El compuesto que se vaya a usar estará dictado por el elemento marcador seleccionable presente sobre el plásmido con el que se transformara la célula hospedadora. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable sea la resistencia a la kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina. Otros compuestos para crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina.

La cantidad de un anticuerpo anti-OPGbp o dominio que se une a antígeno producida por una célula hospedadora se puede evaluar usando métodos estándar conocidos en la especialidad. Estos métodos incluyen, sin limitación, análisis por transferencia Western, electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturizante, separación por HPLC, inmunoprecipitación y/o ensayos de actividad.

La purificación de un anticuerpo anti-OPG o dominio que se une a antígeno que se ha secretado en el medio celular se puede efectuar usando una variedad de técnicas incluyendo afinidad, inmutofinidad o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en tamices moleculares, electroforesis en gel o enfoque isoelectrico preparativos, cromatofenque y cromatografía de líquidos a alta presión. Por ejemplo, anticuerpos que comprenden una región Fc se pueden purificar convenientemente mediante cromatografía de afinidad con proteína A, que se une selectivamente a la región Fc. Formas modificadas de un anticuerpo o dominio que se une a antígeno se pueden preparar con etiquetas de afinidad, tales como hexahistidina u otro péptido pequeño tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o *myc* (Invitrogen) en su extremo bien carboxilo o bien amino y purificarse mediante una columna de afinidad en una etapa. Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad a níquel, así, se puede usar una columna de afinidad de níquel (tales como las columnas de níquel Qiagen®) para la purificación de agentes de unión selectiva etiquetados con polihistidina. (Véase, por ejemplo, Ausubel y cols., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)). En algunos casos, se puede requerir más de una etapa de purificación.

Los agentes de unión selectiva de la invención que se expresan en células hospedadoras procarióticas pueden estar presentes en forma soluble bien en el espacio periplásmico o bien en el citoplasma o en una forma insoluble como parte de cuerpos de inclusión intracelulares. Los agentes de unión selectiva se pueden extraer de la célula hospedadora usando cualquier técnica estándar conocida por el experto. Por ejemplo, las células hospedadoras se pueden someter a lisis para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante una cafetera, homogenización y/o ultrasonidos seguido por centrifugación.

Formas solubles de un anticuerpo anti-OPGbp o dominio que se une a antígeno bien presentes en el citoplasma o bien liberadas del espacio periplásmico se pueden purificar adicionalmente usando métodos conocidos en la especialidad, por ejemplo fragmentos Fab se liberan del espacio periplásmico bacteriano mediante técnicas de choque osmótico.

Si un anticuerpo o dominio que se une a antígeno ha formado cuerpos de inclusión, a menudo se pueden unir a las membranas celulares interna y/o externa y así se encontrarán principalmente en el material nodulizado después de la centrifugación. A continuación, el material nodulizado se puede tratar a extremos de pH o con un agente caotrópico tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea o derivados de urea en presencia de un

agente reductor tal como ditioneitol a pH alcalino o triscarboxietilfosfina a pH ácido para liberar, descomponer y solubilizar los cuerpos de inclusión. A continuación, el agente de unión selectiva soluble se puede analizar usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similares. Si se desea aislar un anticuerpo o dominio que se une a antígeno solubilizado, el aislamiento se puede efectuar usando métodos estándar tales como los indicados posteriormente y en Marston y cols. (Meth. Enz., 182:264-275 (1990)).

En algunos casos, un anticuerpo o dominio que se une a antígeno puede no ser biológicamente activo tras el aislamiento. Diversos métodos para "replegar" o convertir el polipéptido en su estructura terciaria y generar enlaces disulfuro se pueden usar para restaurar la actividad biológica. Estos métodos incluyen exponer el polipéptido solubilizado a un pH habitualmente por encima de 7 y en presencia de una concentración particular de un coótropo. La selección del coótropo es muy similar a las elecciones usadas para la solubilización de cuerpos de inclusión, pero habitualmente el coótropo se usa a una concentración inferior y no es necesariamente el mismo que los coótropos usados para la solubilización. En la mayoría de los casos, la solución de repliegue/oxidación también contendrá un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una relación específica para generar un potencial redox particular que permita que se produzca el barajado de disulfuros en la formación del puente o los puentes de cisteína de la proteína. Algunos de los pares redox comúnmente usados incluyen cisteína/cistamina, glutatona (GSH)/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditioneitol (DTT)/ditiatoDTT y 2-mercaptoetanol(bME)/ditió-b(ME). En muchos casos, se puede usar un codisolvente o puede ser necesario incrementar la eficacia del repliegue y los reactivos más comunes usados con este propósito incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, arginina y similares.

Los anticuerpos y dominios que se unen a antígeno de la invención también se pueden preparar mediante métodos de síntesis química (tales como síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en la especialidad tales como las indicadas por Merrifield y cols., (*J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 [1963]), Houghten y cols. (*Proc Natl Acad. Sci. USA*, 82:5132 [1985]), y Stewart y Young (*Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL [1984]). Estos polipéptidos se pueden sintetizar con o sin una metionina en el extremo amino. Los anticuerpos y dominios que se unen a antígeno sintetizados químicamente se pueden oxidar usando los métodos indicados en estas referencias para formar puentes de disulfuro. Los anticuerpos así preparados retendrán al menos una actividad biológica asociada con un anticuerpo anti-OPGbp o dominio que se une a antígeno natural o producido recombinantemente.

Ensayos para agentes de unión selectiva de OPGbp

Se proporcionan mediante la invención métodos de cribado para identificar agentes de unión selectiva que inhiben parcialmente o completamente al menos una actividad biológica de OPGbp. Inhibir la actividad biológica de OPGbp incluye, pero no se limita a, inhibir la unión de OPGbp a su receptor cognado, ODAR, inhibir la estimulación de la formación de osteoclastos *in vitro* o *in vivo* mediante OPGbp y/o inhibir la renovación ósea o la resorción ósea mediada por OPGbp. Agentes de unión selectiva de la invención incluyen anticuerpos anti-OPGbp, y sus fragmentos, variantes, derivados y fusiones, péptidos, compuestos peptidomiméticos o compuestos organomiméticos.

Métodos de cribado para identificar agentes de unión selectiva que pueden inhibir parcialmente o completamente una actividad biológica de OPGbp pueden incluir ensayos *in vitro* o *in vivo*. Ensayos *in vitro* incluyen los que detectan la unión de OPGbp a ODAR y se pueden usar para cribar agentes de unión selectiva de OPGbp con respecto a su capacidad para incrementar o disminuir la velocidad o el grado de unión de OPGbp a ODAR. En un tipo de ensayo, un polipéptido de OPGbp, preferiblemente una forma soluble de OPGbp tal como un dominio extracelular, se inmoviliza sobre un soporte sólido (p. ej., cuentas de agarosa o acrílicas) y a continuación se añade un polipéptido de ODAR bien en presencia o bien en ausencia de un agente de unión selectiva de OPGbp. Se mide el grado de unión de OPGbp y ODAR con o sin un agente de unión selectiva presente. La unión se puede detectar, por ejemplo, mediante marcaje radiactivo, marcaje fluorescente o reacción enzimática. Alternativamente, la reacción de unión se puede llevar a cabo usando un sistema detector de resonancia plasmónica superficial tal como el sistema de ensayo BIAcore (Pharmacia, Piscataway, NJ). Las reacciones de unión se pueden llevar a cabo según el protocolo del fabricante.

Ensayos *in vitro* tales como los descritos anteriormente se pueden usar ventajosamente para cribar rápidamente grandes números de agentes de unión selectiva con respecto a los efectos sobre la unión de OPGbp a ODAR. Los ensayos se pueden automatizar para cribar compuestos generados en bibliotecas de exhibición en fagos, de péptidos sintéticos y de síntesis química.

Los agentes de unión selectiva que incrementan o disminuyen la unión de OPGbp a ODAR también se pueden cribar en cultivo celular usando células y líneas celulares que expresan cualquier polipéptido. Las células y las líneas celulares se pueden obtener de cualquier mamífero, pero preferiblemente procederán de fuentes humanas o de otros primates, caninas o de roedor. Como un ejemplo, la unión de OPGbp a células que expresan ODAR sobre la superficie se evalúa en presencia o ausencia de agentes de unión selectiva y el grado de unión se puede determinar, por ejemplo, mediante citometría de flujo usando un anticuerpo biotinilado para OPGbp.

Los ensayos *in vitro* también se pueden usar para identificar agentes de unión selectiva que inhiben la actividad de OPGbp. Ejemplos de ensayos incluyen la estimulación del crecimiento y la proliferación celulares que dependen de OPGbp y la formación de osteoclastos mediada por OPGbp a partir de células de la médula ósea, la última de las cuales se describe en el Ejemplo 1 de la presente solicitud.

También están disponibles ensayos *in vivo* para determinar si un agente de unión selectiva es capaz de disminuir o inhibir la renovación ósea y/o la resorción ósea. La resorción ósea se puede incrementar en mamíferos mediante una variedad de métodos, incluyendo ovariectomía y administración de agentes prorrresorptivos tales como OPGbp o IL-1. Véanse los documentos WO 97/23614 y WO 98/46751. Los efectos de los inhibidores de OPG sobre la resorción ósea en pacientes humanos se pueden medir mediante una variedad de métodos conocidos tales como absorciometría monofotónica (SPA), absorciometría bifotónica (DPA), absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA), tomografía digital cuantitativa (QCT) y ultrasonografía (Véase 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). La renovación y la resorción óseas también se pueden determinar al medir cambios en ciertos marcadores bioquímicos, tales como osteocalcina sérica, fosfatasa alcalina sérica, péptidos de extensión de procolágeno I séricos, telopéptido C-terminal o N-terminal urinario o sérico de colágeno, calcio urinario, hidroxiprolina y piridinolina y desoxipiridinolina urinarias. Se identifica generalmente que una disminución en los niveles de los susodichos marcadores bioquímicos indica que la resorción ósea se disminuye y se está reduciendo la pérdida de masa ósea. Alternativamente, los efectos sobre la resorción ósea también se pueden determinar al medir un cambio en la resistencia mecánica del hueso, en particular un incremento en la resistencia a la torsión (flexión) del hueso.

Para aplicaciones diagnósticas, en ciertas realizaciones, los agentes de unión selectiva de OPGbp, tales como anticuerpos y sus dominios que se unen a antígeno, se marcarán típicamente con un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que sea capaz de producir, bien directamente o bien indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Bayer y cols., Meth. Enz., 184: 138-163 (1990).

Los agentes de unión selectiva de la invención se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich (ELISAs) directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, Monoclonal antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, 1987)) para la detección y la 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.

Los agentes de unión selectiva de la invención también son útiles para la obtención de imágenes *in vivo*, en donde, por ejemplo, un agente de unión selectiva marcado con un resto detectable se administra a un animal, preferiblemente a la corriente sanguínea, y se ensaya la presencia y la localización del anticuerpo marcado en el hospedador. El agente se puede marcar con cualquier resto que sea detectable en un animal, ya sea mediante resonancia magnética nuclear, radiología u otro medio de detección conocido en la especialidad.

La invención también se refiere a un estuche que comprende un agente de unión selectiva de OPGbp, tal como un anticuerpo o dominio que se une a antígeno, y otros reactivos útiles para detectar niveles de OPGbp en muestras biológicas. Estos reactivos pueden incluir una actividad secundaria, un marcador detectable, suero de bloqueo, muestras de control positivas y negativas y reactivos de detección.

Usos terapéuticos de agentes de unión selectiva de OPGbp

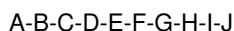
Anticuerpos monoclonales y dominios que se unen a antígeno según la realización 1 se pueden usar como agentes terapéuticos. Los agentes de unión selectiva terapéuticos pueden ser agonistas o antagonistas de OPGbp y, en una realización, son anticuerpos antagonistas anti-OPGbp que inhiben al menos una de las actividades biológicas de un polipéptido de OPGbp *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, un antagonista de OPGbp inhibirá la unión de OPGbp a ODAR en al menos aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces o más de 1000 veces. Alternativamente, un antagonista de OPGbp inhibirá la formación de osteoclastos *in vitro* según se indica por una IC50 (una concentración que da una inhibición de 50%) medible en un ensayo de médula ósea tal como el que se describe en el Ejemplo 1. Alternativamente, un antagonista de OPGbp disminuirá marcadores de la renovación ósea en al menos 20%, o al menos 50% en comparación con los niveles de referencia. Agentes (tales como anticuerpos) de unión selectiva de OPGbp antagonistas se identifican mediante ensayos de cribado descritos en la presente.

Antagonistas de OPGbp, tales como anticuerpos y dominios que se unen a antígeno antagonistas anti-OPGbp, se pueden usar para prevenir o tratar enfermedades caracterizadas por pérdida de masa ósea o el cambio de hueso estructuralmente normal por hueso estructuralmente anormal. Los antagonistas de OPGbp se pueden administrar a un animal que tiene pérdida de masa ósea o propenso a tener pérdida de masa ósea resultante de cualquiera de los siguientes trastornos: osteoporosis, tal como 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 debida a la inmovilización de las extremidades; osteomielitis, o una lesión infecciosa del hueso, que conduce a pérdida de masa ósea; hipercalcemia resultante de tumores sólidos (mama, pulmón y riñón) y enfermedades malignas 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 la administración de esteroides, y asociada con trastornos del intestino delgado y grueso y con enfermedades hepáticas y renales crónicas; osteonecrosis, o muerte de células óseas, asociada con lesión traumática o necrosis no traumática asociada con enfermedad de Gaucher, anemia drepanocítica, lupus eritematoso sistémico y otras afecciones; pérdida de masa ósea debida a artritis reumatoide; pérdida de masa ósea periodontal; osteoartritis; aflojamiento protésico; y metástasis osteolítica. Los antagonistas de OPGbp también se pueden usar para prevenir o tratar ciertos trastornos óseos que se caracterizan por el cambio de hueso estructuralmente sano por hueso estructuralmente incompetente desorganizado, tal como enfermedad de Paget del hueso (osteitis deformante) en adultos y jóvenes; hiperparatiroidismo, en trastornos óseos congénitos tales como displasia fibrosa, y en metástasis óseas osteoscleróticas.

Los antagonistas de OPGbp se usan ventajosamente para tratar la pérdida de masa ósea resultante de la destrucción osteolítica de hueso provocada por tumores malignos o metastásicos. Los polipéptidos de OPG de la invención se pueden usar para tratar la pérdida de masa ósea asociada con cánceres de mama, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esofágico, rectal, de vejiga urinaria, de cuello uterino, ovárico y de hígado, así como cáncer del tracto gastrointestinal. También se incluye la pérdida de masa ósea asociada con ciertas enfermedades malignas hematológicas tales como mieloma múltiple y linfomas tales como enfermedad de Hodgkin.

Los antagonistas de OPGbp de la invención, incluyendo anticuerpos y dominios que se unen a antígeno antagonistas, se administran solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, en particular, en combinación con otros agentes terapéuticos para el cáncer. Estos agentes incluyen generalmente radioterapia o quimioterapia. La quimioterapia puede incluir el tratamiento con uno o más de los siguientes: antraciclinas, taxol, tamoxifeno, doxorubicina, 5-fluorouracilo, y otros fármacos conocidos por los especialistas. En una realización, el agente terapéutico para el cáncer es un antagonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), preferiblemente un antagonista peptídico. Más preferiblemente, un antagonista de LHRH es un decapeptido que comprende la siguiente estructura:



en la que

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

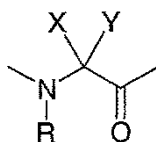
B es His o 4-Cl-D-Phe;

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



en 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 de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 En otra 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.

10 Se usan en la presente abreviaturas y convenciones estándar y los siguientes residuos y restos no estándar se abrevian como sigue:

Nal 3-(2-naftil)alaninilo

4-Cl-Phe (4'-clorofenil)alaninilo

15

Pal 3-(3'-piridil)alaninilo

Pal(N-O) 3-(3'-piridini-N-óxido)alaninilo

20

iPr-Lys N-épsilon-2-propil-lisinilo

Qal 3-(2'-quinolinil)alaninilo

25 Formas alternativas de decapeptidos antagonistas de LHRH también son abarcadas por la invención. Estos decapeptidos se describen en la Patente de EE. UU. N° 5.843.901 incorporada en la presente mediante referencia.

También se incluyen combinaciones de antagonistas de OPGbp con anticuerpos que se unen a células tumorales e inducen un efecto citotóxico y/o citostático sobre el crecimiento tumoral. Ejemplos de estos anticuerpos incluyen los que se unen a proteínas de la superficie celular Her2, CDC20, CDC33, glicoproteína mucinosa y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presentes sobre células tumorales e inducen un efecto citostático y/o citotóxico sobre células tumores que exhiben estas proteínas. Ejemplos de estos anticuerpos incluyen HERCEPTIN para el tratamiento del cáncer de mama y RITUXAN para el tratamiento de linfoma no hodgkiniano. También se incluyen como agentes terapéuticos para el cáncer polipéptidos que inducen selectivamente la apoptosis en células tumorales, tales como el polipéptido relacionado con TNF TRAIL. Los antagonistas de OPGbp se pueden administrar antes de, simultáneamente a o posteriormente al tratamiento con un agente terapéutico para el cáncer. Los antagonistas de OPGbp se pueden administrar profilácticamente para prevenir o mitigar el inicio de la pérdida de masa ósea por cáncer metastásico o se pueden aportar para el tratamiento de una afección existente de pérdida de masa ósea debida a metástasis.

40

Los antagonistas de OPGbp de la invención se pueden usar para prevenir y/o tratar el crecimiento de células tumorales en el hueso. Un cáncer que se metastasiza al hueso se puede extender fácilmente a medida que las células tumorales estimulan los osteoclastos para resorber la matriz ósea interna. El tratamiento con un antagonista de OPGbp mantendrá la densidad ósea al inhibir la resorción y disminuir la probabilidad de células tumorales que se extienden a través del esqueleto. Cualquier cáncer que se metastasice al hueso se puede prevenir y/o tratar con un antagonista de OPGbp.

45

En una realización, el mieloma múltiple se puede prevenir y/o tratar con un antagonista de OPGbp, tal como un anticuerpo. El mieloma múltiple se localiza en el hueso y afecta a pacientes que típicamente exhiben una pérdida de masa ósea debido a un incremento de la activación de osteoclastos en regiones localizadas. Las células de mieloma producen OPGbp bien directamente o bien indirectamente, lo que a su vez activa los osteoclastos dando como resultado una lisis ósea local que rodea a las células de mieloma embebidas en espacios de la médula ósea. Los osteoclastos normales adyacentes a la célula de mieloma producen a su vez IL-6, conduciendo al crecimiento y la proliferación de células de mieloma. Las células de mieloma se expanden de modo clonal y ocupan espacios óseos que están siendo creados por resorción ósea inapropiada. El tratamiento de un animal con un antagonista de OPGbp bloquea la activación de osteoclastos lo que a su vez conduce a una disminución en la producción de IL-6 por osteoclastos, y una supresión de todo el crecimiento y/o la proliferación del mieloma.

55

Los antagonistas de OPGbp se pueden usar solos para el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente que dan como resultado una pérdida de masa ósea o en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente (anabolizante) promotor del crecimiento óseo o un agente contra la resorción ósea incluyendo factores morfogénicos óseos denominados BMP-1 a BMP-12, factor de crecimiento transformante β y miembros de la familia de TGF- β , factores de crecimiento de fibroblastos FGF-1 a FGF-10, inhibidores de interleucina-1, inhibidores de

60

TNF α , hormona paratiroidea, prostaglandinas de la serie E, bisfosfonatos y minerales mejoradores del hueso tales como fluoruro y calcio. Agentes anabolizantes incluyen hormona paratiroidea y factor de crecimiento insulinoide (IGF), en donde el último agente preferiblemente está complejado con una proteína que se une a IGF. Realizaciones preferidas también incluyen la combinación de un antagonista de OPGbp con un antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1) o un antagonista de OPGbp con un receptor de TNF soluble, tal como receptor de TNF soluble 1 o receptor de TNF soluble 2. Un antagonista del receptor de IL-1 ejemplar se describe en el documento WO89/11540 y un receptor de TNF 1 soluble ejemplar se describe en el documento WO98/01555.

Una disminución en la velocidad de resorción ósea puede conducir a osteopetrosis, una afección marcada por una densidad ósea excesiva. Los agonistas de OPGbp pueden incrementar la formación de osteoclastos y la resorción ósea y se pueden administrar a un animal que tiene o es sensible a una disminución de la resorción ósea y un incremento anormal en la masa ósea.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de agentes de unión selectiva de OPGbp están dentro del alcance de la presente invención. Estas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un agente de unión selectiva de OPGbp, es decir un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, variantes, derivados o fusiones, mezclado con un agente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos anti-OPGbp antagonistas que inhiben parcialmente o completamente al menos una actividad biológica de OPGbp mezclados con un agente farmacéuticamente aceptable. Típicamente, los anticuerpos estarán suficientemente purificados para la administración a un animal.

Agentes farmacéuticamente aceptables para el uso en las composiciones de la invención incluyen portadores, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, agentes colorantes, saborizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de aumento de volumen, tampones, vehículos de aporte, agentes de tonicidad, codisolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes tamponadores, antimicrobianos y tensioactivos, que son muy conocidos en la especialidad.

Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son portadores apropiados ejemplares. También se incluyen en las composiciones antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes sacarinos tales como manitol o sorbitol; iones conjugados formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos iniónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol. Además, a modo de ejemplo, agentes mejoradores de la tonicidad adecuados incluyen haluros de metales alcalinos (preferiblemente cloruro sódico o potásico), manitol, sorbitol y similares. Conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y similares. El peróxido de hidrógeno también se puede usar como conservante. Codisolventes adecuados son, por ejemplo, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol. Agentes complejantes adecuados son, por ejemplo, cafeína, polivinilpirrolidona, betaciclodextrina o hidroxipropilbetaciclodextrina. Tensioactivos o agentes humectantes adecuados incluyen ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales tales como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonato o Tris-HCl. Un tampón de acetato puede tener un pH alrededor de 4,0-5,5 y un tampón de Tris puede tener un pH de alrededor de 7,0-8,5. Agentes farmacéuticos adicionales se indican en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990.

Las composiciones pueden estar en forma líquida o en una forma liofilizada o criosecada. Las formas liofilizadas pueden incluir excipientes tales como sacarosa.

Las composiciones de la invención son adecuadas para la administración parenteral. En realizaciones preferidas, las composiciones son adecuadas para inyección o infusión en un animal mediante cualquier vía adecuada para el experto, tales como las vías subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional. Una formulación parenteral será típicamente una solución acuosa isotónica estéril libre de pirógenos, que contiene opcionalmente conservantes farmacéuticamente aceptables.

La formulación farmacéutica óptima puede ser determinada fácilmente por un experto en la especialidad dependiendo de la vía de administración, el formato de aporte y la dosificación deseadas pretendidos.

Otras formulaciones también son contempladas por la invención. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc. o la introducción de un agente de unión selectiva de OPGbp (tal como un anticuerpo) en liposomas. También se puede usar ácido hialurónico, y este puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Las

composiciones farmacéuticas también incluyen la formulación de agentes de unión selectiva de OPGbp (tales como anticuerpos) con un agente, tales como microesferas inyectables, partículas o cuentas bioerosionables, o liposomas, que proporciona la liberación controlada o sostenida de un agente de unión selectiva que a continuación se puede aportar como una inyección de reserva. Otros medios adecuados para el aporte incluyen dispositivos de aporte implantables.

Una composición farmacéutica que comprende un agente de unión selectiva de OPGbp (tal como un anticuerpo) se puede formular como un polvo seco para inhalación. Estas soluciones para inhalación también se pueden formular en un propelente licuado para el aporte de aerosol. En otra formulación más, las soluciones se pueden nebulizar.

También se contempla que ciertas formulaciones que contienen agentes de unión selectiva de OPGbp se puedan administrar oralmente. Las formulaciones administradas de este modo se pueden formular con o sin los portadores usados habitualmente en la combinación de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula se puede diseñar para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que la biodisponibilidad se maximiza y la degradación presistémica se minimiza. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente de unión selectiva. También se pueden emplear diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegradores de comprimidos y aglutinantes.

Otra preparación puede implicar una cantidad eficaz de un agente de unión selectiva de OPGbp en una mezcla con excipientes atóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Al disolver los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, se pueden preparar soluciones en forma de dosificación unitaria. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato o bicarbonato sódico, lactosa o fosfato cálcico; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato magnésico, ácido esteárico o talco.

Formulaciones adicionales serán evidentes para los expertos en la especialidad, incluyendo formulaciones que implican agentes de unión selectiva de OPGbp en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos. Técnicas para formular una variedad de otros medios de aporte sostenido o controlado, tales como portadores liposómicos, micropartículas bioerosionables o cuentas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidas por los expertos en la especialidad. Véase, por ejemplo, la descripción de Supersaxo y cols. de micropartículas poliméricas porosas de liberación controlada para el aporte de composiciones farmacéuticas (Véase el documento WO 93/15722 (PCT/US93/00829)).

Independientemente del modo de administración, la dosis específica se puede calcular según el peso corporal, la superficie corporal o el tamaño del órgano. Un refinado adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que implica a cada una de las susodichas formulaciones es realizado habitualmente por los expertos normales en la especialidad y está dentro del ámbito de las tareas realizadas habitualmente por ellos. Las dosificaciones apropiadas se pueden determinar a través del uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.

Además, las presentes composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante administración pulmonar, véase, p. ej., el documento PCT WO94/20069, que divulga el aporte pulmonar de proteínas químicamente modificadas. Para el aporte pulmonar, el tamaño de partícula debe ser adecuado para el aporte al pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede ser de 1 μm a 5 μm , sin embargo, se pueden usar partículas mayores, por ejemplo, si cada una de las partículas es bastante porosa.

Alternativamente o adicionalmente, las composiciones se pueden administrar localmente a través de la implantación en la zona afectada de una membrana, una esponja u otro material apropiado en el que OP se ha absorbido o encapsulado un agente de unión selectiva de OPGbp. Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano adecuado, y el aporte de un agente de unión selectiva de OPGbp puede ser directamente a través del dispositivo mediante embolada, o mediante una administración continua, o mediante un catéter usando infusión continua.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en una formulación o preparación de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeable en la forma de artículos conformados, p. ej. películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (Véase, p. ej., la Patente EE. UU. Nº 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo gamma (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. Tech., 12: 98-105 [1982]), etileno-acetato de vinilo o poli-ácido D(-)-3-hidroxibutírico. Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la especialidad. Véanse, p. ej., Eppstein y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); el documento EP 36.676; el documento EP 88.046 y el documento EP 143.949.

Los agentes de unión selectiva de OPGbp, es decir sus anticuerpos y fragmentos, variantes, derivados y fusiones, se pueden emplear solos o en combinación con otras composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, se pueden usar composiciones farmacéuticas que comprenden separadamente o conjuntamente un antagonista de OPGbp y un antagonista del receptor de interleucina 1, o un antagonista de OPGbp y un receptor de TNF soluble 1, o un antagonista de OPGbp y un receptor de TNF soluble 2 para el tratamiento de la artritis reumatoide. Además, se pueden usar composiciones que comprenden separadamente o conjuntamente un antagonista de OPGbp y un agente terapéutico para el cáncer para el tratamiento del cáncer y la pérdida de masa ósea asociada. Son posibles otras combinaciones con un antagonista o agonista de OPGbp dependiendo de la afección que se trate.

En algunos casos, puede ser deseable usar una composición farmacéutica que comprende composiciones de un agente de unión selectiva de OPGbp de un modo *ex vivo*. Aquí, células, tejidos u órganos que se han extraído del paciente se exponen a composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de unión selectiva de OPGbp, después de lo cual, las células, los tejidos y/o los órganos se implantan de nuevo posteriormente en el paciente.

En otros casos, una composición que comprende un agente de unión selectiva de OPGbp se puede aportar a través del implante en pacientes de ciertas células que se han manipulado genéticamente, usando métodos tales como los descritos en la presente, para expresar y secretar los polipéptidos, agentes de unión selectiva, fragmentos, variantes o derivados. Estas células pueden ser células animales o humanas, y se pueden aportar a partir del propio tejido del paciente o a partir de otra fuente, bien humana o bien no humana. Opcionalmente, las células pueden estar inmortalizadas. Sin embargo, a fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, se prefiere que las células estén encapsuladas para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Típicamente, los materiales de encapsulación son envueltas o membranas poliméricas semipermeables biocompatibles que permiten la liberación del producto o los productos proteínicos pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores dañinos procedentes de los tejidos circundantes.

Métodos usados para la encapsulación de células en membranas son familiares para el experto, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en pacientes se pueden efectuar sin una experimentación excesiva. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N° 4.892.538, 5.011.472 y 5.106.627. Un sistema para encapsular células vivas se describe en el documento PCT WO 91/10425 (Aebischer y cols.). Técnicas para formular una variedad de otros medios de aporte sostenido o controlado, tales como portadores liposómicos, partículas o cuentas bioerosionables, también son conocidas por los expertos y se describen. Las células, con o sin encapsulación, se pueden implantar en tejidos corporales u órganos adecuados del paciente.

Una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un agente de unión selectiva de OPGbp (tal como un anticuerpo anti-OPGbp, o uno de sus fragmentos, variantes, derivados y fusiones) dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos tales como la indicación para la que se está usando la composición, la vía de administración y la afección del sujeto. Los anticuerpos o dominios que se unen a antígeno antagonistas de OPGbp de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz para prevenir y/o tratar la pérdida de hueso asociada con la enfermedad ósea metastásica. Una "cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz" de un anticuerpo antagonista de OPGbp es la cantidad que reduce la velocidad y/o el grado de pérdida de masa ósea o previene la pérdida de masa ósea en un sujeto que tenga una masa ósea normal. Los cambios en la masa ósea se detectan mediante una variedad de métodos conocidos tales como absorciometría monofotónica (SPA), absorciometría bifotónica (DPA), absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA), tomografía digital cuantitativa (QCT) y ultrasonografía (Véase 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). Un experto en la especialidad puede usar estos métodos para determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de fusión de OPG. Una cantidad terapéuticamente eficaz también se puede determinar al medir cambios en marcadores bioquímicos para la renovación ósea, tales como osteocalcina sérica, fosfatasa alcalina sérica, péptidos de extensión de procolágeno I sérico, telopéptido C-terminal o N-terminal urinario o sérico de colágeno, calcio urinario, hidroxiprolina y piridinolina y desoxipiridinolina urinarias. Generalmente, se reconoce que una disminución en los niveles de los susodichos marcadores bioquímicos indica que la resorción ósea se disminuye y la pérdida de masa ósea se está reduciendo. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de fusión de OPG también se puede determinar al medir un cambio en la resistencia mecánica del hueso, en particular un incremento en la resistencia a la torsión (flexión) del hueso.

Según esto, puede ser necesario para el cuidador valorar la dosificación y modificar la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede variar de 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. Típicamente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que consiga el efecto deseado. Por lo tanto, la composición se puede administrar como una sola dosis, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de un agente de unión selectiva de OPGbp) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través del dispositivo de implantación o un catéter.

Ejemplo 1**Reactivos y Ensayos**

La diana de cribado usada en estos estudios se preparó a partir de la expresión de un ADNc que codifica OPGbp humana de los aminoácidos 140 a 317 inclusive según se muestra en la Figura 4 del documento PCT WO98/46751 en una célula hospedadora CHO y se purifica como sigue. Una columna de Q Sepharose (Pharmacia) se equilibró con tris 20 mM pH 8,5. Se aplicó medio acondicionado que se había valorado hasta pH 8,5, la columna se lavó con tampón de Tris y las proteínas se eluyeron con un gradiente de NaCl 100-600 mM a lo largo de 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían OPGL se identificaron a través de SDS-PAGE y análisis por transferencia Western. A continuación, las fracciones que contenían OPGbp se valoraron hasta pH 4,8 y se aplicaron a una columna Sp (Pharmacia) que se había equilibrado con acetato sódico 20 mM pH 4,8. Después de lavar, las proteínas se eluyeron con un gradiente de NaCl 0-0,3 M seguido por etapas de NaCl 0,5 M y 1 M. Se eluía OPGbp con todos los tampones, sin embargo, se encontraba que solo las fracciones con gradiente de NaCl 0-0,3 M eran activas en bioensayos de estimulación de osteoclastos in vitro. El rendimiento era 40 mg/l. La secuenciación aminoterminal revelaba que aproximadamente 80% de la proteína purificada empezaba con el aminoácido 143 de OPGbp humana, mientras que el aproximadamente 20% restante empezaba con el aminoácido 147. El producto final usado para cribar bibliotecas de fagos se denomina OPGbp[143-317], la forma purificada predominante.

Anticuerpos policlonales anti-OPGbp se prepararon como sigue. Tres conejos blancos de Nueva Zelanda (Western Oregon Rabbit Co., Philomath, OR) fueron inyectados inicialmente con cantidades iguales de Hunter Titer Max (CytRx Corp., Atlanta, GA) y OPGbp[143-317]. Se inyectaron 0,2 mg por conejo. Esto se repitió cuatro y seis semanas después. Se realizó un sangrado de 50 ml a las siete semanas y una vez por semana posteriormente durante un total de seis semanas. Los anticuerpos se purificaron por afinidad a partir de sueros de conejos inmunizados sobre una resina para OPGbp como sigue. Se añadieron tres ml de resina Actigel Ald (Sterogene) a una columna de 10 ml (columna Kontes Flex) y se lavó con 50 ml de PBS. Se añadieron tres mg de OPGbp[143-317] diluidos en 3 ml de PBS a la columna Actigel y se removieron suavemente para mezclar. A continuación, se añadieron 0,6 ml de cianoborohidruro Na 1 M y la mezcla se removió durante la noche a 4°C. La columna se lavó con 50 ml de tampón Pierce Gentle Elution (Pierce) seguido por 150 ml de PBS. Se filtraron estérilmente 50 ml de sueros procedentes de conejos inmunizados a través de un filtro de 0,45 µm, se añadieron a la columna y la mezcla se removió durante la noche a 4°C. Al día siguiente, el contenido de la columna se dejó sedimentar y la fase líquida se drenó. A continuación, la columna se lavó con 150 ml de PBS hasta una OD₂₈₀ de 0,002. A continuación, se añadió a la columna tampón Pierce Gentle Elution con ácido acético glacial al 1% y se recogieron fracciones de 1 ml a intervalos de 10 min y se analizaron mediante OD₂₈₀. Las fracciones que contenían la cantidad más alta de material absorbente de OD₂₈₀ se reunieron y se dializaron frente a dos litros de PBS durante 48 horas. Durante este tiempo, había un cambio de tampón.

Se realizaron ensayos ELISA sobre fracciones de fago eluidas al cultivar en placa OPGbp[143-317] a 1,5 µg/ml en PBS pH 8,0 durante 2 h a temperatura ambiente en inmunoplasmas Nunc Maxisorp sobre un oscilador. Se añadió a las inmunoplasmas una solución de enjuague de MPBS al 2% (tampón de bloqueo), se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se descartó. El bloqueo se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con MPBS al 2%. Los lavados se realizaron 5 veces usando TBS-Tween-20 (0,1%) (TBS; solución salina tamponada con Tris; Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM). Se añadió una valoración de fago usando un mínimo de 10¹⁰ fagos/pocillo en tampón de dilución conjugado (leche en polvo desnatada al 0,4% en TBS o M-TBS al 0,4%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron lavados usando TBS-Tween-20 (0,1%). Se usó conjugado de anticuerpo monoclonal con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-M13 (Pharmacia Piscataway, NJ) a una dilución de 1/2000 en MTBS al 0,4% durante 1,5 h a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron 5 veces con TBS-Tween-20 (0,1%). Se añadió 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolin sulfónico) (ABTS) (Pierce, Rockford, IL), sustrato colorimétrico para la detección a OD405. Se realizaron controles positivos para la detección de huOPG bp [143-317] cultivada en placa mediante la adición de OPG[22-194]-Fc, seguido por anti-Fc-fosfatasa alcalina y sustrato de para-nitrofenilfenol (pNPP) para la detección.

Condiciones de PCR y cultivo de 2xTY-AG

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) típica en una placa Thermowell de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 20 µl de mezcla de reacción de PCR [2 µl de 10X tampón de PCR (Gibco BRL Products, Grand Island, NY), 17,3 µl de agua, 0,2 µl de dNTPs (25 mM), 0,2 µl del cebador 870-02, 0,2 µl del cebador 2182-83 (soluciones madre de cebador 10 pmol/µl para la amplificación de la inserción), 0,1 µl de polimerasa de Taq]. Colonias individuales se recogieron y se resuspendieron en un pocillo y se cubrieron con 20 µl de aceite mineral, se cerraron herméticamente y a continuación se pusieron en una máquina de PCR.

870-02 5'-CCG ACT TTG CAC CTA GTT (SEQ ID NO: 22)

2182-83 5'-TTT GTC GTC TTT CCA GAC GTT AGT (SEQ ID NO: 23)

Se generó una placa duplicada para preparar cultivos al transferir la misma colonia recogida a la correspondiente posición del pocillo en un bloque de 96 pocillos profundos. Los cultivos se desarrollaron en de 0,3 a 1,0 ml de 2xTY-AG (caldo 2xTY: (16 g de bactotripton / litro de agua, 10 g de extracto de levadura / litro de agua, 5 g de NaCl/ litro de agua), que contiene 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa). El bloque se cerró con cinta permeable al aire, se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos para bajar el líquido, e incubadora a 37°C a de 300 a 350 rpm durante la noche para el cultivo. Los cultivos nocturnos recibían 150 µl/pocillo de glicerol al 50%, se mezclaron y se congelaron a -80°C.

Las condiciones de reacción de PCR eran 40 ciclos de 45 s a 90°C, 45 s a 55°C, 1,5 min a 72°C, seguido por una extensión a 72°C durante 10 min. Después de que se terminara la reacción de PCR, se hicieron correr de 2,5 a 4,0 µl sobre geles de agarosa al 1% de 25 pocillos con 0,5 µl/ml de bromuro de etidio, usando patrones de peso molecular de ADN (Gibco BRL Products, Grand Island, NY, o Stratagene, La Jolla, CA) durante 90 min a 90 voltios. Solo se consideraban inserciones de longitud completa de más de 1,6 kb.

Una parte alícuota de 16 µl de las reacciones de PCR se digirió con BstNI 3 horas a 60°C con una mezcla de digestión total de 30 µl que contiene 10 µl de agua, 3 µl de 10X REact Buffer 2 (GIBCO BRL Products), 0,3 µl de BSA (10 mg/ml), 0,7 µl de BstNI (GIBCO; 10.000 unidades/ml). Las muestras digeridas se hicieron correr sobre geles de agarosa al 3% de 25 pocillos durante 3,5 horas a 80 voltios.

Ensayo de células RAW

Concentraciones variables de muestras de prueba de Fab se mezclaron 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 1x mezcla de glutamina-penicilina-estreptomicina. Las concentraciones de muestras de Fab y OPGbp se indican para cada experimento. Después de la incubación, la mezcla se añadió a 2×10^4 células RAW 264.7/pocillo (American Type Culture Collection, Manassas, VA, N° de Registro TIB-71) en una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. Las células RAW se cultivaron en DMEM con suero bovino fetal al 10% y 1x glutamina-penicilina-estreptomicina. Después de tres días a 37°C y CO₂ al 5%, el medio se aspiró de los pocillos y las células se tiñeron con respecto a fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), un marcador de la diferenciación de osteoclastos, mediante la adición de 100 µl por pocillo de tampón de citrato 0,1 M con Triton X-100 al 0,1%, incubación durante cinco minutos a temperatura ambiente, adición de sustrato de fosfato de para-nitrofenilo (pNPP) y tartrato en tampón de citrato que contiene Triton X-100 (la concentración de sustrato era pNPP 20 mM y tartrato 335 mM) e incubación durante cinco minutos adicionales a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de NaOH hasta una concentración de 0,05 M. La fosfatasa ácida convierte el sustrato de pNPP en para-nitrofenol que se detecta mediante absorbancia a 405 nm. El cambio en la absorbancia a 405 nm se representó como una función del logaritmo de la dosis tanto para controles como para muestras de prueba. Se calculó un análisis de la varianza (ANOVA) y la potencia relativa con límites de confianza de 95%. Los controles positivos incluían concentraciones variables de proteína de fusión de OPG[22-194]-Fc o una preparación de anticuerpo policlonal anti-OPGbp preincubada con OPGbp[143-317] e incubada con células RAW264.7 según se describe anteriormente.

Ensayo de Médula Ósea

Se llevó a cabo un ensayo de médula ósea murina para la formación de osteoclastos esencialmente como se describe en Lacey y cols. (Cell 93, 165-176 (1998)) y Kong y cols. (Nature 397, 315-323 (1999)). Brevemente, el ensayo es una modificación del ensayo de cocultivo de médula ósea murina descrito en el documento PCT WO97/23614 en el que células de médula ósea murina no adherentes se cultivan en medio durante aproximadamente siete días en presencia de OPGbp (143-317) humana pero sin la adición de la línea celular estromática ST2, 1,25(OH)₂ vitamina D3 y dexametasona. Las células que tenían un fenotipo de osteoclastos se detectaban mediante la aparición de células positivas a TRAP. La actividad de TRAP se midió en solución o mediante tinción histoquímica.

Para la detección de la actividad de TRAP en solución, células de médula ósea de adulto se sometieron a lisis en tampón de citrato 100 mM (Sigma, N° Cat 91-5) + Triton X-100 al 0,1%, pH 5,0, 3-5 min. Se añadieron pNPP 10 mM, tartrato 80 mM y citrato 100 mM + Triton X-100 al 0,1%, pH 5,0 y se incubaron a TA, 3-5 min, y se midieron a 405 nm después de detener la reacción con 50 µl de NaOH 500 mM/pocillo. Una respuesta positiva era una disminución dependiente de la concentración en la absorbancia a 405 nm de ~2,0 OD a ~0,6 OD.

Para la tinción histoquímica, las células se fijaron en una solución fijadora basada en formaldehído, a continuación se tiñeron con Fast Garnet GBC (solución de 2-metil-4-[(2-metilfenil)-azo]bencenodiazonio) + solución de fosfato de naftol AS-BI (C₁₈H₁₅BrNO₆P) + solución de acetato + solución de tartrato, se incubaron 1 hora a 37°C, a continuación

se enjuagaron, se secaron y se evaluaron microscópicamente. Una célula que era positiva a TRAP y contenía tres o más núcleos (NMC positiva a TRAP) se consideraba un osteoclasto.

Ejemplo 2

Cribado de una Biblioteca de Fab humano

5 Una biblioteca de aproximadamente 4×10^{10} fragmentos Fab humanos únicos preparada en bacteriófago M13 se obtuvo de Target Quest, NV (Ámsterdam, Países Bajos). Procedimientos generales para la construcción y el cribado de bibliotecas de Fab humano se describían en de Haard y cols. (Advanced Drug Delivery Reviews 31, 5-31 (1998); J. Biol. Chem. 274, 18218-18230 (1999)). La biblioteca se cribó con respecto a fragmentos Fab que se unen a OPGbp[143-317] mediante los siguientes procedimientos.

10 Cultivo directo en placa en fase sólida

OPGbp [143-317] preparada según se describe anteriormente se inmovilizó sobre una fase sólida usando inmunotubos Nunc Maxisorb (12 x 75 mm, 5 ml de capacidad) al cultivar en placa directamente sobre la fase sólida a una concentración de proteína de 1,5 µg/ml en TBS, pH 8,0 (TBS era solución salina tamponada con Tris: Tris 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM) a temperatura ambiente durante 2 horas. Estas condiciones permitían 80% de cultivo en placa máximo de la fase sólida en 2 horas (el máximo a las 2 horas todavía era insaturante) mientras se retenían las capacidades de unión a OPG [22-194]-Fc. Después de la incubación de 2 horas, el tubo se lavó tres veces con PBS. La diana cultivada en placa se bloqueó al rellenar el inmunotubo con leche desnatada en polvo (Marvel o Carnation) al 2% en PBS (MPBS) durante de 1 a 4 horas a temperatura ambiente, se lavó dos veces cada una en PBS-Tween 20 (0,1%) y PBS. Los fagos concentrados en PEG (aproximadamente 10^{13}) se prebloquearon en MPBS al 2% para adsorber fagos de unión a leche antes de la exposición de los fagos a la diana en fase sólida. Los fagos prebloqueados se incubaron en 4 ml con la diana cultivada en placa a temperatura ambiente durante 2 h, (30 min girando completamente y 90 min en reposo). El contenido unido al tubo se lavó 20 veces con PBS-Tween 20 (0,1%) y 20 veces con PBS para retirar los fagos no unidos y para reducir la unión inespecífica. Los fagos se eluyeron de la fase sólida mediante una elución de fagos total de diez minutos con 1 ml de trietilamina (TEA) 100 mM pH 12, haciendo girar el tubo completamente, seguido por neutralización con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,4. Alternativamente, los aglutinantes de fagos específicos se recuperaron mediante elución con 1 ml bien de OPGbp[143-317] 1 µM o bien de OPG[22-194]-Fc 1 µM en MPBS al 0,4%, pH 8,0 o pH 7,4, respectivamente.

Los fagos eluidos (aglutinantes) se valoraron en la cepa de *E. coli* TG1 (Pharmacia, Piscataway, NJ.). La valoración se realizó por duplicado mediante una modificación del método de "dilución en pistas" (Huycke y cols. BioTechniques 23, 648-650 (1997)) mediante 10 µl de dilución de fagos en caldo 2xTY en 90 µl de células TG1 en fase logarítmica (A600 de 0,2 a 1,0 ODs), se mezclaron y se incubaron 20-30 minutos a temperatura ambiente. Diez µl se aplicaron en estrías horizontalmente en un carril, 6 carriles por placa de Petri cuadrada 2xTY-AG (caldo 2xTY, que contiene 2% de glucosa, 100 µl /ml de ampicilina y 15 g/litro de agar) y se incubaron durante la noche a 37°C.

Los fagos eluidos (aglutinantes) se amplificaron a través de infección bacteriana en células TG1. Se inocularon veinticinco ml de caldo 2xTY con células TG1 de *E. coli* y se hicieron crecer a 30°C durante más de 12 h, 270 rpm. El cultivo nocturno se inoculó 1:100 en 50 ml de caldo 2xTY y se hizo crecer ~1,5 h, 270 rpm hasta una OD600 de 0,5. Para la amplificación del fago seleccionado, se añadieron 5 volúmenes de células TG1 de *E. coli* exponenciales, 4 volúmenes de caldo 2xTY y 1 volumen de fagos eluidos (neutralizados) conjuntamente y se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 30 min. Para reducir el volumen para el cultivo en placa, las células se centrifugaron a 4.000 rpm y la pella se resuspendió en caldo 2x TY-AG (100 ug/ml de ampicilina, 2% de glucosa). En la primera ronda de selección, la muestra se cultivó en placa sobre de dos a cuatro placas 2x TY-AG (caldo 2xTY, que contiene 2% de glucosa, 100 ug/ml de ampicilina y 15 g de agar) de 16 cm² para mantener la diversidad. Para las últimas rondas de selección, era suficiente una placa. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C. Después del crecimiento nocturno, se añadieron 5 ml de 2xTY-AG a cada placa grande, y las bacterias se rascaron con una paleta estéril. Después de la resuspensión completa y la concentración mediante centrifugación a 4.000 rpm, 10 min, una muestra concentrada se transfirió a un Nunc Cryotube. Se añadió glicerol estéril hasta una concentración final de 15% y se almacenaron inmediatamente a -70°C.

Las células amplificadas se resuspendieron en caldo 2x TY-AG hasta ~0,1 OD y se hicieron crecer durante 1,5-2,5 h a 37°C, 270 rpm, hasta una OD600 de 0,5 y se transfirieron (5 ml) a un tubo de Falcon de 50 ml que contenía una cantidad apropiada de fago cooperador M13K07 (Gibco BRL Products, Grand Island, NY), con una relación de 20 a 1 de fagos a bacterias. La mezcla de fagos y bacterias se incubó a 37°C durante 30 min sin agitación seguido por centrifugación durante 15 min, 3.700 rpm. El sobrenadante se retiró y la pella bacteriana se resuspendió en 25 ml de 2xTY-AK (100 ug/ml de ampicilina, 25 ug/ml de kanamicina) y se transfirió a un matraz de 250 ml durante una incubación nocturna a 30°C con remoción a 270 rpm. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó en un tubo de Falcon de 50 ml durante 20 min a 3.700 rpm para nodulizar las bacterias. Se añadió al sobrenadante 1/5º del volumen de una solución de polietilenglicol (PEG) (20% de PEG 8000, NaCl 2,5 M) y se mantuvo sobre hielo durante al menos 1

h. Los fagos se nodulizaron 20 min, 3.700 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó y la pella se resuspendió en ~1,0 ml de PBS estéril y se transfirió a un tubo de Eppendorf de 1,5 ml. La muestra se microcentrifugó 2 min. ~14.000 rpm para retirar las bacterias restantes y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se repitió la precipitación en PEG. Los fagos precipitados en PEG concentrados se usaron en ensayos de selección o cribado. El rendimiento estándar era aproximadamente $1-5 \times 10^{13}$ fagos a partir de 25 ml de cultivo. Para un almacenamiento más prolongado, se añadió agua a los fagos (15% de concentración final) y los fagos se almacenaron a -70°C.

Este procedimiento describe una ronda de cribado, que comprende las etapas de unión, elución y amplificación. Típicamente, se realizaron de tres a cinco rondas de cribado a fin de obtener un conjunto de fagos eluidos que se une a OPGbp [143-317] en un ensayo ELISA a un nivel al menos cuatro veces sobre el fondo. Después de que se completara el cribado, los fagos eluidos finales se cultivaron en placa para colonias individuales y el ADN insertado se analizó mediante PCR de colonias y digestión con BstNI según se describe posteriormente.

Fase en solución

Los fagos se prebloquearon durante 60 min en un rotor a temperatura ambiente en MPBS al 2%. Se añadió péptido del bucle b-b' de OPGbp biotinilado (500 nM) directamente a la mezcla de fagos equilibrada y se incubó durante de 30 min a 1 hora en un rotor (giro completo) a temperatura ambiente. El péptido del bucle tenía la secuencia [biotina(LC)-TDIPSGSHKVSLSWYHDRG] (SEQ ID NO: 24) donde la LC (cadena lineal, es decir, $(CH_2)_5-NH_2$) se usó para conectar la secuencia del bucle b-b' de OPGbp a biotina. Se usaron Dynabeads revestidas con estreptavidina (100 μ l por selección en tubos de Eppendorf de 1,5 ml) para la captura por fagos en solución de complejos de antígeno biotinilado-fago (3X para la selección negativa y 1X para la del antígeno diana). Cuentas revestidas con estreptavidina se preequilibraron al atraerse al lateral del tubo usado un imán Dynal, el tampón se retiró y las cuentas se resuspendieron en 1 ml de MPBS al 2%. El equilibrado a temperatura ambiente era durante 1-2 h en un rotor de giro completo.

Se realizaron tres selecciones negativas en las rondas 2 y 3. Para la selección negativa, se añadieron fagos prebloqueados a un tubo de Dynabeads revestidas con estreptavidina preequilibradas en MPBS al 2% y se incubaron durante 30 min en un rotor de giro completo a temperatura ambiente (repetido dos veces). Las cuentas se atrajeron al lateral y los fagos no unidos se transfirieron a un tubo de Eppendorf reciente para ser usados para la selección de antígeno. Se añadió péptido del bucle b-b' de huOPGbp biotinilado (500 nM) directamente a la mezcla de fagos equilibrada y se incubaron durante de 30 min a 1 hora en un rotor de giro completo a TA. Las cuentas equilibradas se atrajeron al lateral del tubo, el tampón se retiró y se resuspendieron con la mezcla de fago-péptido biotinilado seguido por incubación durante 15 min en un rotor de giro completo a TA. Los tubos se pusieron en una rejilla magnética durante 1 min, se aspiraron y las cuentas se lavaron 6 veces con 1 ml de MPBS al 2%-Tween-20 (0,1%), 6 veces con 1 ml de PBS-Tween-20 (0,1%) y 2 veces con 1 ml de PBS. Los fagos se eluyeron con 1 ml de TEA 100 mM pH 12 durante 5-10 min en un rotor a temperatura ambiente seguido por neutralización con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7,4.

Ejemplo 3

Identificación de clones de Fab que se unen a OPGbp

Se infectaron células TG1 de *E. coli* con el conjunto de fagos procedente de una ronda sensible a ELISA y se recogieron colonias individuales para el análisis por PCR. Típicamente, se recogieron para cada selección de una a cuatro placas de 96 colonias. Los ADNsc de Fab se amplificaron mediante PCR mediante un grupo específico de cebadores y se analizaron sobre un gel de agarosa con respecto a la longitud de la inserción de Fab. Las longitudes de inserciones de Fab > 1,6 kb eran de longitud completa. Los ADNsc también se digirieron con la enzima de restricción BstNI y el patrón de obtención de bandas se analizó mediante electroforesis sobre geles de agarosa. Los clones que exhibían inserciones de longitud completa de PCR de tamaño idéntico y patrones de obtención de bandas de BstNI idénticos en dos o más aislados eran candidatos para el análisis adicional. Usando los criterios anteriores, se identificaron los siguientes Fabs.

El patrón de Fab "P" se identificó después del cribado en fase de solución usando tres rondas de elución con trietilamina, pH 12, seguido por cribado en fase sólida según se describe anteriormente usando una ronda de elución con OPGbp[143-317] 1 μ M.

El patrón de Fab "S" se identificó mediante el cribado en fase de solución usando tres rondas de elución con trietilamina, pH 12, seguido por cribado en fase sólida según se describe anteriormente usando dos rondas de elución con OPG [22-194] -FC 1 μ M.

El patrón de Fab "AT" se identificó mediante el cribado en fase sólida según se describe anteriormente usando tres rondas de elución con OPG [22-194] -FC 1 μ M.

El patrón de Fab "Y" se identificó mediante el cribado en fase sólida según se describe anteriormente usando tres rondas de elución con OPGbp[143-317].

Los fagos se prepararon a partir de colonias individuales que exhibían los patrones AT, Y, P y S de Fab mediante el siguiente procedimiento. Se elaboraron preparaciones de plásmidos y se transformaron en células TG1. El análisis por PCR confirmaba la transformación de una inserción de longitud completa. Las células se hicieron crecer bien en un bloque de pocillos profundos (0,5 ml de volumen) o bien como un cultivo de 10 ml. Los fagos se rescataron mediante una relación 20:1 de infección con fagos cooperadores M13K07/células, se precipitaron en PEG 1 vez (como en el protocolo de cultivo en placa directa en fase sólida) y se resuspendieron en ~200 µl procedentes de un bloque de pocillos profundos de un tamaño de pocillo de 2 ml o ~500 µl procedentes del cultivo de 10 ml en PBS.

Los títulos de fagos estaban en el intervalo de 10^{11} - 10^{14} fagos/ml en el ELISA. Se realizaron valoraciones basadas en el volumen usando un máximo de adiciones de 50 µl/pocillo dando un intervalo típico 10^9 - 10^{11} fagos/pocillo en un ELISA. El ELISA en fagos se realizó como se describe previamente. El ELISA usa conjugado anti-M13-HRP para la detección de fago unido con ABTS, un sustrato colorimétrico a 405 nm. El conjugado anti-M13 HRP era específico para la proteína VIII de cubierta principal en el fago. Los valores procedían de determinaciones puntuales individuales.

Los resultados de un ELISA de un clon representativo procedente de cada uno de los patrones principales "AT", "Y", "P" y "S" se muestran en la Figura 1. Los cuatro clones de Fab demostraban una reactividad significativa con OPGbp[143-317]. Todos los miembros de los clones procedentes de los patrones "AT" y "Y" (27 miembros procedentes de 672 clones y 9 miembros procedentes de 96 clones, respectivamente) se encontraron idénticos en secuencia dentro de sus patrones. Por lo tanto, cualquier miembro de un patrón sería representativo de todo el patrón para los patrones "AT" y "Y".

Los patrones "Q" (3 miembros procedentes de 96 clones), "X" (3 miembros procedentes de 96 clones) y "AB" (2 miembros procedentes de 96 clones) también eran positivos en ELISA a OPGbp[143-317] cultivada en placa según se determina por un clon representativo (Figura 1). Puesto que las señales de ELISA eran considerablemente inferiores que los patrones "AT", "Y", "P" y "S", y representadas solamente por de dos a tres miembros en 96 clones, se suponía que tenían Kds en el intervalo de µM y no se analizaban adicionalmente. El patrón "X" solamente era positivo en ELISA cuando la concentración de Tween-20 en los lavados se reducía de 0,1% a 0,01%.

Ejemplo 4

Purificación de Fabs solubles

Fagos que contenían Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se infectaron en E. coli HB2151 (Pharmacia, Piscataway, NJ) y la expresión de fragmentos Fab se indujo mediante la adición de IPTG hasta 1 mM generalmente durante al menos 5 h, excepto que para el patrón Y los niveles de IPTG se reducían hasta 0,25 mM. Después de la inducción, las células (750 ml) se recolectaron mediante centrifugación y los Fabs se liberaron del espacio periplásmico mediante choque osmótico.

La pella total se resuspendió en 8 ml de TES (Tris 0,2 M, EDTA 0,5 mM, sacarosa al 17,1%, pH 8,0) enfriado con hielo, se transfirió a un tubo de 50 ml y se incubó durante de 5 a 10 min sobre hielo con remoción suave ocasional. Mientras tanto, los tubos vacíos se lavaron con 8,8 ml de TES/H₂O (1:3) para recuperar la pella celular restante y se añadieron a las otras células y se incubaron otros 20 min sobre hielo. Las células se centrifugaron a 14.000 rpm durante 3 min y el sobrenadante se transfirió desde la pella celular ligeramente mojada a otro tubo de 50 ml. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C para retirar la contaminación celular residual. El sobrenadante se denominaba la fracción periplásmica liberada de TES. La pella bacteriana se resuspendió en 10 ml de TES más MgSO₄ 15 mM, se incubó sobre hielo durante 15 min y se centrifugó dos veces como anteriormente. El sobrenadante se denominaba la fracción periplásmica liberada de Mg. Se añadió albúmina sérica bovina (BSA; calidad RIA, Sigma) como un portador y estabilizante a cada fracción periplásmica hasta una concentración final de 1 mg/ml y se dializó durante 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, 0,05 mg/ml de Pefabloc, leupeptina 50 nM, 0,06 µg/ml de aprotinina y 0,9 µg/ml de pepstatina A.

Los extractos periplásmicos que contienen Fab (liberados de TES y Mg) se sometieron separadamente a una unión de método discontinuo 1 h girando a 4°C con de 0,8 ml a 1,5 ml (1/20° del volumen del extracto) de resina Talon (Clontech) preequilibrada, a continuación un lavado con el método discontinuo en al menos 2Xs 20 volúmenes de columna de tampón de columna. La resina Talon se rellenó en la columna, se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de columna y 2 volúmenes de columna de tampón de columna más imidazol 50 mM para liberar proteínas unidas inespecíficamente. Los Fabs purificados se eluyeron con de 2 a 3 volúmenes de columna de imidazol 200 mM, glicerol al 4%. A continuación, los extractos purificados se concentraron/se intercambiaron en un Centricon 10 (Amicon, Inc. Beverly, MA) en PBS, pH 7,4 hasta una concentración final de 0,5 a 5 mg/ml. La pureza de Fab "AT" soluble se determinó en un 10% Bis Tris NuPAGE Gel Novex (San Diego, CA) con tampón de recorrido NuPAGE

MOPS SDS (no reductor) y 4X tampón de muestra de LDS (pH 8,45). Las muestras de Fab purificadas que contenían el tampón de muestra de LDS se calentaron a 70°C durante 10 min y se cargaron 40 µl/carril. El gel se recorrió a 200 voltios, 20 min, a continuación se redujo hasta 50 voltios ~1,5 h, se tiñó con tinte azul de Coomassie coloidal Novex ~14 h y se destiñó. Se determinó que el Fab "AT" soluble tenía más de 98% de pureza.

5 **Ejemplo 5**

Actividad de Fabs anti-OPGbp purificados

La actividad de Fabs "AT" y "Y" solubles purificados se analizó mediante los siguientes ensayos.

Ensayo de inhibición de la interacción OPGbp/ODAR

La interacción de OPGbp [143-317] humana y su receptor ODAR se midió en un ensayo de transferencia de energía de fluorescencia (FRET). Se añadió una preincubación de 1 hora con OPGbp para incrementar la sensibilidad. Se construyó un dominio extracelular soluble de ODAR humano como un polipéptido de fusión con una etiqueta FLAG aminoterminal y una región Fc humana carboxiterminal. La región Fc es reconocida y se une a una alofococianina (APC) específica de anti-(Fc humano) caprino policlonal que es detectada por absorbancia a 665 nm. OPGbp [143-317] se marcó con Eu2+ que se detecta mediante absorbancia a 620 nm. La unión de OPGbp a ODAR en este ensayo desencadena una transferencia de energía fluorescente y es muy sensible para curvas de competición. Una disminución en la relación de absorbancias A665/A620 indica una inhibición de la unión de OPGbp a ODAR.

Se observaba una inhibición dependiente de la concentración de la unión de OPGbp-Eu a sODAR-Fc para preparaciones por duplicado de Fabs "AT" y "Y" solubles. El Fab "AT" soluble (preparación A) inhibía la unión de OPGbp a la fusión ODAR-Fc soluble con una IC50 de 550 nM. El Fab "Y" soluble inhibía con una IC50 de 6 µM. El clon de Fab "AT" 1B5 procedía del patrón de 27 miembros predominante procedente de siete placas de 96 pocillos (todos con la misma secuencia de aminoácidos) obtenido mediante elución de la diana OPGbp usando una solución de OPG[22-194]-Fc 1 µM durante 90 min. El clon de Fab "Y" 1B4 procedía del patrón de 9 miembros predominante procedente de una placa de 96 pocillos (todos con la misma secuencia de aminoácidos) a partir del cribado optimizado de OPGbp cultivada en placa usando una elución de OPGbp 1 µM durante 90 min. Una segunda purificación de Fab "AT", clon 6F11, (denominada preparación B) daba una IC50 similar de 440 nM para PBS y una IC50 de 354 nM para TBS. Una segunda purificación de Fab "Y" (preparación B) daba una IC50 similar de 4,1 µM para TBS. El control positivo era OPGbp[143-317] en TBS o PBS con IC50s correspondientes de 0,89 y 0,93 nM, respectivamente. Se obtuvieron IC50s similares con las preparaciones "A" y "B" duplicadas. Los resultados de la preparación "B" de Fabs "AT" y "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 por dos etapas de retirada de endotoxinas secuenciales usando una columna de afinidad de polimixina (~1 ml; BioRad, Hercules, CA) en PBS a temperatura ambiente según las instrucciones del fabricante, excepto como sigue. Para incrementar la probabilidad de retirar endotoxina unida al Fab, después de la adición de la muestra, se recicló una parte alícuota de 100 µl a 150 µl del fondo a la parte superior de la columna cada 5 min durante de 2 a 2,5 horas. El Fab se eluyó con 3 volúmenes de columna de PBS con glicerol al 4%.

Las muestras se probaron con respecto a la endotoxina usando un sistema de detección E-Toxate (lisado de amebocitos de limulus) (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante. A continuación, las muestras se esterilizaron por filtración (0,2 µm). El Fab "P" se desnaturalizó después de la purificación y se unió pobremente a OPGbp [143-317] en un ELISA. Se usó como un control negativo en estos experimentos.

El formato de ensayo incluye una preincubación de 1 hora del Fab anti-OPGbp con 10 ng/ml de OPGbp [143-317] humana (concentración celular final en los pocillos). Se llevaron a cabo ensayos de TRAP en solución usando sustrato cromogénico pNPP. Los resultados se muestran en la Figura 3. El Fab "AT" daba una disminución de 50% (IC50) a 57,8 nM; el Fab "Y" daba una disminución de 50% en 212 nM; el Fab "P" daba una disminución de 50% a 1,5 µM. Se usó en estos cálculos un peso molecular de Fab estimado de 50.000 para dar un factor de conversión de 1 µg/ml = 20 nM.

Las IC50s que se determinaban mediante tinción histoquímica con TRAP eran similares a las anteriores que se determinaban en el ensayo de pNPP.

Ensayo con Células RAW

Los efectos de añadir Fabs "AT", "Y" y "P" solubles al ensayo con células RAW se muestran en la Figura 4. El punto de 50% para la gráfica se tomó como 1,65 OD₄₀₅ nm. El Fab "AT" tiene una IC₅₀ de 15 µg/ml, 300 nM (suponiendo un peso molecular del Fab de 50.000). El Fab "Y" tiene una disminución en la señal hasta 2,15 OD₄₀₅ desde 2,5 OD₄₀₅, un punto de 80%. Mediante extrapolación, una OD₄₀₅ del punto de 50% de 1,65 para Fab "Y" se alcanzaría a ~400 µg/ml x 20 = ~8 µM. "P" no muestra ninguna reactividad detectable en el ensayo.

Ejemplo 6

Secuenciación y Análisis de Clones de Fab

Las secuencias de ADN y de aminoácidos predicha para las cadenas ligeras de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se mostraban en las Figuras 5, 6, 7 y 8, respectivamente. Las secuencias de ADN y de aminoácidos predicha para las cadenas pesadas de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se mostraban en las Figuras 9, 10, 11 y 12, respectivamente. La Figura 13 muestra una matriz de comparación de secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, de los cuatro clones de patrones de Fab predominantes basándose en la identidad y la similitud. La identidad y la similitud se obtuvieron bien mediante el programa GCG o bien se calcularon a mano. Las secuencias de las cadenas pesadas de Fabs "AT" y "Y" tienen la coincidencia más cercana ya que se diferenciaban por un solo aminoácido (cambio conservativo) y así tenían una identidad de 99,6% y una similitud de 100%. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras se compararon entre los cuatro patrones superiores con respecto tanto a la identidad como a la similitud mutuas. Los Fabs "AT", "Y" y "P" mostraban una identidad de al menos 85% y una similitud de al menos 89%. El patrón "S" era el más distinto, siendo de la familia V lambda más rara.

Una comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) se mostraba en la Figura 14. Los Fabs "AT" y "Y" tenían secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas idénticas en CDR1, CDR2 y CDR3. La CDR1 de la cadena pesada de los Fabs "P" y "S" tenía cada una 3 residuos de aminoácido idénticos a la secuencia de CDR1 de "AT" y "Y". La secuencia de CDR2 de "P" y "S" mostraba una identidad mutua mayor que a la secuencia de CDR2 de "AT" y "Y". Las cadenas ligeras de los Fabs "AT" y "Y" mostraban longitudes idénticas de CDR1, CDR2 y CDR3. Las CDRs 1 y 3 de la cadena ligera de los patrones "AT" y "Y" mostraban identidad en 7 de 11 residuos (64%) y 3 de 5 residuos (60%), respectivamente. Aunque la CDR2 de la cadena ligera de los patrones "AT" y "Y" no muestra identidad mutua, cada una contiene parte de la secuencia de consenso para la CDR2 de la cadena ligera. Cuando los 4 primeros residuos del patrón "AT" se combinaban con los 3 últimos residuos del patrón "Y", se obtenía la CDR2 de la cadena ligera de patrón "P". La CDR3 de la cadena ligera puede variar en longitud de 5 a 25 residuos. Por lo tanto, las CDR3s de la cadena ligera obtenidas en los patrones "AT", "Y" y "P" eran muy cortas. El más singular de los cuatro clones de patrón predominantes era Fab "S."

Una comparación de las clases de Fab representadas en los cuatro patrones predominantes se mostraba en la Figura 15. Estos resultados se obtenían a partir del análisis V-Base DNA PLOT. Como se esperaba, los Fabs "AT" y "Y" eran de la misma familia de VH1 (familia pesada variable 1) con las mismas regiones VDJ (variables, diversidad y enlace). Los Fabs "AT" y "Y" pertenecen a diferentes familias de cadenas ligeras. Los Fabs "P" y "S" pertenecen a la misma familia de la cadena pesada VH3 pero diferentes familias de la cadena ligera. Todas las cadenas pesadas tiene las mismas regiones de enlace JH4b.

Un alineamiento de las secuencias Fab y las correspondientes secuencias germinales se muestra en las Figuras 16-18 para las cadenas pesadas y la Figura 19-22 para las cadenas ligeras. Resultan cambios en las cadenas pesadas y ligeras de "AT", "Y", "P" y "S" de somatic matasis presentes en la naturaleza que surgen en secuencias germinales de anticuerpo durante la respuesta de un anticuerpo. Las regiones variables de las cadenas pesadas de "AT" y "Y" (los 127 aminoácidos aminoterminales en las Figuras 9 y 10, respectivamente) tenían 17 y 18 cambios de aminoácido, respectivamente, en comparación con las correspondientes secuencias germinales VDJ. La región variable de la cadena pesada "P" (los 117 aminoácidos aminoterminales en la Figura 11) tiene 16 cambios de aminoácido en comparación con la correspondiente secuencia germinal VDJ. La región variable de la cadena pesada "S" (los 124 aminoácidos aminoterminales en la Figura 12) tenía 14 cambios de aminoácido en comparación con las secuencias germinales. La región variable de la cadena ligera "AT" (residuos 6-108 en la Figura 5) tenía 16 cambios de aminoácido en comparación con la correspondiente secuencia germinal VJ; la cadena ligera "Y" (residuos 6-108 en la Figura 6) tenía 14 cambios de aminoácido; la cadena ligera "P" (residuos 5-108 en la Figura 7) tenía 14 cambios de aminoácido; y la cadena ligera "S" (residuos 5-112 en la Figura 8) tenía 12 cambios de aminoácido. En general, las diferencias de aminoácidos se producían con la mayor frecuencia en las regiones CDR3 de cadenas tanto pesadas como ligeras.

Ejemplo 7**Clonación y Expresión de anticuerpos OPGbp humanos de longitud completa**

Los clones de Fab se convirtieron en anticuerpos de longitud completa mediante los siguientes procedimientos.

Construcción de pDSR α 19:hCH

- 5 El plásmido pDSR α 19:EPO se digirió con HindIII y SalI para retirar la región codificante para eritropoyetina. Se usó el plásmido pCRBluntCH1-3 que contiene la C_{H1} de IgG1 humana, bisagra, dominios C_{H2} y C_{H3} insertados en el vector pCRBlunt (Invitrogen) para obtener un dominio constante de IgG1 de 1,4 kb. pCRBluntCH1-3 se digirió con HindIII y SalI y las secuencias del dominio constante se insertaron en pDSR α 19 para generar pDSR α 19:hCH.

Construcción de pDSR α 19:AT-VH21

- 10 Cuatro ADNcs de cadena pesada de Fab de anti-huOPGbp se clonaron en pDSR α 19:hCH para convertir los Fabs en IgGs de longitud completa. La construcción de un plásmido que codifica la cadena pesada "AT" se describe aquí. Las otras cadenas pesadas de Fab se clonaron usando procedimientos similares. Para generar el Fab con una secuencia de señalización, se realizó una PCR en tres etapas. En primer lugar, se usaron los cebadores 2249-25 y 2248-22 con la plantilla de ADNc de Fab. Las condiciones eran: 94°C durante 1 min, (95°C durante 30 s, 50°C durante 1 min., 68°C durante 1 min) durante 20 ciclos, 68°C durante 10 min. con polimerasa de Pfu y el tampón y los nucleótidos apropiados. A continuación, el producto de PCR se amplificó con los cebadores 2209-21 y 2248-22 seguido por amplificación con los cebadores 2209-20 y 2248-22. El producto de PCR final se limpió, se cortó con HindIII y BsmBI y se purificó en gel. Este fragmento contiene el Fab con un sitio Kozak 5' (inicio de la traducción) y la siguiente secuencia de señalización para la expresión en mamífero de la cadena pesada de Fab "AT":
- 15

20 MEWSWVFLFSLVTTGVHS (SEQ ID NO: 25)

Esta secuencia de señalización se denomina la secuencia de señalización VH21.

El plásmido pDSR α 19:hCH se digirió con HindIII y BamBI para retirar el policonector antes de los dominios 1-3 de C_H de IgG y el producto de PCR de Fab se insertó para generar pDSR α 19:AT-VH21.

25 Cebadores:

```

      HindIII  Kozak
2209-20 5'-CAGAAGCTTAGACCACC ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC T-3'
(SEQ ID NOS: 26 & 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 NOS: 28 & 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 NOS: 30 & 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)

```

30 Construcción de pDSR α 19:AT-L

- ADNsc de la cadena ligera de Fabs "AT", "Y", "P" y "S" se clonaron en pDSR α 19 para convertir los Fabs en anticuerpos de longitud completa. La construcción de un plásmido que codifica la cadena ligera "AT" se describe aquí. Los otros Fabs se clonaron usando procedimientos similares. Para generar Fab "AT" con una secuencia de señalización, se realizó una PCR en tres etapas. En primer lugar, se usaron los cebadores 2233-50 y 2233-51 con la plantilla de ADNc de Fab. Las condiciones de PCR eran: 94°C durante 1 min., (95°C durante 30 s, 50°C durante 1 min., 68°C durante 2 min.) durante 20 ciclos, 68°C durante 10 min. con polimerasa de Pfu y el tampón y los nucleótidos apropiados. A continuación, el producto de PCR se amplificó con los cebadores 2148-98 y 2233-51 seguido por amplificación con los cebadores 2148-97 y 2233-51. El producto de PCR final se limpió, se cortó con HindIII y SalI y se purificó en gel. Este fragmento contiene el Fab con un sitio Kozak 5' (inicio de la traducción) y la siguiente secuencia de señalización para la expresión en mamífero de la cadena ligera "AT":
- 35
- 40

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 33)

Esta secuencia de señalización se denomina secuencia de señalización "ligera".

- 5 El plásmido pDSRα19:EPO se digirió con HindIII y Sall para retirar el gen EPO antes de que se insertara el producto de PCR de la cadena ligera de IgG para generar pDSRα19: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 & 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 & 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 & 39)
W L R G A R C E I V M T Q S

Sall
2233-51 5'-TTTGGACGTCGAC TTA TTA ACA CTC TCC CCT G-3' (SEQ ID NO: 40 &
41)
* * C E G R

```

10

Construcción de pDSRα19:AT-tPA

Se construyeron vectores de expresión para la producción de cadenas pesadas de longitud completa "AT", "Y", "P" y "S" según se describe anteriormente, excepto que los cebadores se modificaban para introducir la siguiente secuencia de señalización:

15

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVFSPSRGRFRR (SEQ ID NO: 42)

Esta secuencia de señalización se denomina la secuencia de señalización "tPA-RGR".

Construcción de pLDH-AT

- 20 Se construyó un vector de expresión que incluía cadenas tanto pesadas como ligeras "AT". El plásmido pDSRα19:AT-Vh21 se digirió con AatII y NdeI y los extremos se rellenaron mediante ADN polimerasa de T4. El fragmento que contenía el casete de expresión de la cadena pesada "AT" (cadena pesada "AT" que codifica una secuencia flanqueada por el promotor y el sitio de poliadenilación procedente de pDSRα19) se purificó en gel y se ligó a pDSRα19:AT-L que se había linealizado con NheI, rellenado con ADN polimerasa de T4 y desfosforilado con fosfatasa alcalina. El casete de expresión de la cadena pesada estaba en la misma orientación transcripcional que la cadena ligera y los genes DHFR.
- 25

Preparación de Anticuerpos

- 30 Vectores de expresión que contenían ADNc que codifica anticuerpos de longitud completa "AT", "Y", "S" y "P" de la cadena pesada y ligera (bien en vectores separados o bien en un solo vector) se transfectaron en células CHO y se cultivaron bajo condiciones que permitieran la expresión de cadenas pesada y ligera y la secreción en el medio celular. El medio acondicionado se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm (Corning, Acton, MA) y se aplicó a una columna de proteína G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) que se había equilibrado con PBS – solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin cloruro cálcico y sin cloruro magnésico (Gibco BRL Products, Grand Island, NY). Después de la aplicación de la muestra, la columna se lavó con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzaba el valor de referencia. La elución de proteína se alcanzaba usando glicina 100 mM, pH 2,5. Las fracciones se recogieron y se neutralizaron inmediatamente mediante la adición de Tris-HCl 1 M, pH 9,2. Los anticuerpos se detectaron mediante SDS-geles de poli(acrilamida) visualizados mediante tinción con Commassie.
- 35

- 40 Las fracciones que contenían anticuerpo se reunieron, se concentraron y se diafiltraron en PBS usando bien Centricon 10 (Amicon) o bien para volúmenes mayores Centriprep 10 (Amicon).

El anticuerpo aislado se caracterizaba mediante filtración en gel sobre Superose 6 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se mostraba que se trasladaba como una IgG monomérica.

Ejemplo 8

Análisis por BIAcore de la unión de Fab y anticuerpos a OPGbp

- 5 Las constantes de unión (K_d), constante de velocidad de asociación (k_a) y constante de velocidad de disociación (k_d) para los Fabs "AT" e "Y" y el anticuerpo "AT" se determinaron mediante técnicas de resonancia plasmónica superficial (BIAcore, Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey) y los resultados se muestran en la Tabla II. Los Fabs se prepararon según se describe en el Ejemplo 4 y el anticuerpo "AT" se prepara según se describe en el Ejemplo 7. La OPGbp se inmovilizó sobre un chip CM5 mediante acoplamiento con amina estándar. La K_d y las constantes se
- 10 velocidad se determinaron mediante el software BIAEVALUATION 3.0 (Pharmacia).

TABLA II
Análisis por BIAcore de Fabs "AT" e "Y" y anticuerpo "AT"

	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
Fab "Y"	$9,44 \times 10^3$	$5,91 \times 10^{-3}$	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

- 15 La afinidad de unión de Fab "AT" se incrementaba de aproximadamente 140 nM a aproximadamente 0,33 a 0,43 nM, o aproximadamente 350 a 400 veces, cuando se añadía una región constante de IgG₁ de Fc según se describe en el Ejemplo 7.

Ejemplo 9

Actividad de anticuerpos anti-OPGbp

- 20 Ensayo con Células RAW

Las preparaciones de anticuerpo "AT" denominadas 405, 406 y 407 se probaron en un ensayo con células RAW según se describe en el Ejemplo 1. "AT"405, "AT"406 y "AT"407 difieren solamente en las secuencias líder usadas para la expresión ("AT"405 se expresaba usando la secuencia de señalización "ligera", "AT"406 usaba la secuencia de señalización de tPA-RGR y "AT"407 usaba la secuencia de señalización de VH21). Los anticuerpos maduros

25 purificados eran idénticos en cada preparación. Los resultados se muestran en la Figura 23.

Las IC₅₀s para "AT"405, "AT"406 y "AT"407 eran 20,1 nM, 60,3 nM y 21,4 nM, respectivamente, correspondientes a 3,0 µg/ml, 9,0 µg/ml y 3,2 µg/ml, respectivamente (suponiendo un peso molecular de 150.000). Los controles positivos de OPG[22-194]-Fc y el anticuerpo policlonal anti-OPGbp estaban en 33 ng/ml y 150 ng/ml,

30 respectivamente.

La diferencia en IC₅₀ en el ensayo con células Raw del fragmento Fab "AT" era 300 nM en comparación con aproximadamente 20 nM para la longitud completa de "AT", o un incremento de aproximadamente 15 veces para el anticuerpo "AT" de longitud completa. Teniendo en cuenta las diferencias en las concentraciones de OPGbp en los

35 dos experimentos (150 ng/ml / 60 ng/ml = 2,5 veces), el incremento en la avidéz de la función celular para el anticuerpo "AT" de longitud completa era aproximadamente $15 \times 2,5 = 37,5$ veces.

Ensayo de médula Ósea

Los efectos de añadir preparaciones de "AT"405 o "AT"407 al ensayo de médula ósea murina se mostraban en la Figura 24. Las IC₅₀s para "AT"405 y "AT"407 eran 2,15 µg/ml (14,4 nM) y 1,85 µg/ml (12,5 nM), respectivamente,

40 (PM = 150.000). Un anticuerpo policlonal anti-OPGbp de rata inhibía la formación de TRAP con una IC₅₀ a ~50 ng/ml.

En un experimento separado, se probó "AT"406 en el ensayo de cocultivo de médula ósea e inhibía la formación de TRAP con una IC₅₀ de 2,35 µg/ml (14,4 nM) suponiendo un peso molecular del anticuerpo de 150.000 (véase la

45 Figura 25).

La diferencia en IC50 en el ensayo de médula ósea para el fragmento Fab "AT" era aproximadamente 50 nM en comparación con aproximadamente 13 nM para anticuerpo "AT" de longitud completa, o un incremento de aproximadamente 3,85 veces. Teniendo en cuenta las diferencias en las concentraciones de OPGbp en los dos experimentos ($50 \text{ nM} / 9 \text{ nM} = 5,55$ veces), el aumento aproximado en la avidéz de la función celular procedente del anticuerpo "AT" de longitud completa era aproximadamente $3,85 \times 5,55 = 21,4$ veces.

ADNsc que codifican Fabs "Y", "P" y "S" también se fusionaron a secuencias de IgG1 CH1, CH2 y CH3 humanas según se describe en el Ejemplo 7 y se transfectaron en células CHO. Los anticuerpos resultantes se expresaron y se purificaron de medio acondicionado y la endotoxina se retiró como anteriormente. Los anticuerpos de la cadena ligera "S" e "Y" (denominados "S Ligero" e "Y Ligero") se probaron en el ensayo de médula ósea y los resultados se muestran en la Figura 26. Los anticuerpos "S ligero" e "Y ligero" se expresaban usando las correspondientes secuencias líder de cadena ligera y se denominaban "S" 435 y "Y" 429, respectivamente. El "Y" 429 ("Y Ligero") tenía una IC50 de 23 $\mu\text{g/ml}$ o 154 nM. "S" 435 ("S Ligero") no exhibía una avidéz suficiente para una determinación de una IC50.

La "Y Campath" y "P Ligero" eran la secuencia de Hu-IgG1 "Y" y "P", respectivamente, con la secuencia líder procedente de la cadena "Campath" y "Ligera", y se denominaban "Y" 442 y "P" 444, respectivamente. La "Y" 442 ("Y Campath") tenía una IC50 de 20 $\mu\text{g/ml}$ o 134 nM. "P" 444 ("P Ligero") no mostraba actividad detectable (véase la Figura 27).

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

Ejemplo 10

Identificación de un Epitopo para el Anticuerpo "AT" sobre OPGbp

Producción de OPGbp murina variante

Se produjo OPGbp[143-317] humana según se describe en el Ejemplo 1. OPGbp[158-316] murina que contiene los residuos de aminoácido 158 a 316 según se muestra en la Figura 1 del documento PCT WO98/46751 precedidos por un residuo de metionina N-terminal introducido se produjo en *E. coli* y se purificó a partir de la fracción soluble de bacterias según se describe previamente (Lacey y cols. Cell 93, 165-176 (1998)). Se generó FLAG-OPGbp[158-316] murina mediante la introducción de residuos de ácido nucleico que codifican una metionina N-terminal seguido por una secuencia de etiqueta de FLAG (DYKDDDDKKL (SEQ ID NO: 99)) fusionada al extremo N de los residuos 158-316 que se muestran en la Figura 1 del documento PCT WO98/46751 usando métodos conocidos por un experto en la especialidad. La molécula de FLAG-OPGbp[158-316] se clonó en el vector de expresión bacteriano pAMG21 (depositado en the American Type Culture Collection y teniendo el n° de registro 98113).

Se construyó una variante de FLAG-polipéptido de OPGbp[158-316] murina en la que los residuos de aminoácido SVPTD en las posiciones 229-233 inclusive según se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) del documento WO98/46751 se sustituían por los correspondientes residuos de aminoácido DLATE en las posiciones 230-234 inclusive según se muestra en la Figura 4 (SEQ ID NO: 3) del documento WO98/46751. La construcción resultante denominada "FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE" tiene la secuencia de ácido nucleico y proteína que se muestra en la Figura 28. Los cambios en la secuencia de aminoácidos se sitúan en una región de OPGbp entre las regiones D y E. La Figura 29 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos murina, humana y variante DE murina en esta región. Los cambios de secuencia en la variante murina son S229D, V230L, P231A y D233E con la T en la posición 234 inalterada. Las secuencias de flanco en esta región son virtualmente idénticas entre OPGbp murina y humana.

Esta molécula se construyó usando una reacción PCR en dos etapas en la que la primera etapa contenía dos reacciones PCR separadas, denominadas reacción A y reacción B. Tanto para la reacción A como para la reacción B, se usó ADN de pAMG21-FLAG-OPGbp[158-316] murina como una plantilla para la PCR. La reacción A empleaba los oligonucleótidos n° 2640-90 y n° 2640-91 para la PCR, mientras que la reacción B empleaba los oligonucleótidos n° 2640-92 y 2640-93. Se realizó termociclación y los productos de PCR procedentes de las reacciones A y B se purificaron a partir de gel de agarosa usando métodos disponibles para el experto en la especialidad. La reacción de PCR de la segunda etapa, denominada reacción C, utilizaba los productos de PCR purificados de la reacción A y la reacción B como una plantilla y los oligonucleótidos n° 2640-90 y n° 2640-93 como cebadores. Después de la termociclación, el producto procedente de la reacción C se clonó en el vector de clonación pCRII-TOPO (Invitrogen) y se sometió a electroporación en células DH10b (Gibco) usando métodos proporcionados por el fabricante. Se seleccionaron clones y se confirmaron en secuencia verificando que las mutaciones introducidas daban como

resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos SVPTD en OPGbp[158-316] murina hasta DLATE. A continuación, el ADN de secuencia verificada se digirió con NdeI y XhoI, se purificó y se subclonó en el vector de expresión bacteriano pAMG21 dando lugar al plásmido pAMG21-FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE.

2640-90: CCTCTCATATGGACTACAAGGAC (SEQ ID NO: 100)

5 2640-91: AGTAGCCAGGTCTCCCGATGTTTCATGATG (SEQ ID NO: 101)

2640-92: CTGGCTACTGAATATCTTCAGCTGATGGTG (SEQ ID NO: 102)

2640-93: CCTCTCCTCGAGTTAGTCTATGTCC (SEQ ID NO: 103)

10 Hospedador de *E. coli* GM94 (depositado en the American Type Culture Collection bajo el número de registro 202173) que contenía plásmido pAMG21-FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE se hizo crecer en medio 2XYT hasta una fase de crecimiento exponencial y se indujo para expresar la proteína de FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE mediante la adición de autoinductor sintético de *V. fischeri* hasta 100 ng/ml. Aproximadamente 3-6 horas después de la inducción, las células se nodulizaron y la proteína de FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE recombinante se purificó a partir de la fracción soluble de *E. coli* usando métodos descritos en Lacey y cols. *ibid*.

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

15 Placas Costar E.I.A./R.I.A. (fondo plano, alta unión, nº Cat. 3590) se revistieron con 100 µl/pocillo bien de proteína de OPGbp[143-317] humana, bien de proteína de OPGbp[158-316] murina o bien de proteína de FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE en 3 µg/ml en PBS, durante la noche a 4°C con agitación. Después de la incubación durante la noche, las soluciones de proteína se retiraron de la placa y se añadieron a cada pocillo de la placa 200 µl suero de pollo al 5% (Gibco/BRL nº cat 16110-082) en PBST (PBS más Tween 20 al 0,05%) y las placas se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 90 min con agitación. Después de la incubación y el bloqueo, las placas se lavaron 4 veces con 1X solución de lavado K-P en dH₂O (nº cat 50-63-00, Kirkegaard & Perry Laboratories) y se secaron. Anticuerpo "AT" purificado o proteína de OPG [22-194]-Fc humana se diluyó en serie 1:1 desde 2 µg/ml hasta 1,953 ng/ml en PBST y se añadieron 100 µl/pocillo a los pocillos apropiados de la placa de microvaloración revestida con proteína bien de OPGbp[143-317] humana, bien de OPGbp[158-316] murina o bien de FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE. Las placas se incubaron durante tres horas a temperatura ambiente con agitación, se lavaron cuatro veces con 1X solución de lavado K-P y se secaron. Anti-(IgG (Fc) humana) caprino (Jackson ImmunoResearch, nº cat 109-036-098) se diluyó 1:5000 en suero de pollo al 5% en PBST y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1,25 horas a temperatura ambiente con agitación, se lavaron seis veces con 1X solución de lavado K-P y se secaron. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato de ABTS no diluido (Kirkegaard & Perry; nº cat 50-66-00) y el plato se incubó a temperatura ambiente hasta que se desarrollaba suficiente color verde azulado. El desarrollo del color se detuvo mediante la adición de 100 µl de SDS al 1%. La cuantificación del desarrollo del color se realizó usando un lector de placas de microvaloración con detección a 405 nm.

35 Los resultados del EIA se muestran en la Figura 30. El anticuerpo "AT" se une a OPGbp[143-317] humana pero no muestra unión detectable a OPGbp[158-316] murina a lo largo del intervalo de concentración de anticuerpo probado. Sin embargo, el anticuerpo "AT" se une tanto a FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE como a OPGbp[143-317] humana bajo las condiciones de ensayo anteriores. Se concluía que los cambios de aminoácido en OPGbp[158-316] murina/DE en comparación con OPGbp[158-316] murina estaban implicados en la unión de anticuerpo "AT".

40 La FLAG-OPGbp[158-316] murina/DE se ensayó con respecto a la actividad en un ensayo con células RAW según se describe en el Ejemplo 1 y se observa que tiene una ED₅₀ similar para la formación de osteoclastos que OPGbp[143-317] humana, indicando que la variante DE es activa para promover la actividad de osteoclastos *in vitro*. Por lo tanto, es probable que la unión de anticuerpo "AT" a OPGbp[158-316] murina/DE inhiba la formación de osteoclastos.

45 El epítipo del anticuerpo "AT" está situado en una región de OPGbp humana que incluyen al menos los residuos de aminoácido DLATE (residuos 230 a 234 de OPGbp humana según se muestra en la Figura 4 del documento PCT WO98/46751).

Ejemplo 11

Construcción de Variantes de Fab y Anticuerpo "AT"

Se usaron tres enfoques para generar variantes de CDR del anticuerpo "AT": mutagénesis por barrido de alanina de la región CDR3 de la cadena pesada, mutagénesis por sustitución de sitios seleccionados en la región CDR3 de la cadena pesada y mutagénesis de inserción en la región CDR3 de la cadena ligera.

Variantes de alanina de CDR3 de la cadena pesada

Se realizó mutagénesis de barrido de alanina sobre la región CDR3 de la cadena pesada de AT. La secuencia de aminoácidos usada para el barrido de alanina era:

DSSNMVRGIIIAYYFDY (SEQ ID NO: 104)

Los cebadores 12 y 15 se renaturalizaron mutuamente y se extendieron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bajo las siguientes condiciones: 25 pmol de cada cebador, 6 ciclos de 30 s a 94°, 2 min a 55°, 20 s a 74°.

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)

El producto de PCR de esta reacción se denomina Plantilla A.

La Plantilla A se extendió mediante PCR usando los cebadores 11 y 14 bajo las siguientes condiciones: 0,5 microlitros de plantilla A, 10 pmol de cada cebador, 15 ciclos de 30 s a 94°, 2 min a 43°, 20 s a 74°.

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 de PCR de esta reacción se denomina Plantilla B.

A continuación, se generaron variantes de alanina de CDR3 usando la plantilla bien A o bien B. Se realizaron dos rondas de PCR (20 ciclos de 94°C durante 20 s y 74°C durante 40 s) usando un cebador que contiene el codón de alanina deseado. El cebador que contiene el codón de alanina estaba en la orientación directa para residuos de CDR3 (la numeración sigue el sistema de Kabat, véase Kabat y cols. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 4ª edición (1991)) D95, S96, V100, R100a. El cebador que contenía el codón de alanina estaba en la orientación inversa para los residuos S97, N98, M99, G100b, I100c, I100d, I100e, Y100g, Y100h, F100i, D101, Y102.

A continuación, las reacciones de mutagénesis fueron seguidas por hasta tres reacciones de extensión que usan seis cebadores comunes. Estas reacciones extendían el producto para abarcar toda la región CDR3 hasta e incluyendo los sitios de restricción de flanqueo únicos BglII y BstEII.

Cebadores para la sustitución de alanina se muestran posteriormente en la orientación 5' a 3'. El codón de alanina se muestra 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 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 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
5 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
10 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)

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

15 Los seis cebadores comunes para la PCR de extensión se muestran posteriormente. Las secuencias de los sitios
BglII (cadena superior) y BstEII (cadena inferior) de flanqueo se muestran en negrita.

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 CCG GGA ATT ATT ATA
GCG (SEQ ID NO: 127)

Cebadores comunes inversos

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 La siguiente tabla muestra la plantilla y los pares de cebadores de partida usados secuencialmente para construir fragmentos de ADN sintéticos que contienen residuos de alanina sustituidos.

TABLA III

Reacciones de PCR					
Residuo de CDR	Plantilla	Par de Cebadores 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 usados para el barrido de alanina, las condiciones de PCR eran 20 ciclos a 94°C durante 20 s, a continuación 74°C durante 40 s. Para reacciones de extensión con el par de cebadores 10 + 15, las condiciones eran 20-25 ciclos de 94°C durante 20 s, 42° durante 1 min 30 s, 74°C durante 20 s. Para reacciones de extensión con el par de cebadores 10 + 14, las condiciones eran 20-25 ciclos de 94°C durante 20 s, 48-50° durante 1 min 30 s, 74°C durante 20 s. Para reacciones de extensión con el par de cebadores 10 + 13, las condiciones eran 20-25 ciclos de 94°C durante 20 s, 64° durante 1 min 30 s, 74°C durante 20 s. Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción BglII y BstEII y se clonaron en FabAT que se había digerido con BglII y BstEII, reemplazando de ese modo la CDR3 de AT por la CDR3 con alanina sustituida. Las construcciones con alanina sustituida se verificaron mediante secuenciación de ADN.
- 15

Variantes de sustitución de CDR3 de la cadena pesada

- 20 Una estrategia similar a la usada para la mutagénesis de barrido de alanina se utilizó para la aleatorización de las posiciones S96, S97 y N98 de la CDR3 de la cadena pesada de "AT". Las Plantillas A y B se generaron según se describe previamente. Las posiciones 96, 97 y 98 se aleatorizaron con un conjunto de cuatro cebadores para cada posición. Las posiciones entre paréntesis tienen nucleótidos variables según se indica.

Para la posición S96.

23) 5' AAT AAT TCC CCG AAC CAT ATT TGA G(AT) (ACGT) ATC

- 25 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)

Para la posición S97

5 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

10 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)

15 Se realizaron reacciones de PCR usando el cebador de aleatorización inverso y el cebador 10. El producto
resultante se extendió mediante cuatro reacciones de PCR secuenciales usando los pares de cebadores 10 + 15, 10
+ 14, 10 + 13 y 10 + 22. El extremo 5' de la región variable de la cadena pesada de "AT" se amplificó a partir de un
clon de longitud completa de la región variable de la cadena pesada de "AT" usando los cebadores 16 y 72. Todos
los productos de PCR se purificaron en gel. Los productos de aleatorización se solaparon con el producto 16/72,
siendo los cebadores de flanco 16 y 22. A continuación, la región variable de longitud completa se clonó en un
20 vector que contiene la región constante de IgG1 como un fragmento HindIII/BsmBI. Se seleccionaron clones de
anticuerpo de longitud completa mediante secuenciación.

Los cebadores usaban la PCR de solapamiento para mutantes de aleatorización.

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)

Las variantes S96A, S97A y N98A se convirtieron de Fabs en anticuerpos de longitud completa mediante amplificación por PCR del clon de Fab que tiene la secuencia de señalización bacteriana reemplazada por una secuencia de señalización de mamífero. Se usó como plantilla ADN plasmídico procedente del Fab que contenía la mutación deseada. Los pares de cebadores secuenciales usados eran 21 + 22, 98 + 22 y 16 + 22. Los clones correctos se seleccionaron mediante análisis de la secuencia de ADN.

Se generaron múltiples variantes de alanina (S96A, S97A; S96A, N98A; S97A, N98A y S96A, S97A y N98A) usando como plantilla el plásmido de IgG1 de longitud completa de la cadena pesada AT convertido. Se llevó a cabo una reacción de PCR inicial con uno de los cebadores listados posteriormente y el cebador 22. A continuación, estos productos se extendieron usando los pares de cebadores 10 + 22. A continuación, ese producto se solapó con el producto 16/72 usando los cebadores de flanqueo 16 y 22 y se clonó en la región constante de IgG1 como anteriormente. Los clones correctos se seleccionaron mediante el análisis de la 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 la cadena ligera

La CDR3 de la cadena ligera de AT contiene un bucle de cinco aminoácidos que tiene la secuencia QHTRA (SEQ ID NO: 09). Se construyeron variantes de secuencia de CDR3 de la cadena ligera como sigue. Se usaron los siguientes cebadores para PCR usando un plásmido que contenía como una plantilla ADNc de la cadena ligera de Fab "AT":

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

donde (ACGT) indica cuatro bases mixtas en esta posición.

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

El producto de PCR resultante tenía una secuencia del bucle de CDR3 incrementada de cinco a nueve aminoácidos y cambiaba de QHTRA a GHTXAAAARA donde X puede ser cualquier aminoácido. El clon AT se digirió con digestión con HincII y Ascl y la región CDR3 de la cadena ligera de "AT" se reemplazó por la secuencia variante. Se aislaron clones que contenían los veinte residuos de aminoácido en la posición X junto con tres residuos de alanina insertados en el bucle de CDR3 y su identidad se confirmó mediante secuenciación de ADN.

Purificación de Variantes de Fab

Se produjeron variantes de sustitución de alanina de CDR3 de la cadena pesada y variantes de inserción de CDR3 de la cadena ligera y se purificaron como fragmentos Fab mediante el siguiente procedimiento. Cada variante se hizo crecer en 50 ml de 2XYT con glucosa al 2% y 100 µg/ml de ampicilina mientras se removía a 37°C hasta una OD₆₀₀ de 0,8-1,0. A continuación, cada cultivo se centrifugó y se resuspendió en 50 ml de 2XYT con 100 µg/ml de ampicilina con IPTG 1 mM a 30°C para inducir la producción de Fabs solubles. A continuación, los Fabs solubles se hicieron migrar a la zona periplásmica y se concentraron durante la noche para la liberación mediante choque osmótico. El choque osmótico se llevó a cabo al lavar las células con solución de sacarosa 0,5 M fría en tampón de Tris y EDTA para romper la pared celular bacteriana y a continuación diluirlas rápidamente en solución fría de baja fuerza osmótica. Los Fabs solubles liberados se purificaron en una cromatografía de afinidad a metal TALON a través de residuos etiquetados con 6X His sobre el Fab expresado. Las impurezas se retiraron por lavado con NaCl y concentraciones de imidazol inferiores antes de eluir la proteína mediante imidazol. La expresión y la purificación de cada mutante se analizó mediante transferencias Western reductora, no reductora y anti-His. La concentración de proteína total se determinó mediante A₂₈₀.

Ejemplo 12

Análisis por BIAcore de variantes de "AT"

La constante de unión (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_a) y la constante de velocidad de disociación (k_d) para las variantes de anticuerpo "AT" y la constante de velocidad de disociación (K_d) para variantes de Fab "AT" se determinaron mediante técnicas de resonancia plasmónica superficial (BIAcore) usando OPGbp [143-317] inmovilizada. Los resultados se muestran en las Tablas IV - VIII. Las variantes de CDR3 de la cadena ligera descritas en el Ejemplo 11 no demostraban unión detectable.

TABLA IV

Análisis por BIAcore de Fabs "AT" a partir de Mutagénesis por Barrido de Alanina de CDR3 de la Cadena Pesada

	K _d (s ⁻¹)
AT (Alaninas no sustituidas)	0,284
D95A	Unión indetectable
S96A	7,20x10 ⁻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	7,40x10 ⁻²
Y(100h)A	0,368
F(100i)A	0,251

	K _d (s ⁻¹)
D110A	0,127
Y111A	0,414

5

5

TABLA V
Análisis por BIAcore de Abs "AT" a partir de Mutagénesis por Barrido de Alanina de CDR3 de la Cadena Pesada

	K _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (s ⁻¹)	K _D (nM)
AT	1,70x10 ⁶	2,00x10 ⁻³	1,18
S96A	2,60x10 ⁵	6,40x10 ⁻⁴	2,50
S97A	5,30x10 ⁵	1,50x10 ⁻³	2,90
N98A	1,30x10 ⁶	9,00x10 ⁻⁴	0,67
S96A, S97A	3,17x10 ⁵	2,84x10 ⁻³	8,90
S97A, N98A			Unión indetectable
S96A, S97A, N98A			Unión indetectable
S96A, N98A			Unión indetectable

TABLA VI
Análisis por BIAcore de Abs "AT" Sustituídos en S96 de CDR3 de la Cadena Pesada

	K _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (s ⁻¹)	K _D (nM)
S96F	3,17x10 ⁵	2,68x10 ⁻³	8,45
S96Q	1,16x10 ⁶	3,59x10 ⁻³	3,09
S96M	3,57x10 ⁶	8,70x10 ⁻³	2,43
S96V	5,37x10 ⁶	1,21x10 ⁻²	2,25
S96I	2,99x10 ⁶	4,66x10 ⁻³	1,56
S96N	1,40x10 ⁶	2,15x10 ⁻³	1,53
S96P	1,45x10 ⁶	1,88x10 ⁻³	1,29
S96W	1,61x10 ⁶	2,03x10 ⁻³	1,26
S96T	3,14x10 ⁶	1,67x10 ⁻³	0,53
S96D	2,28x10 ⁶	1,18x10 ⁻³	0,51
S96R	6,97x10 ⁶	2,62x10 ⁻³	0,38
S96E	2,54x10 ⁶	9,01x10 ⁻⁴	0,35
S96K	4,55x10 ⁶	1,41x10 ⁻³	0,31
S96L	5,84x10 ⁶	1,75x10 ⁻³	0,30
S96H	4,12x10 ⁶	7,64x10 ⁻³	1,86
S96G	3,87x10 ⁶	1,50x10 ⁻²	3,85
S96Y	2,75x10 ⁶	1,85x10 ⁻³	0,67

TABLA VII
Análisis por BIAcore de Abs "AT" Sustituídos en S97 de CDR3 de la Cadena Pesada

	K _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (s ⁻¹)	K _D (nM)
S97F			Unión indetectable
S97Y			Unión indetectable
S97G			Unión indetectable
S97W			Unión indetectable
S97D			Unión indetectable
S97E	Asociación rápida	Disociación rápida	1940
S97R	4,09x10 ⁶	1,18x10 ⁻¹	28,90
S97P	1,10x10 ⁶	2,69x10 ⁻²	24,50

	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
S97M	$2,33 \times 10^6$	$2,90 \times 10^{-2}$	12,40
S97Q	$7,30 \times 10^5$	$5,98 \times 10^{-3}$	8,19
S97N	$8,95 \times 10^5$	$4,11 \times 10^{-3}$	4,59
S97H	$8,39 \times 10^5$	$2,48 \times 10^{-3}$	3,00
S97T	$4,63 \times 10^5$	$1,16 \times 10^{-3}$	2,51
S97V	$3,04 \times 10^6$	$3,58 \times 10^{-3}$	1,18
S97L	$7,50 \times 10^5$	$6,90 \times 10^{-4}$	0,92
S97I	$2,10 \times 10^6$	$1,80 \times 10^{-3}$	0,87
S97K	$1,45 \times 10^7$	$5,78 \times 10^{-3}$	0,40

TABLA VIII
Análisis por BIAcore de Abs "AT" Sustituídos en N98 de CDR3 de la Cadena Pesada

	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
N98K			Unión indetectable
N98F	$3,70 \times 10^3$	$9,90 \times 10^{-2}$	26600
N98Y	$2,72 \times 10^5$	$1,12 \times 10^{-2}$	41,30
N98M	$2,96 \times 10^6$	$8,14 \times 10^{-2}$	27,50
N98T	$2,46 \times 10^5$	$6,62 \times 10^{-2}$	26,90
N98G	$2,30 \times 10^5$	$5,59 \times 10^{-3}$	24,30
N98I	$5,68 \times 10^5$	$4,36 \times 10^{-3}$	7,60
N98W	$2,62 \times 10^6$	$7,68 \times 10^{-3}$	2,93
N98E	$2,72 \times 10^6$	$3,59 \times 10^{-3}$	1,32
N98P	$1,51 \times 10^6$	$1,71 \times 10^{-3}$	1,13
N98H	$2,20 \times 10^6$	$2,34 \times 10^{-3}$	1,06
N98L	$1,48 \times 10^6$	$1,22 \times 10^{-3}$	0,82
N98Q	$1,86 \times 10^6$	$1,51 \times 10^{-3}$	0,81
N98S	$2,67 \times 10^6$	$1,54 \times 10^{-3}$	0,58
N98D	$6,85 \times 10^6$	$3,12 \times 10^{-3}$	0,46
N98V	$4,56 \times 10^5$	$1,97 \times 10^{-4}$	0,43
N98R	$3,59 \times 10^6$	$1,08 \times 10^{-3}$	0,30

5 Aunque la presente invención se ha descrito en cuanto a realizaciones preferidas, se entiende que los expertos en la especialidad estarán al tanto de variaciones y modificaciones.

Listado de secuencias

<110> Amgen Inc.

<120> AGENTES DE UNIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNA QUE SE UNE A OSTEOPROTEGERINA

<130> EP25150IVHV015pau

5 <140> no asignada todavía

< 141> 2008-06-16

<150> 01911158.2

< 151> 2001-02-23

<150> PCT/US01/05973

10 < 151> 2001-02-23

<150> 09/791.153

< 151> 2001-02-22

<150> 09/511.139

< 151> 2000-02-23

15 <160> 155

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 11

< 212> PRT

20 < 213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

< 211> 11

25 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

< 211> 12

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4

< 211> 9

10 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr
1 5

<210> 5

15 < 211> 7

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

20 <210> 6

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 6

25 Asp Ala Thr Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 7

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 7

5 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 8

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10 <400> 8

 Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 9

< 211> 5

< 212> PRT

15 < 213> Homo sapiens

 <400> 9

 Gln His Thr Arg Ala
 1 5

<210> 10

< 211> 5

20 < 212> PRT

 < 213> Homo sapiens

 <400> 10

 Gln His Arg Arg Thr
 1 5

<210> 11

25 < 211> 5

 < 212> PRT

 < 213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Gln Tyr Gly Ala
1 5

<210> 12

< 211> 11

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Ser Thr Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Val Val
1 5 10

<210> 13

10 < 211> 5

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 13

Asn Tyr Ala Ile His
1 5

15 <210> 14

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 14

20 Asn Tyr Pro Met His
1 5

<210> 15

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

25 <400> 15

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 16

< 211> 17

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 16

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

Gly

<210> 17

< 211> 17

10 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 17

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

Gly

<210> 18

15 < 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 18

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

Gly

20 <210> 19

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

ES 2 758 881 T3

<400> 19

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

Tyr

<210> 20

< 211> 7

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 21

10 < 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 21

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

15 <210> 22

< 211> 18

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 22

20 ccgactttgc acctagtt 18

<210> 23

< 211> 24

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

25 <400> 23

tttgtgtct ttccagacgt tagt 24

ES 2 758 881 T3

<210> 24

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5 <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

<210> 25

< 211> 19

< 212> PRT

10 < 213> Homo sapiens

<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

15 <210> 26

< 211> 45

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

20 < 221> CDS

< 222> (18)..(44)

<400> 26

cagaagctta gaccacc atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc t 45
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe
1 5

<210> 27

ES 2 758 881 T3

 $\langle 211 \rangle_9$

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 27

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe
5 1 5

<210> 28

< 211 > 45

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

10 <220>

< 221> CDS

< 222> (2)..(43)

<400> 28

g agc tgg gtc ttt ctc ttc ttc ctg tca gta acg act ggt gtc ca 45
Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly Val
1 5 10

15 <210> 29

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly Val
20 1 5 10

$\langle 210 \rangle$ 30

< 211 > 42

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

25 $\langle 220 \rangle$

< 221> CDS

< 222> (1)..(42)

<400> 30

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	

<210> 31

< 211> 14

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 31

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

<210> 32

10 < 211> 30

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 32

gtggaggcac tagagacggt gaccaggggtg	30
-----------------------------------	----

15 <210> 33

< 211> 22

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 33

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

<210> 34

< 211> 48

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

25 <220>

ES 2 758 881 T3

< 221> CDS

< 222> (17)..(46)

<400> 34

```
cagaagcttg accacc atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg gg      48
                Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu
                  1                5                10
```

5 <210> 35

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36

< 211> 48

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

15 <220>

< 221> CDS

< 222> (3)..(47)

<400> 36

```
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
```

20 <210> 37

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 37

```
Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg
25 1                5                10                15
```

<210> 38

< 211> 44

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

5 < 221> CDS

< 222> (2)..(43)

<400> 38

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						

<210> 39

10 < 211> 14

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 39

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

15 <210> 40

< 211> 32

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 40

20 ttggacgctc gacttattaa cactctcccc tg 32

<210> 41

< 211> 4

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

25 <400> 41

Cys	Glu	Gly	Arg
1			

<210> 42

ES 2 758 881 T3

< 211> 30

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

<210> 43

< 211> 645

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

10 <220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(645)

<400> 43

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

ES 2 758 881 T3

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

<210> 44

< 211> 215

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 44

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

ES 2 758 881 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

<210> 45

< 211> 645

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(645)

<400> 45

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	

10

```

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

```

<210> 46

< 211> 215

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 46

```

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

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

```

ES 2 758 881 T3

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> 47

< 211> 645

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(645)

<400> 47

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

48

10

```

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

ggt agc agc agc tcc tta gcc tgg tac cag cag aaa cct gcc 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 gcc 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
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210                     215

```

<210> 48

< 211> 215

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 48

```

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

```

ES 2 758 881 T3

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> 49

< 211> 654

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(654)

ES 2 758 881 T3

```

<400> 49
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

```

<210> 50

< 211> 218

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

ES 2 758 881 T3

<400> 50

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> 51

< 211> 690

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(690)

<400> 51

gcc cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly 1 5 10 15	48
gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac gac ttc agt aat Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Ser Asn 20 25 30	96
tat gct ata cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg Tyr Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp 35 40 45	144
atg gga tgg atc aac gct ggc aat ggg aac aca aaa ttt tca cag aag Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Phe Ser Gln Lys 50 55 60	192
ttc cag ggc aga atc acc gtt acc agg gac aca gcc gcg agc aca gcc Phe Gln Gly Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ala Ala Ser Thr Ala 65 70 75 80	240
tac atg gag ctg cgc agt ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 85 90 95	288
tgt gcg aga gat tcc tca aat atg gtt cgg gga att att ata gcg tac Cys Ala Arg Asp Ser Ser Asn Met Val Arg Gly Ile Ile Ile Ala Tyr 100 105 110	336
tat ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tca agc gcc Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala 115 120 125	384
tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser 130 135 140	432
acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe 145 150 155 160	480
ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly 165 170 175	528
gtc cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu 180 185 190	576
agc agc gta gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr 195 200 205	624
atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 210 215 220	672
gtt gag ccc aaa tct tgt Val Glu Pro Lys Ser Cys 225 230	690

5 <210> 52

< 211> 230

< 212> PRT

ES 2 758 881 T3

< 213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

5 <210> 53

< 211> 690

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(690)

5 <400> 53

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	

ES 2 758 881 T3

```

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> 54

< 211> 230

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 54

```

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
      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

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

```

ES 2 758 881 T3

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> 55

< 211> 660

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(660)

<400> 55

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

10

ES 2 758 881 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	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	

<210> 56

< 211> 220

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 56

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

ES 2 758 881 T3

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> 57

< 211> 681

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(681)

<400> 57

ES 2 758 881 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
          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
Lys Ser Cys
225

```

<210> 58

< 211> 227

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

ES 2 758 881 T3

<400> 58

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

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> 59

5 <211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 758 881 T3

<400> 59

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				

<210> 60

5 <211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

ES 2 758 881 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> 61

< 211> 126

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

ES 2 758 881 T3

<400> 61

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

<210> 62

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 62

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

ES 2 758 881 T3

85

90

95

Ala Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 63

< 211> 116

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 63

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

<210> 64

< 211> 132

10 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 64

ES 2 758 881 T3

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

<210> 65

< 211> 123

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 65

ES 2 758 881 T3

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

<210> 66

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

ES 2 758 881 T3

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

<210> 67

< 211> 103

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 67

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

<210> 68

10 < 211> 107

ES 2 758 881 T3

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 68

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> 69

< 211> 103

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 69

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

10

ES 2 758 881 T3

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

<210> 70

< 211> 107

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 70

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> 71

< 211> 104

10 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 71

ES 2 758 881 T3

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> 72

< 211> 108

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 72

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> 73

ES 2 758 881 T3

< 211> 108

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 73

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

5 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 74

< 211> 522

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

10 <220>

< 221> CDS

< 222> (4)..(513)

<400> 74

ES 2 758 881 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

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> 75

<211> 170

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

ES 2 758 881 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

<210> 76

< 211> 39

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 76

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> 77

< 211> 39

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 77

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

5

<210> 78

< 211> 39

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 78

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> 79

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 79

Asp Leu Ala Thr Glu
1 5

<210> 80

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (1)..(1)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

5 <400> 80

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

Tyr

<210> 81

< 211> 17

< 212> PRT

10 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (2)..(2)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

15 <400> 81

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

Tyr

<210> 82

< 211> 17

< 212> PRT

20 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (3)..(3)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

25 <400> 82

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

Tyr

<210> 83

< 211> 17

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (4)..(4)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

10 <400> 83

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

Tyr

<210> 84

< 211> 17

< 212> PRT

15 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (5)..(5)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

20 <400> 84

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

Tyr

<210> 85

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

5 < 222> (6)..(6)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 85

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

Tyr

<210> 86

10 < 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

15 < 222> (7)..(7)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 86

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

Tyr

<210> 87

20 < 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

25 < 222> (8)..(8)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 87

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

Tyr

<210> 88

5 < 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

10 < 222> (9)..(9)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<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

15 < 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

20 < 222> (10)..(10)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 89

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

Tyr

<210> 90

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5 <220>

< 221> misc_feature

< 222> (11)..(11)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 90

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

10 Tyr

<210> 91

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

15 <220>

< 221> misc_feature

< 222> (12)..(12)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 91

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

20 Tyr

<210> 92

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

25 <220>

< 221> misc_feature

< 222> (13)..(13)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 92

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

5 Tyr

<210> 93

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10 <220>

< 221> misc_feature

< 222> (14)..(14)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 93

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

15 Tyr

<210> 94

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

20 <220>

< 221> misc_feature

< 222> (15)..(15)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 94

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

Tyr

<210> 95

< 211> 17

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (16)..(16)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

10 <400> 95

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

Tyr

<210> 96

< 211> 17

< 212> PRT

15 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (17)..(17)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

20 <400> 96

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

Xaa

<210> 97

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (4)..(4)

5 < 223> Xaa in position 4 es cualquier aminoácido distinto de arginina.

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (5)..(7)

< 223> Xaa en las posiciones 5 - 7 son cualquier aminoácido.

10 <400> 97

Gln His Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Ala
1 5

<210> 98

< 211> 9

< 212> PRT

15 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (4)..(4)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido distinto de arginina.

20 <400> 98

Gln His Thr Xaa Ala Ala Ala Arg Ala
1 5

<210> 99

< 211> 10

< 212> PRT

25 < 213> Homo sapiens

<400> 99

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu
1 5 10

<210> 100
 < 211> 23
 < 212> ADN
 < 213> Homo sapiens
 5 <400> 100
 cctctcatat ggactacaag gac 23
 <210> 101
 < 211> 30
 < 212> ADN
 10 < 213> Homo sapiens
 <400> 101
 agtagccagg tctcccgatg ttcatgatg 30
 <210> 102
 < 211> 30
 15 < 212> ADN
 < 213> Homo sapiens
 <400> 102
 ctggctactg aatatcttca gctgatggg 30
 <210> 103
 20 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Homo sapiens
 <400> 103
 cctctcctcg agttagtcta tgtcc 25
 25 <210> 104
 < 211> 17
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

ES 2 758 881 T3

<400> 104

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

Tyr

<210> 105

< 211> 39

5 < 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 105

agagattcct caaatatggt tcggggaatt attatagcg 39

<210> 106

10 < 211> 36

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 106

gtagtcaaaa tagtacgcta taataattcc ccgaac 36

15 <210> 107

< 211> 33

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 107

20 gtgtattact gtgcgagaga ttcctcaaat atg 33

<210> 108

< 211> 36

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

25 <400> 108

cagggtgccc tggccccagt agtcaaaata gtacgc 36

<210> 109

< 211> 39

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 109

5 gtgtattact gtgcgagagc ttctcaaat atggttcgg 39

<210> 110

< 211> 39

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

10 <400> 110

gtgtattact gtgcgagaga tgcctcaaat atggttcgg 39

<210> 111

< 211> 42

< 212> ADN

15 < 213> Homo sapiens

<400> 111

aataattccc cgaaccatat ttgcggaatc tctgcacag ta 42

<210> 112

< 211> 39

20 < 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 112

aataattccc cgaaccatag ctgaggaatc tctgcaca 39

<210> 113

25 < 211> 36

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 113

	aataattccc cgaacggcat ttgaggaatc tctcgc	36
	<210> 114	
	< 211> 36	
	< 212> ADN	
5	< 213> Homo sapiens	
	<400> 114	
	gattcctcaa atatggctcg gggaattatt atagcg	36
	<210> 115	
	< 211> 38	
10	< 212> ADN	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 115	
	gattcctcaa atatggttgc cggaattatt atagcgta	38
	<210> 116	
15	< 211> 45	
	< 212> ADN	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 116	
	gtagtcaaaa tagtacgcta taataattgc ccgaaccata ttga	45
20	<210> 117	
	< 211> 42	
	< 212> ADN	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 117	
25	gtagtcaaaa tagtacgcta taatggctcc ccgaaccata tt	42
	<210> 118	
	< 211> 39	
	< 212> ADN	

< 213> Homo sapiens

<400> 118

gtagtcaaaa tagtacgcta tggcaattcc ccgaaccat 39

<210> 119

5 < 211> 36

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 119

gtagtcaaaa tagtacgctg caataattcc ccgaac 36

10 <210> 120

< 211> 45

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 120

15 ggtgccctgg cccagtagt caaaataggc cgctataata attcc 45

<210> 121

< 211> 45

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

20 <400> 121

ggtgccctgg cccagtagt caaaagcgta cgctataata attcc 45

<210> 122

< 211> 42

< 212> ADN

25 < 213> Homo sapiens

<400> 122

caggggtgccc tggccccagt agtcagcata gtacgtata at 42

<210> 123

< 211> 39

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 123

5 cagggtgccc tggccccagt aggcaaaata gtacgctat 39

<210> 124

< 211> 39

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

10 <400> 124

cagggtgccc tggccccagg cgtcaaaata gtacgctat 39

<210> 125

< 211> 42

< 212> ADN

15 < 213> Homo sapiens

<400> 125

agtctgagat ctgaagacac ggctgtgtat tactgtgcga ga 42

<210> 126

< 211> 33

20 < 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 126

gtgtattact gtgcgagaga ttctcaa atg 33

<210> 127

25 < 211> 39

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 127

agagattcct caaatatggt tcggggaatt attatagcg 39

<210> 128

< 211> 32

< 212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<400> 128

cttgagacgg tgaccagggt gccctggccc ca 32

<210> 129

< 211> 36

10 < 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 129

cagggtgccc tggccccagt agtcaaaata gtacgc 36

<210> 130

15 < 211> 36

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 130

gtagtcaaaa tagtacgcta taataattcc ccgaac 36

20 <210> 131

< 211> 46

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 131

25 aataattccc cgaaccatat ttgagatacg tatctctgc acagta 46

<210> 132

< 211> 46

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 132

aataattccc cgaaccatat ttgagcgacg tatctctcgc acagta 46

<210> 133

5 < 211> 44

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 133

aataattccc cgaaccatat ttgactcgta tctctcgac agta 44

10 <210> 134

< 211> 44

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 134

15 aataattccc cgaaccatat ttgacacata tctctcgac agta 44

<210> 135

< 211> 46

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

20 <400> 135

aataattccc cgaaccatat tgatacgtgg aatctctcgc acagta 46

<210> 136

< 211> 46

< 212> ADN

25 < 213> Homo sapiens

<400> 136

aataattccc cgaaccatat tgcgacgtgg aatctctcgc acagta 46

<210> 137

< 211> 44

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 137

5 aataattccc cgaaccatat tctcgtggaa tctctcgac agta 44

<210> 138

< 211> 44

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

10 <400> 138

aataattccc cgaaccatat tcacatggaa tctctcgac agta 44

<210> 139

< 211> 43

< 212> ADN

15 < 213> Homo sapiens

<400> 139

aataattccc cgaaccatga tacgttgagg aatctctgc aca 43

<210> 140

< 211> 43

20 < 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 140

aataattccc cgaaccatgc gacgttgagg aatctctgc aca 43

<210> 141

25 < 211> 41

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 141

	aataattccc cgaaccatct cgttgaggaa tctctgcac a	41
	<210> 142	
	< 211> 41	
	< 212> ADN	
5	< 213> Homo sapiens	
	<400> 142	
	aataattccc cgaaccatca cattgaggaa tctctgcac a	41
	<210> 143	
	< 211> 42	
10	< 212> ADN	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 143	
	agtctgagat ctgaagacac ggctgtgtat tactgtgcga ga	42
	<210> 144	
15	< 211> 52	
	< 212> ADN	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 144	
	cagcagaagc ttagaccacc atggacatga ggggtcccccgc tcagctcctg gg	52
20	<210> 145	
	< 211> 36	
	< 212> ADN	
	< 213> Homo sapiens	
	<400> 145	
25	cacagccgtg tcttcagatc tcagactgcg cagctc	36
	<210> 146	
	< 211> 30	
	< 212> ADN	

< 213> Homo sapiens

<400> 146

gtggaggcac tagagacggt gaccaggggtg 30

<210> 147

5 < 211> 48

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 147

gtgtattact gtgcgagaga tgccgcaa atggttcggg gaattatt 48

10 <210> 148

< 211> 53

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 148

15 gtgtattact gtgcgagaga tgccgcagct atggttcggg gaattattat agc 53

<210> 149

< 211> 53

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

20 <400> 149

gtgtattact gtgcgagaga ttccgcagct atggttcggg gaattattat agc 53

<210> 150

< 211> 53

< 212> ADN

25 < 213> Homo sapiens

<400> 150

gtgtattact gtgcgagaga tgccgcagct atggttcggg gaattattat agc 53

<210> 151

< 211> 40

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 151

5 gtggttgaga ggtgccagat gtcaggcca gctggtgcag 40

<210> 152

< 211> 48

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

10 <400> 152

ccgctcagct cctggggctc ctgctattgt ggtgagagg tgccagat 48

<210> 153

< 211> 51

< 212> ADN

15 < 213> Homo sapiens

<400> 153

ccggtcaaca cactacgtac gtgtgcggcg gcgcgggcgt tcggccaagg g 51

<210> 154

< 211> 23

20 < 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 154

ccgggcgcgc ctattaaca ctc 23

<210> 155

25 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (4)..(4)

< 223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 155

	Gly	His	Thr	Xaa	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala
5	1				5				

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno
que comprende uno o más cambios de aminoácido en una o más de las CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo, en donde
- 5 a) la CDR1 de VL tiene la secuencia RASQISRYLN de SEQ ID NO: 01,
la CDR2 de VL tiene la secuencia GASSLQS de SEQ ID NO: 05 y
la CDR3 de VL tiene la secuencia QHTRA de SEQ ID NO: 09, y
b) la CDR1 de VH tiene la secuencia NYAIH de SEQ ID NO: 13,
- 10 la CDR2 de VH tiene la secuencia WINAGNGNTKFSQKFQG de SEQ ID NO: 16,
y la CDR3 de VH tiene la secuencia DSSNMVRGIIAYYFDY de SEQ ID NO: 19,
que se une a una porción de la secuencia de aminoácidos GGFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIP de SEQ ID NO: 76 desde el residuo de aminoácido 212 hasta el residuo de aminoácido 250 de OPGbp humana,
- 15 en donde el anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno inhibe la formación o la activación de osteoclastos mediada por OPGbp humana.
2. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según la reivindicación 1, que se une a la secuencia de aminoácidos DLATE dentro de SEQ ID NO: 76.
3. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según las reivindicaciones 1 o 2, que es un anticuerpo recombinante o uno de sus dominios que se unen a antígeno.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el uno o más cambios de aminoácido comprenden sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de residuos de aminoácido.
5. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo totalmente humano o uno de sus dominios que se unen a antígeno.
- 25 6. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un anticuerpo monocatenario o uno de sus dominios que se unen a antígeno.
7. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
8. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso en la inhibición de la formación o activación de osteoclastos.
- 30 9. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso en la inhibición de la resorción ósea.
10. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida de masa ósea.
- 35 11. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según la reivindicación 10, en donde la pérdida de masa ósea resulta de osteoporosis, metástasis de cáncer de huesos; artritis reumatoide, hipercalcemia maligna y osteoporosis inducida por esteroides.

12. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde se va a administrar además una composición que comprende al menos un agente contra la resorción ósea.
- 5 13. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según la reivindicación 12, en donde el agente contra la resorción ósea es estrógeno, un bisfosfonato o un modulador selectivo de receptores de estrógenos.
14. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde se va a administrar además una composición que comprende un agente anabolizante.
- 10 15. El anticuerpo monoclonal o uno de sus dominios que se unen a antígeno para el uso según la reivindicación 14, en donde el agente anabolizante es hormona paratiroidea o un complejo de factor de crecimiento insulinoide y proteína que se une a factor de crecimiento insulinoide.

Figura 1
ELISA en fagos

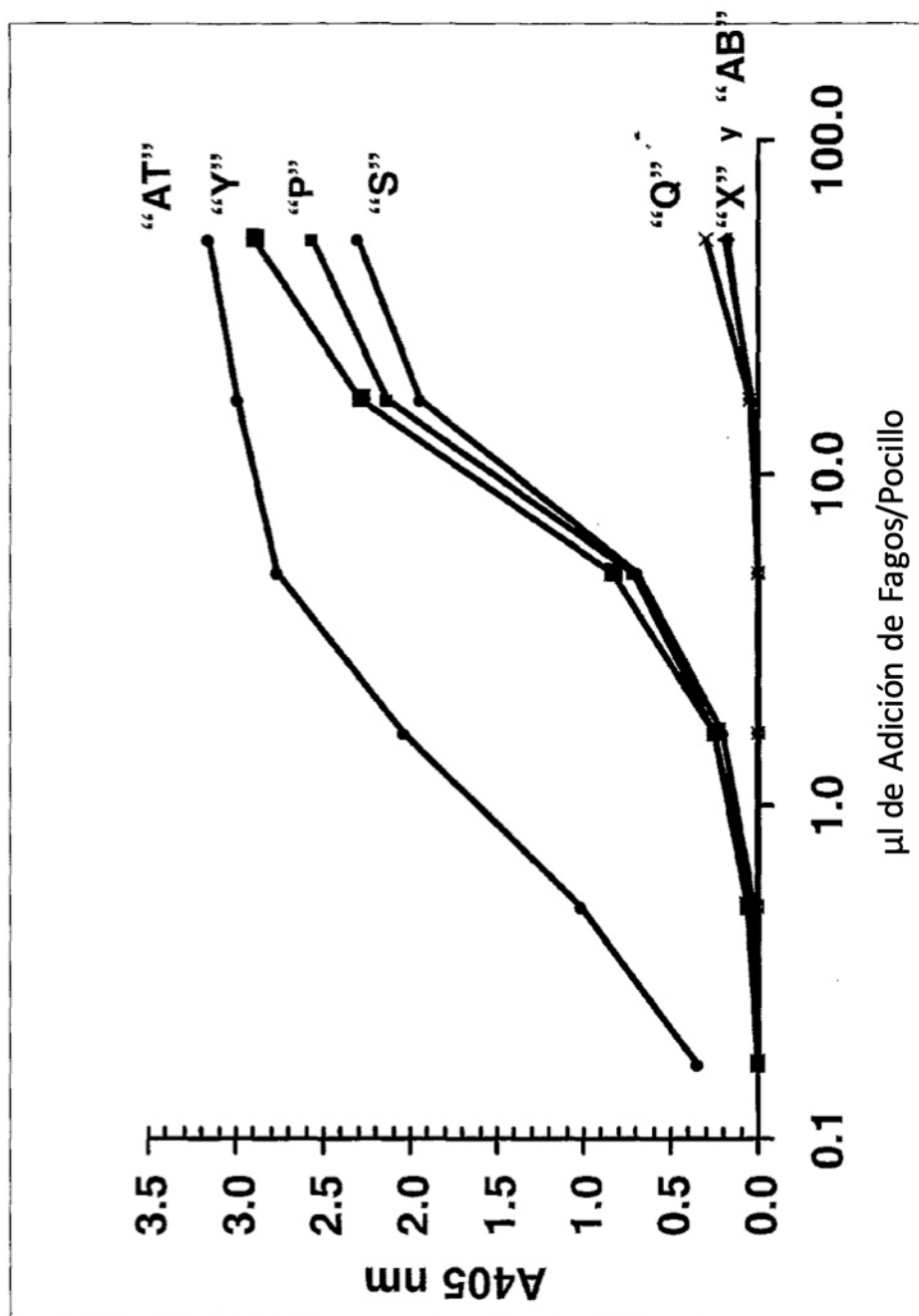


Figura 2
Inhibición de la Interacción OPGbp/ODAR por Fabs "AT" e "IY"

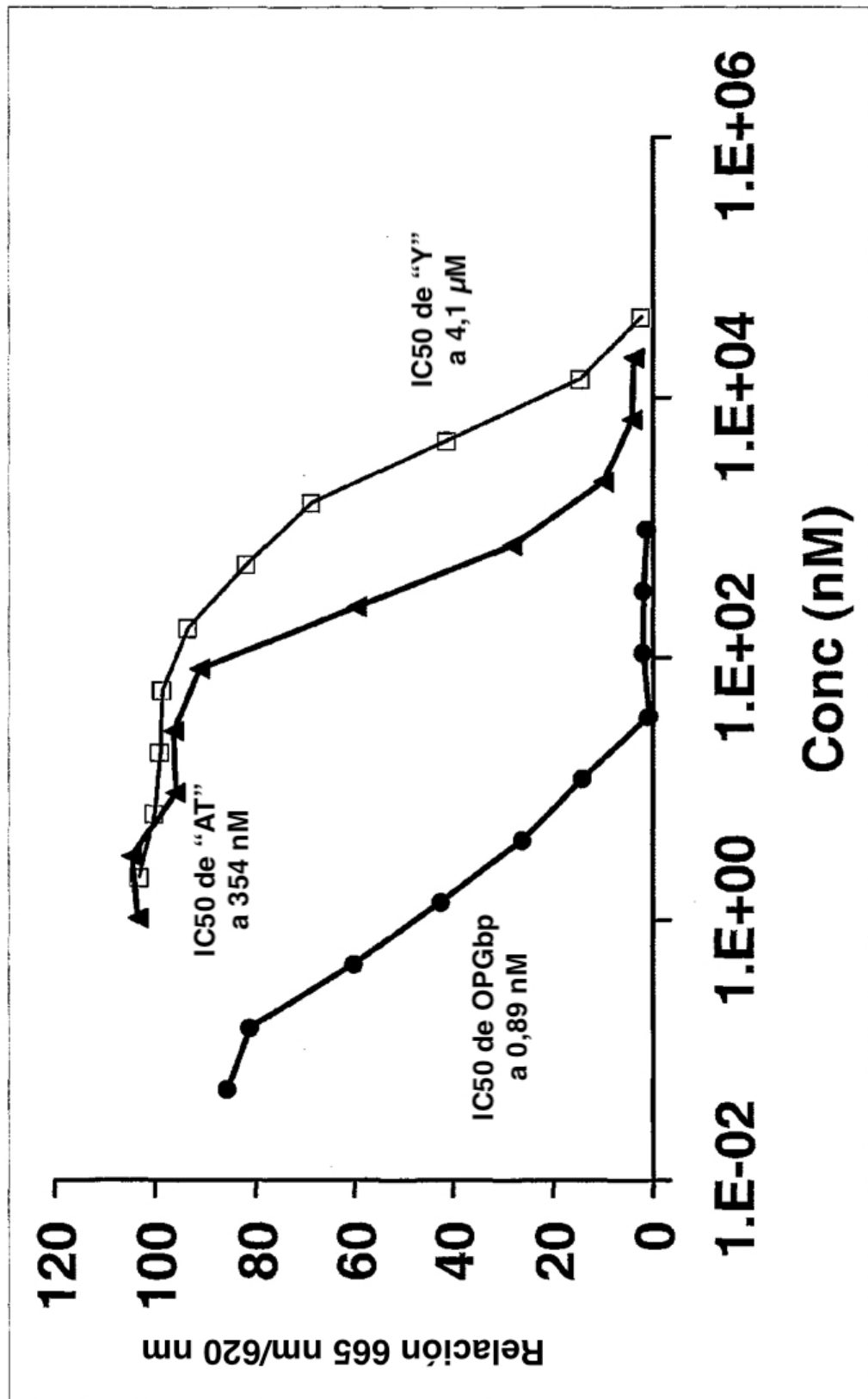


Figura 3
Ensayo en Médula Ósea
Fabs "AT" "Y" "P"

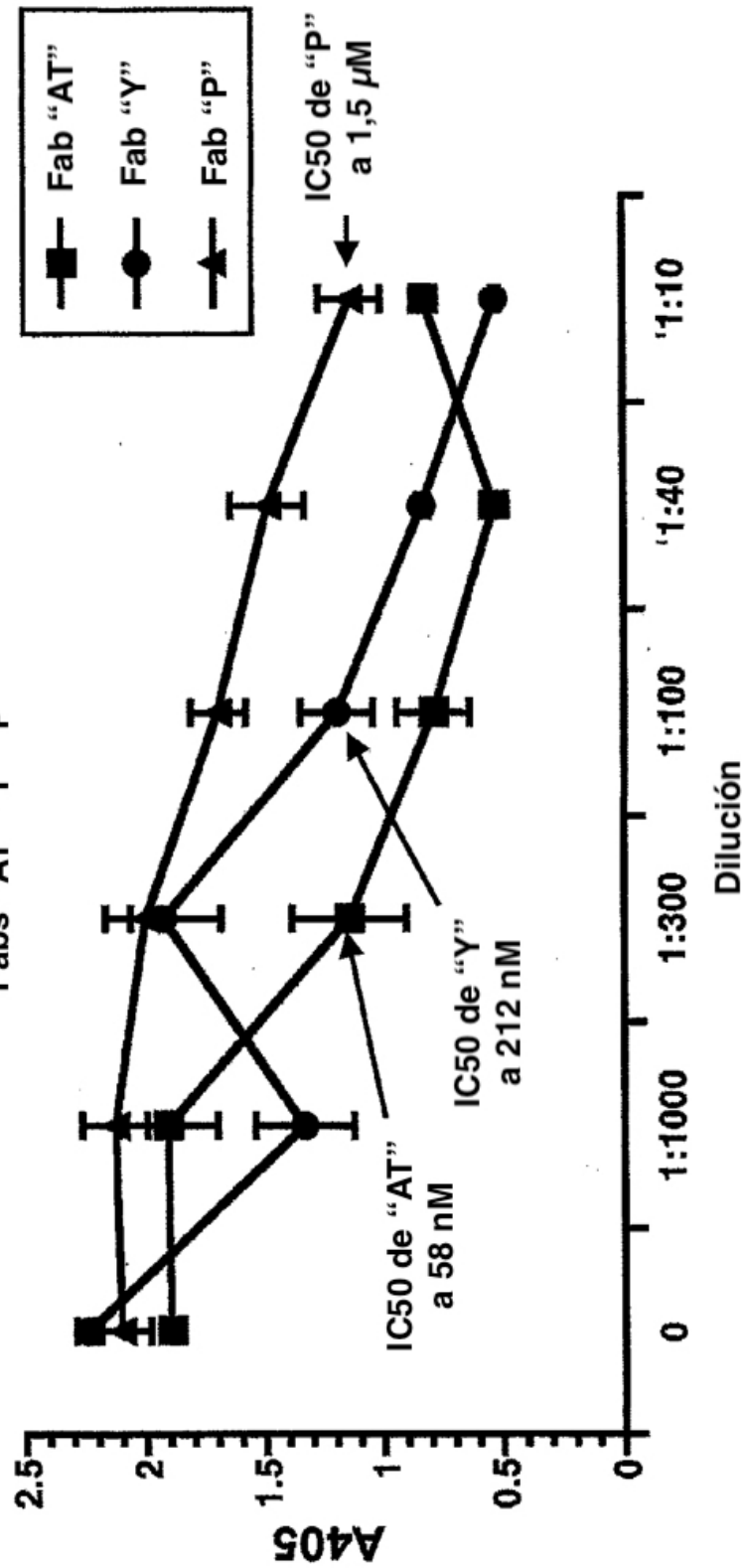


Figura 4
Bioensayo de Células Raw
Fabs "AT" "Y" y "P"

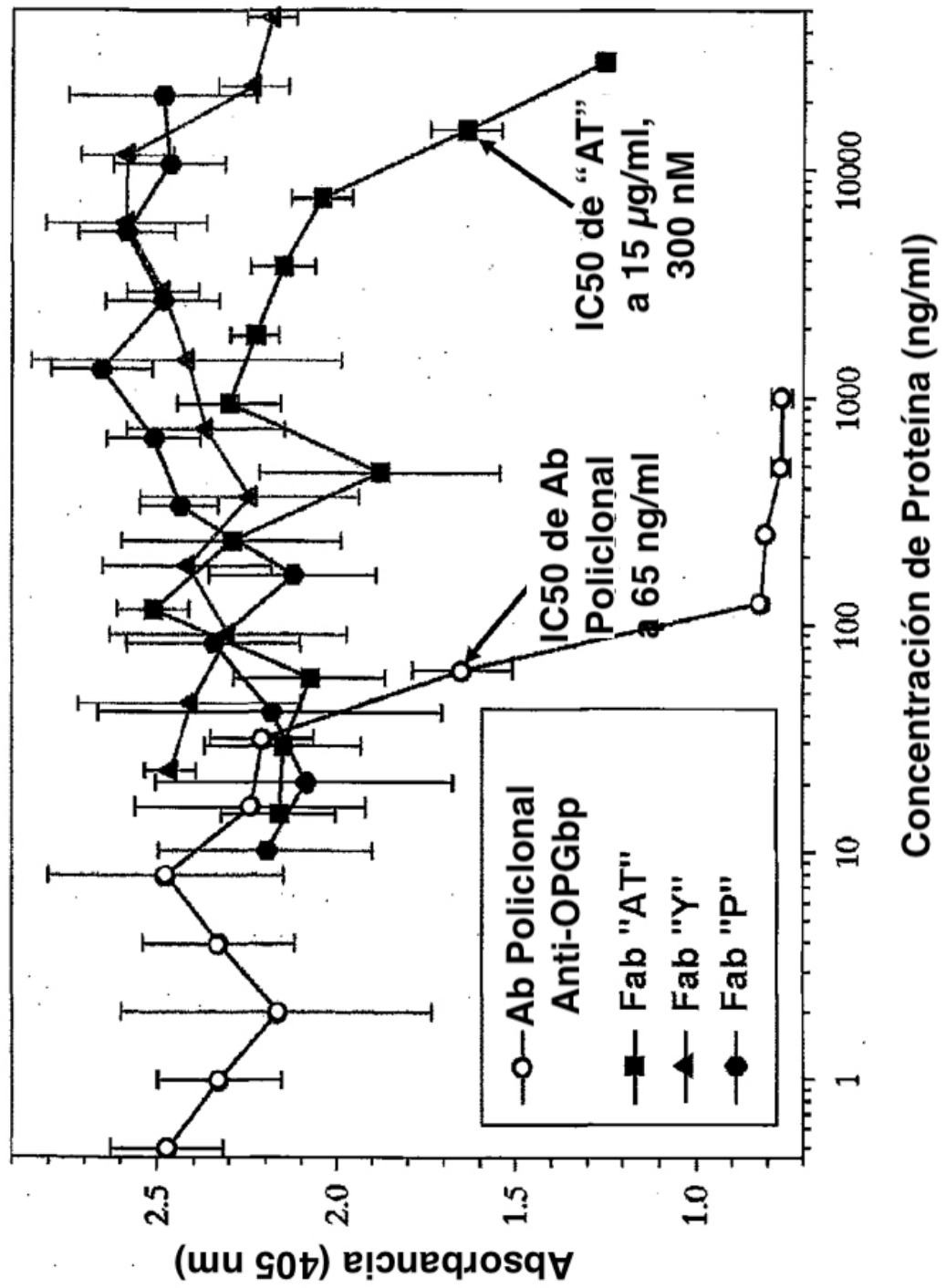


Figura 5

LIGERA AT

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 AGC CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC AGT TTC 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

LIGERA Y

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	TTT	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTT	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	TTT	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

LIGERA P

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

LIGERAS

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

PESADA AT

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 (cont)

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

PESADA Y

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 (cont)

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

PESADA P

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				
CTG	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

PESADA S

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	CAA	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 (cont)

PESADA AT

AAA TCT TGT
Lys Ser Cys
225

681

Figura 13
Comparación de Secuencias de Aminoácidos de Fab

Matriz de la Cadena Pesada de la Secuencia		Matriz de la Cadena Ligera de la Secuencia	
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 ---

SIMILITUD

Figura 14
Comparación de CDRs de Fab

Patrón	Cadena Pesada		
	CDR1	CDR2	CDR3
AT	NYAIIH	WINAGNGNTKFSQKFQG	DSSNMVIRGIIIAYYFDY
Y	NYAIIH	WINAGNGNTKFSQKFQG	DSSNMVIRGIIIAYYFDY
P	NYPMH	VISYDGNNKYYADSVKG	GGGGFDY
S	DYAMH	GISWNSGRIGYADSVKG	GGTSARYSSGWYY
Patrón	Cadena Ligera		
	CDR1	CDR2	CDR3
AT	RASQSI SRYLN	GASSLQS	QHTRA
Y	RASQSVGSYLA	DATNRAT	QHRRT
P	RASQSVSSSLA	GASSRAT	QQYGA
S	SGDALPKQY	EDSERPS	QSTDSSGTYVV

Figura 15
Clases de Fab

Patrón	Cadena Pesada			Cadena Ligera		
	Familia	V	D	J	Familia	V
AT	VH1	1-03	3-10	JH4b	Vk1	012/02
Y	VH1	1-03	3-10	JH4b	Vk3	L6
P	VH3	3-30	*	JH4b	Vk3	A27
S	VH3	3-09	6-19	JH4b	V_L3	**
						JL2/JL3

Figura 16

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE LA CADENA PESADA DE FABS "AT" E "Y" CON LA LÍNEA GERMINAL

H1												
FR1									CDR1		FR2	
1			2			3			4			
Locus	123456789012345678901234567890	1ab234567890123456789										
1-03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YAMHWVRQAPGQRLEWMG										
"AT"	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFS	N YAIHWVRQAPGQRLEWMG										
"Y"	EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYDFS	N YAIHWVRQAPGQRLEWMG										
H2												
CDR2						FR3						
5		6				7		8		9		
Locus	012abc3456789012345678901234567890123456789012abc345678901234	67890123456789012abc345678901234										
1-03	WINA--GNGNTKYSQKFQG	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR										
"AT"	WINA GNGNTKFSQKFQG	RITVTRDTAASTAYMELRSLRSED TAVYYCAR										
"Y"	WINA GNGNTKFSQKFQG	RITVTRDTAASTAYMELRSLRSED TAVYYCAR										
CDR3												
Diversidad												
d3-10	VLLWFGELL*	YYYGSGSYYN				ITMVRGVII						
"AT"		DS				SNMVRGIIIIAY						
"Y"		DS				SNMVRGIIIIAY						
H3												
CDR3												
Enlace	100	110										
JH4	YFDYWQGGLVTVSS	YFDYWQGGLVTVSS										
"AT"	YFDYWQGGLVTVSS	YFDYWQGGLVTVSS										
"Y"	YFDYWQGGLVTVSS	YFDYWQGGLVTVSS										

Figura 17

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE LA CADENA PESADA DE FAB "P" CON LA LÍNEA GERMINAL

										H1																													
										FR1										CDR1										FR2									
										-----										-----										-----									
										1																													

Figura 18

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE LA CADENA PESADA DE FAB “S” CON LA LÍNEA GERMINAL

			H1		
		FR1	CDR1	FR2	
		-----	-----	-----	
		1 2 3		4	
Locus	123456789012345678901234567890	1ab2345	67890123456789		
3-09	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTFD	D--YAMH	WVRQAPGKGLEWVS		
"S"	EVQL L ESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTFD	D YAMH	WVRQAPGKGLEWVS		
		H2			

		CDR2	FR3		
		-----	-----		
		5 6 7 8 9			
Locus	012abc3456789012345	67890123456789012abc345678901234			
3-09	GISW--NSGSIGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRRAEDTALYYCAKD			
"S"	GISW NSGR I GYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLR P EDTA F YYCAKG			
Diversidad					
6-19	GYSSGWY	GIAVAG	V*QWLW		
"S"	G S TSA R Y	S S			
		H3			

		CDR3			

		100 110			
Enlace	JH4	-----YFDYWGGGTTLVTVSS			
"S"		G WY Y WGQTTLVTVSS			

Figura 19

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE LA CADENA LIGERA DE FAB "AT" CON LA LÍNEA GERMINAL

		L1		L2	
		FR1	CDR1	FR2	CDR2
		1	2	3	4
Locus	12345678901234567890123	45678901234567890123	567890123456789	0123456	
O12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSIES-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	
"AT"	EIVMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISR-----YLN	WYQLKPGKAPRLLIY	GASSLQS	
		L3			
		FR3	CDR3		
		6	7	8	9
Locus	78901234567890123456789012345678	9012345			
O12	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTP			
"AT"	GVPSRFGSGSGSAEFTLTISSLQPEDFATYYC	QHTRA--			
		L3			
		CDR3			
		100			
Enlace	JK1	WTFGQGTKVEIK			
	"AT"	--FGQGTKVEIK			

Figura 20

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE LA CADENA LIGERA DE FAB "Y" CON LA LÍNEA GERMINAL

			L1		L2	
	FR1		CDR1	FR2		
CDR2	-----		-----	-----		

	1	2	3	4	5	
Locus	12345678901234567890123	45678901234567890123	456789012345678901234	567890123456789		
0123456						
L6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSS-----YLA	WYQQKPGQAPRLLIY			
DASNRAT						
"Y"	EIVLTQSPATLS F SPGERATLSC	RASQSV G S	YLA	WYQQ R PGQAPR P LIY		
DATNRAT						
			L3			

	FR3		CDR3			
	-----		-----			
	6	7	8	9		
Locus	78901234567890123456789012345678	9012345				
L6	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC	QQRSNWP				
"Y"	GIP T RFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYC	Q H R----				
			L3			
			~			
			CDR3			

	100					
Enlace						
JK2	YTFGQGTKLEIK					
"Y"	R T F GRGTKLEIK					

Figura 21

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE LA CADENA LIGERA DE FAB "P" CON LA LÍNEA GERMINAL

		L1		L2						
		-----		---						
		FR1	CDR1	FR2						
CDR2		-----		-----	-----					

		1	2	3	4					
		5	6	7	8					
Locus	12345678901234567890123	456789012345678901234	567890123456789							
0123456										
A27	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSS-----YLA	WYQQKPGQAPRLLIY							
DASNRAT										
"P"	EIVMTQSPGTLSPGERATLSC	RASQSVSS	SSLA	WYQQKPGQAPRLLIY						
GASSRAT										
		L3								

		FR3	CDR3							

		6	7	8	9					
Locus	78901234567890123456789012345678	9012345								
A27	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC	QQRSNWP								
"P"	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQY----								
		L3								
		CDR3								

Enlace	100									
JK4	LTFGGGTVKVEIK									
"P"	GAFTGGGTVKVEIK									

Figura 22

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE LA CADENA LIGERA DE FAB "S" CON LA 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"	QSVLT QPPSVSVSPGQT ATITC	SG DA LPKQ YVY	WY R QKPGQAP LL VIY	ED SERPS	
	FR3		CDR3		
	6	7	8	9	
Locus	789012345678ab90123456789012345678	9012345abcde			
*3m	GIPERFSGSSSG--TTVILTISGVQAEDEADYYC	QSADSSGTY			
"S"	GIPERFSGSSSG .TEVTLSISGVQAEDEADYYC	QSTDSSGTY			
	CDR3				
	--				
Enlace	100				
JL2	VVFGGGTKLTVL				
"S"	VVFGGGTKLTVL				

* La región variable se identificaba pero no se nombraba. La siguiente coincidencia más cercana es "3m" mostrada anteriormente

Figura 23
Bioensayo de Células Raw
"AT" 405, "AT" 406, "AT" 407

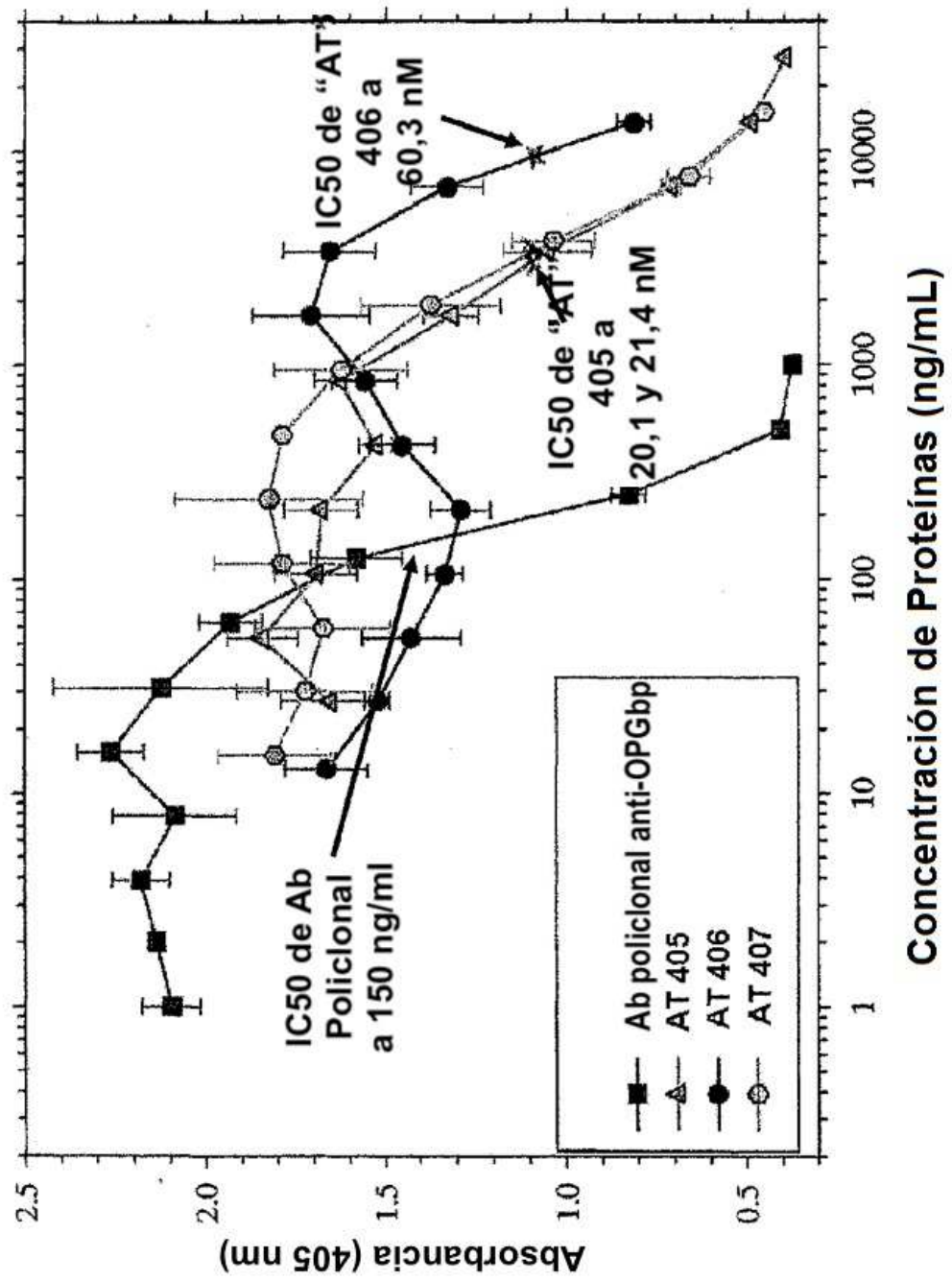


Figura 24
Ensayo de Médula Ósea
"AT" 405, "AT" 407

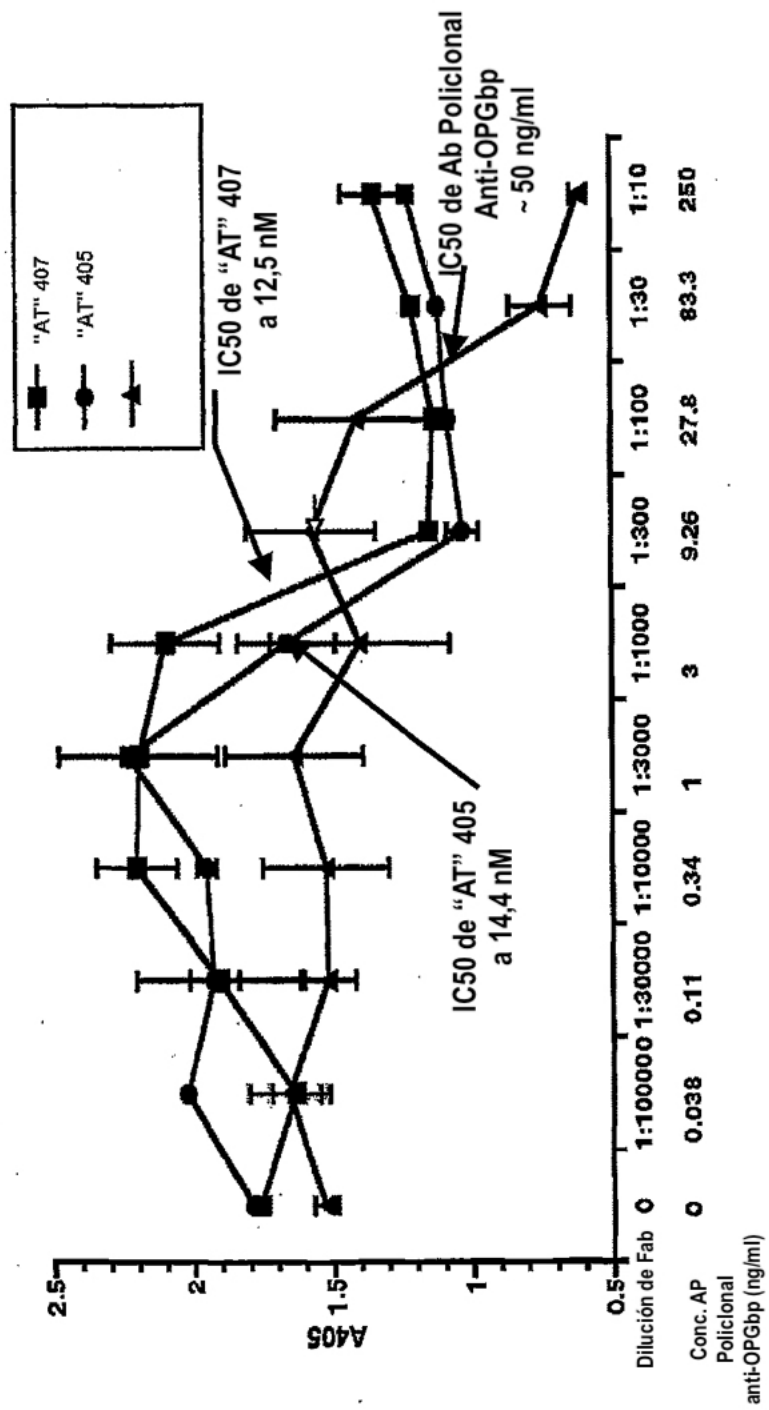


Figura 25
Ensayo de Médula Ósea "AT" 406

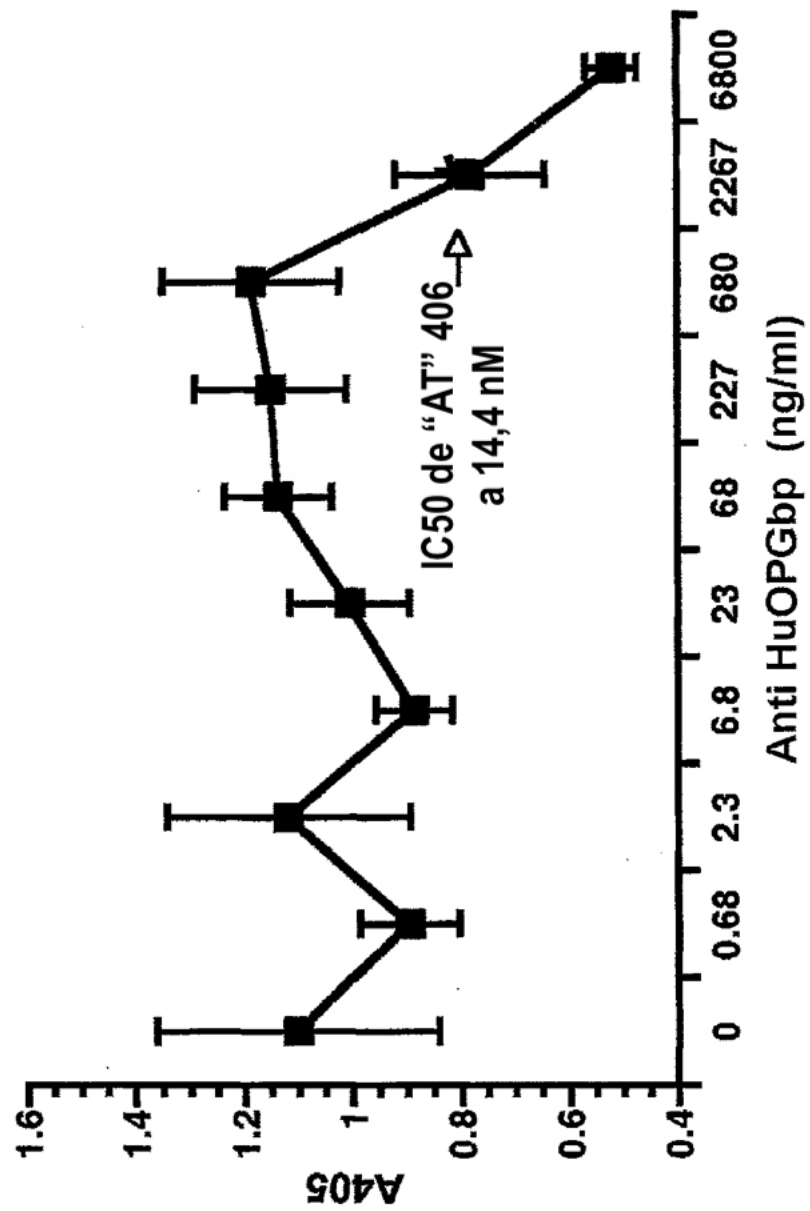


Figura 26
Ensayo de Médula Ósea
"S" 435 e "Y" 429

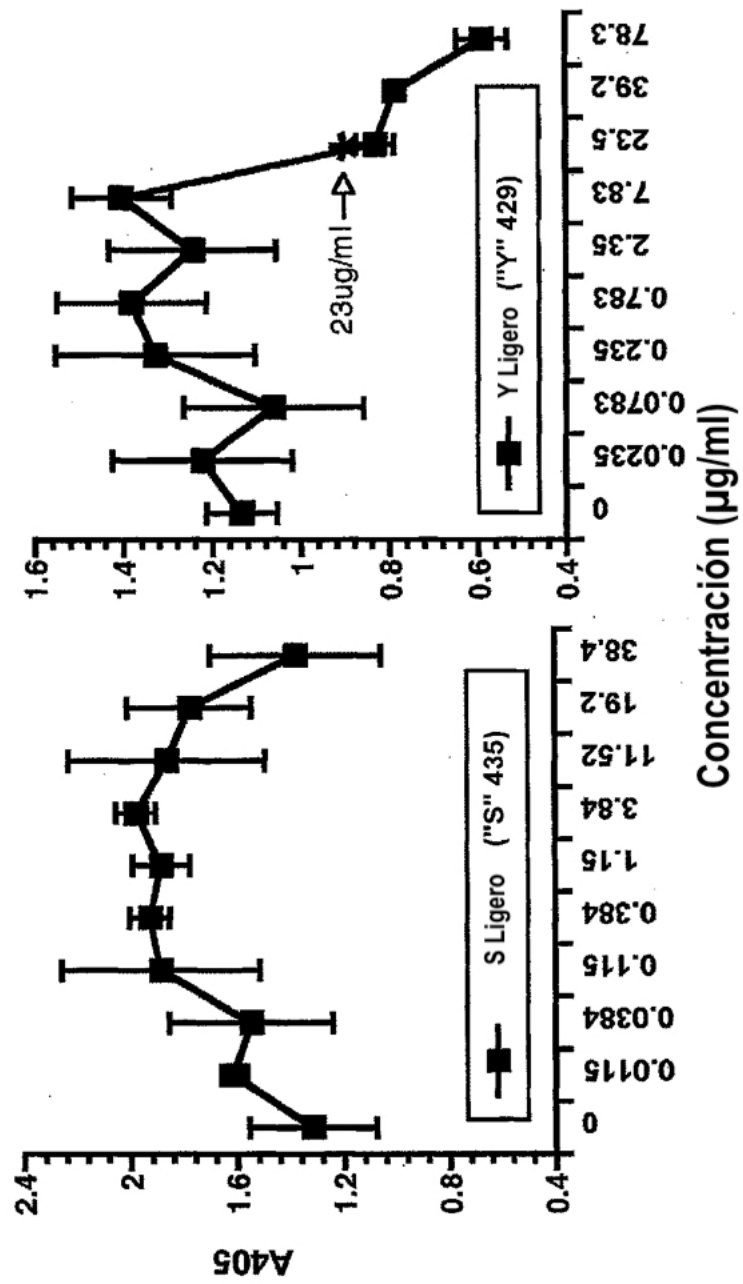


Figura 27
Ensayo de Médula Ósea
"Y" 442 y "P" 444

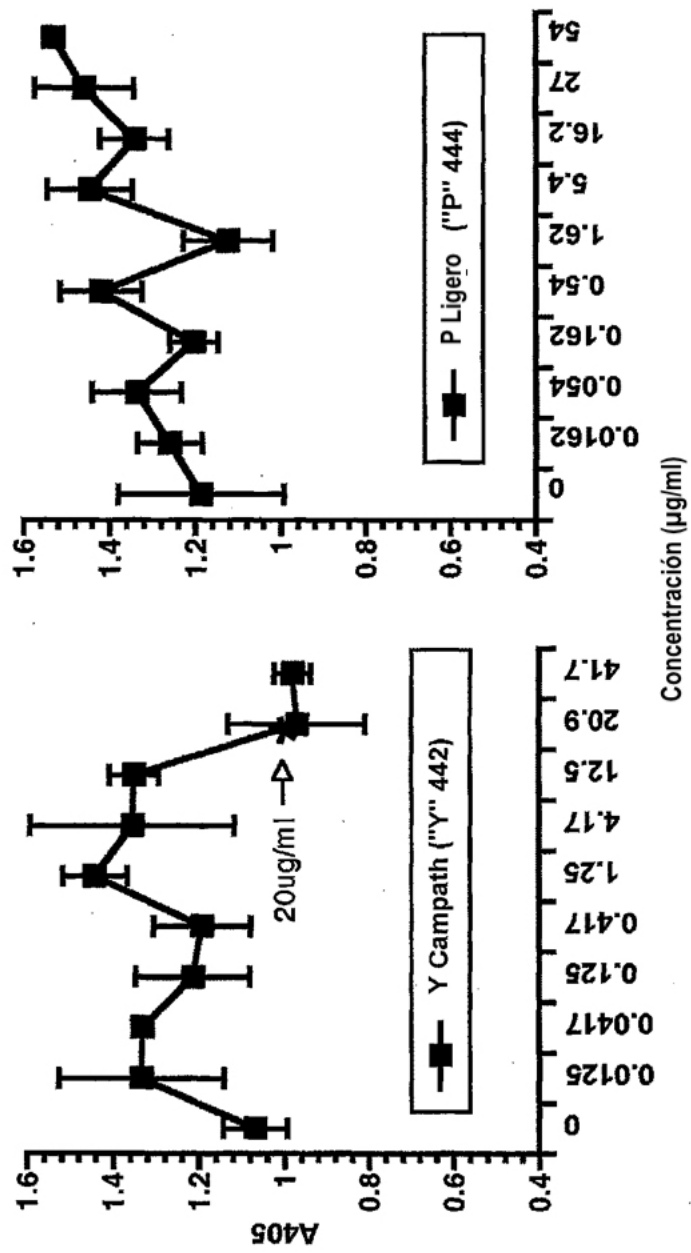


FIGURA 28

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 ctg 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	
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 ctg 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 ctg gag	522
Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp	
160 165 170	

FIGURA 29

OPGbp[143-317] humana	212	GFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQ	250
OPGbp[158-316] murina	211	GFYYLYANICFRHHETSGSVPTDYLQ	249
FLAG OPGbp[158-316] murina/DE		GFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQ	

FIGURA 30

