

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0706524-8 A2**

(22) Data de Depósito: 12/01/2007
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)



(51) *Int.Cl.:*
A61P 19/08
A61P 35/04
A61K 39/395

(54) Título: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE DICKKOPF-1**

(30) Prioridade Unionista: 13/01/2006 US 60/759,216

(73) Titular(es): Novatis AG

(72) Inventor(es): Feng Cong, Janine Shulok, Mariel Donzeau , Mark Fishman , Michael Bardroff, Seth Ettenberg , Stefanie Urlinger

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007000777 de 12/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/084344de 26/07/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE DICKKOPF-1 . A presente invenção refere-se a anticorpos e fragmentos que ligam ao alvo de proteína Dickkopf (DKK1) são fornecidos, como os métodos de uso e kits, para tratar uma célula alvo, em particular, uma célula associada a uma condição osteolítica.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE DICKKOPF-1**".

CAMPO DE USO

A presente invenção refere-se a composições e métodos de uso para anticorpos de Dickkopf-1 ("DKK1"), Dickkopf-4 ("DKK4"), ou ambos, para tratar anormalidades relacionadas a DKK de densidade óssea, metabolismo, diabetes, cânceres e outros.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A via de sinalização de Wnt está envolvida no controle de desenvolvimento embrionário e processos neoplásticos. Proteínas de Wnt extracelulares são responsáveis pelo crescimento e diferenciação de muitos tipos de células, incluindo em particular o crescimento, diferenciação e regulação de osteoblastos, osteoclastos e adipócitos.

Muitos cânceres são associados aos tecidos de osso e podem resultar em lesões osteoblásticas tais como aquelas encontradas em câncer de próstata, ou em lesões osteolíticas tais como aquelas encontradas em câncer do pulmão, câncer de mama, e mieloma múltiplo (por exemplo, Tian et al., 2003 New England J. Med. 349:2483-2494).

Membros da família de gene de Wnt codificam glicoproteínas segregadas que são requeridas para uma variedade de processos de desenvolvimento (Fedi et al., 1999 J. Bio. Chem. 274:19465-19472). Uma proteína dos membros da família de Wnt inicia uma via de sinalização que é importante para o crescimento e diferenciação de osteoblastos, que causam deposição óssea. Além de formação de osso, ressorção óssea é um processo normal contínuo conduzido por células conhecidas como osteoclastos. Em contraste, ativador de receptor de ligando de fator-capá B nuclear (RANKL) é o mediador final de ressorção óssea osteoclastóico, onde desempenha um papel principal na patogênese de osteoporose pós-menopausa, como também em perda óssea associada à artrite reumatóide, câncer metastático, mieloma múltiplo, terapia de inibidor de aromatase e terapia de privação de andrógeno (vide, por exemplo, Lewiecki (2006) Expert Opin Biol Ther. 6: 1041-50). Osteoprotegrina (OPG) que é expressa através

de osteoblastos inibe RANKL, assim diminuindo a atividade e formação de osteoclastos. O equilíbrio entre a formação óssea anabólica e ressorção óssea analítica regula a densidade óssea normal, enquanto um aumento em uma ou nas outras leva à densidade óssea aumentada ou perda óssea aumentada, respectivamente.

Wnt liga e age através de outras proteínas de superfície celular e sinalização de Wnt pode contribuir para o processo neoplástico. Além disso, alterações genéticas podem afetar um complexo de proteína celular conhecido como coli de polipose adenomatosa envolvendo uma proteína β -catenina, e estes complexos foram observados em células de pacientes com doenças tais como câncer de cólon humano, melanomas, e carcinomas hepatocelulares, indicando que as aberrações da via de sinalização de Wnts são relevantes para o desenvolvimento destes e possivelmente outros cânceres humanos (Fedi et al., 1999 J. Bio. Chem. 274:19465-19472).

Há pelo menos duas famílias de proteínas que inibem sinalização de Wnt, a saber a família frizzled-relacionada segregada e a família de Dickkopf (DKK). A família de DKK correntemente contém quatro membros de família, a saber DKK1 (no. de ac. de DNA humano NM_012242; no. de ac. de PRT O94907), DKK2 (nº. de ac. humano NM_014421; no. de ac. de PRT NP_055236), DKK3 (nº. de ac. humano NM_015881; no. de ac. de PRT A-AQ88744), e DKK4 (nº. de ac. humano NM_014420; no. de ac. de PRT NP_055235).

Dickkopf-1 (DKK1) é um inibidor segregado da via de sinalização de Wnt/ β -catenina. Vide, por exemplo, Pedido de patente U. S. 2005-0079173 para Niehrs; pedido de patente U. S. 2004 0234515 para McCarthy. DKK1 possui a habilidade para inibir duplicação de eixo geométrico induzida por Wnt, e análise genética indica que DKK1 age a montante para inibir sinalização de Wnt. DKK1 é também importante no desenvolvimento do esqueleto como demonstrado mediante efeitos na perda das estruturas de osso em galinha e embriões de camundongo após exposição a níveis elevados de DKK1 (Tian et al., 2003 New England J. Med. 349:2483-2494). Níveis elevados de DKK1 no soro foram associados a câncer de próstata, e níveis eleva-

dos de DKK1 e RANKL no plasma de medula óssea e sangue periférico em pacientes com mieloma múltiplo são associados à presença de lesões de osso focais. Vide, por exemplo, Tian 2003, no. de ac. de OMIM 605189. DKK1 também desempenha um papel em adipogênese, condrogênese, pro-
5 liferação da proliferação epitelial gastrointestinal, perda de osso associada a reumatismos, e iniciação de formação placode de folículo capilar. No. de ac. de OMIM. 605189.

Dickkopf-4 (DKK4) é menos bem caracterizado mas é igualmente um inibidor segregado da via de Wnt. DKK4 foi mostrado ser depositado
10 em placas em pacientes com doença de Alzheimer e foi expressado em músculo. Wnt não tem nenhum papel conhecido em desenvolvimento muscular, portanto é postulado aqui que DKK4 tenha um papel inibidor sobre o desenvolvimento dos músculos.

Há uma necessidade por composições e métodos para tratar
15 cânceres e anormalidades de densidade óssea, incluindo tais agentes que interferem ou neutralizam antagonismo mediado por DKK1 e/ou DKK4 da sinalização de Wnt.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Uma modalidade da invenção aqui fornece um anticorpo ou uma
20 porção de ligação de antígeno do mesmo que seletivamente liga e neutraliza um polipeptídeo de DKK1 e/ou DKK4 ou um fragmento do mesmo. Em uma modalidade preferida, o anticorpo é um anticorpo de neutralização de DKK1/4. Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno do anticorpo de neutralização de DKK1/4 não liga um DKK2 ou um DKK3.

25 Em uma modalidade o anticorpo ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo é disposto dentro de um andaime semelhante a imunoglobulina, tal como uma estrutura selecionada de, por exemplo, um andaime humano, humanizado, humano-modificado, de tubarão ou de camelídeo, e/ou pode ser adicionalmente anticorpos recombinantes, quiméricos, ou en-
30 xertados na CDR. Por exemplo, tecnologia projetada para minimizar a resposta de Anticorpo Anti-murino Humano (tecnologia de engenharia humana de Kalobios ou tecnologia de humanização de PDL) é contemplada dentro

da invenção. Também, porções de ligação de antígeno específicas para DKK1 ou DKK4 podem também estar dentro do andaime não semelhante à imunoglobulina, incluindo, por exemplo, dispostas dentro de um tipo de estrutura de adnectina, fibrinogênio, repetições derivadas de anquirina, etc.

5 Em uma modalidade particular, o anticorpo de Dkk1 é caracterizado como tendo uma região de ligação de antígeno que é específica para proteína alvo DKK1, e o anticorpo ou fragmento funcional liga a DKK1 ou um fragmento do mesmo. Em uma modalidade relacionada, o anticorpo de DKK4 é caracterizado como tendo uma região de ligação de antígeno que é
10 específica para proteína alvo DKK4, e o anticorpo ou fragmento funcional liga a DKK4 ou um fragmento do mesmo. Em uma modalidade relacionada, o anticorpo de Dkk4 é caracterizado como tendo uma região de ligação de antígeno que é específica para proteína alvo DKK4, e o anticorpo ou fragmento funcional liga a DKK4 ou um fragmento do mesmo. Em uma modalidade preferida, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo liga
15 a um polipeptídeo de DKK1 e um de DKK4, mas não a um polipeptídeo de DKK2 ou de DKK3.

Em outra modalidade o anticorpo ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo é monoclonal. Em outra modalidade, a porção de ligação de
20 antígeno é policlonal. Em várias modalidades, o anticorpo de DKK1 ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo liga um peptídeo que consiste em 30 aminoácidos contíguos de um Polipeptídeo de DKK1 ou um de DKK4.

Em uma modalidade relacionada, a ligação a DKK1 ou DKK4 é determinada por pelo menos um dos ensaios a seguir: inibição de DKK1 ou
25 antagonismo de DKK4 de transcrição de sinalizada por Wnt; determinação da afinidade da ressonância de plasmon de superfície, ensaio de ligação imunoabsorvente ligado a enzima; análise de ligação com base em eletroquimiluminescência; FMAT, SET, SPR, ALP, TopFlash, concentração de soro de sangue dos biomarcadores tais como osteocalcina (OCN), propeptídeo azotado do tipo 1 de procolágeno (P1NP) e osteoprotegrina (OPG), e
30 ligando a receptor(es) de superfície celular tais como Frizzled (Fz), LRP (LRP5/6) ou Kremen (Krm). Em certas modalidades, o anticorpo de Dkk1 ou

porção de ligação de antígeno possui pelo menos uma das propriedades a seguir: seletividade para DKK1 que é pelo menos 103 vezes, 104 vezes ou 105 vezes maiores que para DKK2 ou DKK3 humanos; liga a DKK1 ou DKK4 com um K_{on} de menos que 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1,0 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM ou 10 pM; e tem uma taxa fora para DKK1 de menos que 10^{-2} por seg, 10^{-3} por seg, 10^{-4} por seg, ou 10^{-5} por seg.

Em uma modalidade relacionada, um anticorpo da invenção compete com DKK1 e/ou DKK4 para ligar a LRP5/6. Em uma modalidade relacionada, um anticorpo da invenção compete com DKK1 e/ou DKK4 para ligar a Krm.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada de qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais destes anticorpos, e seqüências de aminoácido destes. Desse modo, em certas modalidades, a invenção fornece seqüências de aminoácido isoladas selecionadas do grupo de SEQ ID NOs: 2-20 e SEQ ID NOs: 40-72 e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas seqüências.

Também, em certas modalidades adicionais, a invenção fornece seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 2-20, 65-72, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas seqüências que fornecem regiões de ligação de antígeno isoladas, cada uma desta é uma H-CDR-3.

Em uma modalidade relacionada, a região de ligação de antígeno isolada é uma região de H-CDR2 que tem uma seqüência de aminoácido selecionada de SEQ ID NOs: 2-20, 57-64, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas. Em ainda outra modalidade relacionada, a região de ligação de antígeno isolada é uma região de H-CDR2 de consenso descrita selecionada do grupo de seqüências de SEQ ID NO: 40 seqüência de aminoácido tendo GISGSGSYTTYADSVKF, SEQ ID NO: 41 seqüência de aminoácido tendo GISYYGGNTYYADSVKF, e SEQ ID NO: 42 seqüência de aminoácido tendo GISYYGGSTYYADSVKF, e variantes conservadoras ou convertidas em va-

riantes humanas engenheiradas ("humaneered") de resíduos de aminoácido destas seqüências.

Em certas modalidades, a seqüência nova fornecida é SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20, 49-56, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas que fornece uma região de ligação de antígeno isolada que é uma região de H-CDR1.

Em uma modalidade relacionada, a região de ligação de antígeno isolada é uma região de H-CDR1 de consenso que tem uma seqüência de aminoácido (usando um código de aminoácido uma carta) selecionada das seqüências de aminoácido GFTFSSYGMT (SEQ ID NO: 43), GFTFNSYGMT (SEQ ID NO: 44), GFTFSNYGMT (SEQ ID NO: 45), GFTFSSYWMT (SEQ ID NO: 46), GFTFSSYAMT (SEQ ID NO: 47), GFTFSSYGMS (SEQ ID NO: 48) e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") de qualquer destas seqüências.

Em outra modalidade, a invenção fornece seqüências de aminoácido que são regiões de ligação de antígeno isoladas tendo uma região de L-CDR3, tal como seqüências de aminoácido selecionadas de SEQ ID NOs: 21-39, 89-96, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas seqüências. Em ainda outra modalidade relacionada, a região de ligação de antígeno isolada é uma região de L-CDR1 que tem uma seqüência de aminoácido selecionada de SEQ ID NOs: 21-39, 73-80, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas seqüências. Em ainda outra modalidade relacionada, a região de ligação de antígeno isolada é uma região de L-CDR2 que tem uma seqüência de aminoácido selecionada de SEQ ID NOs: 21-39, 81-88, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas seqüências.

Em certas modalidades, a região de ligação de antígeno isolada é uma cadeia leve variável que tem uma seqüência de aminoácido selecionada de SEQ ID NOs: 21-39, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas seqüências.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma seqüência de

nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 97-103. Em uma modalidade relacionada, cada uma destas seqüências de nucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácido e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas seqüências de aminoácido codificadas estão também dentro do escopo da invenção aqui. Em outra modalidade relacionada, a seqüência de nucleotídeo de cada uma de SEQ ID NOs: 97-100 codifica uma cadeia leve de ligação de antígeno. Em uma outra modalidade relacionada, a seqüência de nucleotídeo de cada uma de SEQ ID NOs: 101-103 codifica uma cadeia pesada de ligação de antígeno. Em ainda outra modalidade relacionada, cada uma destas seqüências de nucleotídeo é também otimizada para expressão em uma célula. Células preferidas incluem, mas não são limitadas a, por exemplo, células de Hamster chinês (por exemplo, CHO), baculovírus, levedura, bactérias, células de mieloma, e/ou *H. sapiens*.

Preferivelmente, as seqüências são otimizadas para expressão e para produção e uso clínico. Características para otimização para uso clínico incluem, mas não são limitadas a, por exemplo, meia-vida, farmacocinética (PK), antigenicidade, função efetora, liberação de FcRn, e resposta de paciente incluindo citotoxicidade de célula dependente de anticorpo (ADCC) ou atividades de complemento citotoxicidade dependente (CDC).

Em uma outra modalidade, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada tendo uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 101-103. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 97-100. Em ainda outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 97-100, e uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 101-103.

Em certas modalidades, a invenção fornece uma seqüência de

nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 104-110. Em uma modalidade relacionada, cada uma destas seqüências de nucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácido e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") destas seqüências de aminoácido estão também dentro do escopo da invenção aqui. Em outra modalidade relacionada, a seqüência de nucleotídeo de cada uma de SEQ ID NOs: 104-107 codifica uma cadeia leve de ligação de antígeno. Em uma outra modalidade relacionada, a seqüência de nucleotídeo de cada uma de SEQ ID NOs: 108-110 codifica uma cadeia pesada de ligação de antígeno. Em ainda outra modalidade relacionada, cada uma destas seqüências de nucleotídeo são otimizadas para expressão e/ou para uso clínico.

Em uma outra modalidade, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 108-110. Em outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 104-107. Em ainda outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 104-107, e uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 108-110.

Em outras modalidades, a invenção fornece uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 111-117, e fornece variantes conservadoras destas seqüências. Em uma modalidade relacionada, cada uma de SEQ ID NOs: 111-114 descreve uma cadeia leve de ligação de antígeno. Em outra modalidade, cada uma de SEQ ID NOs: 115-117 descreve uma cadeia pesada de ligação de antígeno. Em ainda outra modalidade relacionada, a seqüência de aminoácido é otimizada para expressão e/ou para uso clínico.

Em uma outra modalidade, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma cadeia pesada descrita em uma

seqüência de aminoácido selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 115-117, e fornece variantes conservadoras destas seqüências. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma cadeia leve descrita em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 111-114, e fornece variantes conservadoras destas seqüências. Em ainda outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma cadeia pesada descrita em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 115-117, e fornece variantes conservadoras destas seqüências, e uma cadeia leve descrita em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 111-114, e fornece variantes conservadoras destas seqüências.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 120-121, e/ou uma região de ligação de antígeno isolada que tem uma região variável de uma cadeia leve ou uma cadeia pesada codificada pelas respectivas seqüências de nucleotídeo. Em uma modalidade relacionada, cada uma destas seqüências de nucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácido, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("human-engineered") destas seqüências de aminoácido estão também dentro do escopo da invenção. Em outra modalidade relacionada, a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 120 codifica uma cadeia leve de ligação de antígeno. Em uma outra modalidade relacionada, a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NOs: 121 codifica uma cadeia pesada de ligação de antígeno. Em ainda outra modalidade relacionada, cada uma destas seqüências de nucleotídeo é também otimizada para expressão e/ou para uso clínico.

Em certas modalidades, a invenção fornece uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo de 118-119 e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("human-engineered") destas seqüências. Em uma modalidade relacionada, SEQ ID NO: 118 descreve uma região variável de ligação de antígeno de uma cadeia leve. Em outra modalidade relacionada, SEQ ID NO: 119 descreve uma região variável de

ligação de antígeno de uma cadeia pesada. Em ainda outra modalidade relacionada, a sequência de aminoácido é otimizada para expressão e/ou para uso clínico.

Em outras modalidades, a invenção fornece uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99% de identidade com as regiões de CDR descritas em SEQ ID NOs: 2-39. Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99% de identidade com uma sequência descrita em SEQ ID NOs: 111-120. Em ainda outra modalidade relacionada, a invenção fornece uma sequência de nucleotídeo que tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99% de identidade com uma sequência descrita em SEQ ID NOs: 97-110 e 120-121.

Em uma certa modalidade, qualquer um dos anticorpos isolados acima é uma IgG. Em uma modalidade relacionada, qualquer um dos anticorpos isolados acima é uma IgG1, uma IgG2, uma IgG3 ou uma IgG4. Em outra modalidade, o anticorpo é uma IgE, uma IgM, uma IgD ou uma IgA. Em uma modalidade relacionada, a invenção é selecionada de uma composição de anticorpo monoclonal ou policlonal. Em outras modalidades, o anticorpo é quimérico, humanizado, convertido em anticorpo humano engenheirado ("humaneered"), recombinante, etc. Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo humano ou humanizado isolado ou fragmento funcional deste, tendo uma região de ligação de antígeno que é específica para um epítipo de DKK1, e o anticorpo ou fragmento funcional liga a DKK1 ou DKK4, ou do contrário bloqueia a ligação de DKK1 ou DKK4 a um receptor de superfície celular (por exemplo, receptores tais como LRP5/6, Kremen, Frizzled). Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento deste impedem, tratam, ou melhoram o desenvolvimento de lesões osteolíticas. Em outras modalidades, a composição anti-DKK da invenção impede, trata, ou melhora um câncer ou doença associados a DKK1 ou DKK4.

Em uma modalidade relacionada, a invenção fornece um anticorpo humano isolado ou humanizado ou fragmento funcional deste, tendo uma região de ligação de antígeno que é específica para um epítipo de DKK1 ou DKK4

alvo, e o epítopo contém seis ou mais resíduos de aminoácido um fragmento de polipeptídeo que compreende os domínios CYS1-ligador-CYS2 de DKK1 e/ou DKK4. Em uma modalidade relacionada, o epítopo é um epítopo conformacional. Em uma modalidade preferida, o epítopo reside dentro do domínio de CYS2. Em uma modalidade particular, o epítopo compreende um resíduo de aminoácido modificado. Em uma modalidade relacionada, o epítopo contém pelo menos um resíduo de aminoácido glicosilado.

Fragmentos funcionais incluem fragmentos de F_v e F_{ab} (incluindo versões de cadeia simples tais como scFv), como também outras regiões de ligação de antígeno de um anticorpo, incluindo aquelas que estão ligadas a um andaime de não-imunoglobulina e anticorpos de cadeia pesada tais como anticorpos e nanocorpos de camelídeo e de tubarão. Em uma modalidade relacionada, o anticorpo isolado como descrito acima é uma IgG. Em outra modalidade relacionada, o anticorpo isolado como descrito acima é uma IgG1, uma IgG2, IgG3 ou uma IgG4. Em outra modalidade, o anticorpo é uma IgE, uma IgM ou uma IgA. Em uma modalidade relacionada, a invenção é uma composição de anticorpo policlonal.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica que tem pelo menos um de qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais ou variantes conservadoras, e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável destes.

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um animal transgênico que carrega um gene que codifica qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais deles.

Em certas modalidades, a invenção provê um método para tratar um distúrbio ou condição associado à expressão de DKK1 ou DKK4. Como aqui usado, "doenças associadas a DKK1" ou "doenças associadas a DKK4" incluem, mas não são limitadas a, lesões osteolíticas - especialmente lesões osteolíticas associadas a um mieloma, especialmente um mieloma múltiplo, ou com cânceres de osso, mama, cólon, melanócitos, hepatócitos, epitélio, esôfago, cérebro, pulmão, próstata ou pâncreas ou metástase dos mesmos; perda óssea associada à transplantação. Outras doenças ou distúrbios in-

cluem mas não são limitados, por exemplo, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular (HCC), mieloma incluindo mieloma múltiplo, diabetes, obesidade, definhamento muscular, doença de Alzheimer, osteoporose, osteopenia, reumatismo, colite e/ou perda de cabelo indesejada. O
5 método envolve administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de qualquer das composições farmacêuticas acima.

Em uma modalidade relacionada, o distúrbio ou condição a ser tratada é uma anormalidade de densidade óssea. Em outra modalidade relacionada, a anormalidade de densidade óssea a ser tratada é a presença de
10 uma lesão osteolítica no sujeito.

Em outra modalidade, o distúrbio ou condição a ser tratada é uma condição osteoporótica, tal como uma lesão osteolítica associada a um câncer. Em uma modalidade relacionada, o câncer a ser tratado é um mieloma, tal como mieloma múltiplo, ou um câncer do osso, mama, cólon, melanócitos, hepatócitos, epitélio, esôfago, cérebro, pulmão, próstata ou pâncreas ou metástase dos mesmos. Em outras modalidades, a condição osteoporótica é osteoporose ou osteopenia ou osteossarcoma.
15

Em certas modalidades, qualquer um dos métodos acima também envolvem administrar um agente quimioterapêutico. Em uma modalidade relacionada, o agente quimioterapêutico é um agente anticâncer. Em outra modalidade relacionada, o agente quimioterapêutico é um agente antiosteoporótico.
20

Em ainda outra modalidade, a invenção provê um método para tratar uma célula alvo, o método envolvendo bloquear interação de DKK1 ou DKK4 com a célula com qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais deles. Em geral, a célula alvo carrega um receptor que liga DKK1 ou DKK4. Em uma modalidade, a célula alvo é um osteoblasto, em que tratamento com a composição de anti-DKK1/4 de neutralização da invenção intensificará a proliferação e estimulará a formação de osso. Em uma modalidade, a célula alvo é uma célula muscular, em que o tratamento contrariará
25
30 definhamento muscular.

Em uma modalidade relacionada, o método também envolve tratar um paciente com a célula alvo com um agente quimioterapêutico ou

radiação. Em uma modalidade relacionada, seguindo administração ou contato, quaisquer dos métodos acima também envolvem observar a melhora ou retardamento de desenvolvimento de uma lesão osteolítica.

5 Em ainda outra modalidade, a invenção provê um método para identificar DKK1 ou DKK4 em soro. Este método envolve detectar DKK1 ou DKK4 com qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos de anticorpo tendo também uma marcação detectável. A marcação é radioativa, fluorescente, magnética, paramagnética, ou quimiluminescente.

10 Em outra modalidade, qualquer um dos anticorpos humanos ou humanizados ou fragmentos de anticorpo são sintéticos.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica de qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos funcionais destes anticorpos e um agente terapêutico adicional. O agente terapêutico adicional pode ser selecionado do grupo que consiste em um agente anti-
15 câncer; um agente antiosteoporótico; um antibiótico; um agente de antimetabólico; um agente antidiabético; um agente anti-inflamatório; um agente antiangiogênico; um fator de crescimento; e uma citocina.

A invenção também refere-se a um método de impedir ou tratar doenças proliferativas ou doenças, tais como um câncer, em um mamífero,
20 particularmente um humano, com uma combinação de agentes farmacêuticos que compreende:

(a) um agente de neutralização de DKK1/4 da invenção; e
(b) um ou mais agentes farmacêuticamente ativos;
em que pelo menos um agente farmacêuticamente ativo é um
25 anticâncer terapêutico.

A invenção também refere-se às composições farmacêuticas compreendendo:

(a) um anticorpo de neutralização de DKK1/4;
(b) um agente farmacêuticamente ativo; e
30 (c) um veículo farmacêuticamente aceitável;
em que pelo menos um agente farmacêuticamente ativo é um anticâncer terapêutico.

A presente invenção também refere-se a um pacote comercial ou produto compreendendo:

(a) uma formulação farmacêutica de um anticorpo de neutralização de DKK1/4; e

5 (b) uma formulação farmacêutica de um agente farmacêuticamente ativo para uso simultâneo, simultâneo, separado ou seqüencial;

em que pelo menos um agente farmacêuticamente ativo é um anticâncer terapêutico.

Em uma certa modalidade, a invenção fornece um anticorpo que
10 tem uma primeira seqüência de aminoácido que é uma cadeia pesada selecionada de SEQ ID NOs: 2-20, e uma seqüência que tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 por cento de identidade de seqüência nas regiões de CDR com as regiões de CDR tendo SEQ ID NOs: 2-20; e uma segunda seqüência de aminoácido que é uma cadeia leve selecionada de SEQ
15 ID NOs: 21-39, e uma seqüência tendo pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 por cento de identidade de seqüência nas regiões de CDR com as regiões de CDR mostradas em SEQ ID NOs: 21-39.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um imunoconjugado feito de um primeiro componente que é um anticorpo ou fragmento
20 como descrito acima e um segundo componente tendo uma segunda seqüência de aminoácido. Por exemplo, o imunoconjugado é uma citotoxina, ou o imunoconjugado é uma proteína ligadora ou anticorpo que tem uma especificidade de ligação para um alvo que é diferente de DKK1 ou DKK4. Por exemplo, o alvo da especificidade de ligação diferente de DKK1 ou
25 DKK4 é um antígeno de tumor ou proteína associada ao tumor em uma superfície de uma célula de câncer.

Em certas modalidades, a invenção provê qualquer um dos anticorpos acima para ser um anticorpo biespecífico.

Em outra modalidade, a invenção fornece um kit que tem qualquer um dos anticorpos acima ou fragmentos de anticorpo. Em algumas modalidades, o kit também contém um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável deste. Em outras modalidades relacionadas, qualquer um dos anti-

30

corpos acima no kit está presente em uma dose de unidade. Em ainda outra modalidade, o kit é um kit de diagnóstico ELISA. Em uma modalidade relacionada, o kit inclui instruções para uso em administrar qualquer um dos anticorpos acima a um sujeito.

5 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 é um gráfico que ilustra nenhuma perda significativa de DKK1 marcado com His-Strep das contas revestidas com Strep-Tactin quando as contas não-lavadas são comparadas com aquelas contas lavadas com severidades de HuCAL® diferentes.

10 Figura 2 é um gráfico de barras que ilustra os resultados de um Ensaio de atividade de Wnt com 100 µl de reagente de Bright-Glo luciferase, como fornecido no Exemplo 3.

Figura 3 é um gráfico de um Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA). A fluorescência é medida em uma leitora placa TECAN Spectrafluor e as curvas de ligação são mostradas.

15 Figura 4 é um gráfico que ilustra o ensaio de TCF/LEF luc dependente de Wnt3a padrão, como fornecido no Exemplo 6.

Figura 5 é um gráfico que ilustra uma versão melhorada do ensaio de repórter de TCF/LEF luc que mostra sensibilidade altamente melhorada para DKK1 mediado pela co-expressão da proteína de co-receptor de Kremen.

20 Figura 6A é uma ilustração gráfica da medição de ressonância de plasmina de superfície de um anticorpo de anti-DKK1/4 que liga a DKK1. Figura 6B é uma tabulação de afinidade de ligação calculada e valores cinéticos.

25 Figura 7A é uma representação esquemática de DKK1 de comprimento total e truncado para uso em mapeamento de epítipo. Figura 7B descreve a ligação de um anticorpo da invenção às proteínas de DKK1 e fragmentos da Figura 7A.

30 Figura 8 é uma ilustração gráfica de anticorpo de DKK1/4 que liga em um ensaio de ELISA de competição.

Figura 9 é uma ilustração gráfica de reativação associada ao

anticorpo de DKK1/4 da transcrição de gene regulada por Wnt a jusante.

Figura 10 é uma ilustração gráfica de DKK1 de reversão de anticorpo de DKK1/4 inibido da secreção de ALP.

Figura 11 é uma ilustração gráfica dos efeitos do anticorpo de DKK1/4 em xenoenxertos *in vivo*.

Figura 12 é uma ilustração gráfica da elevação associada ao anticorpo de DKK1/4 de densidade óssea *in vivo*.

Figura 13 é uma ilustração gráfica que compara eficácia antios-teolítica de Zometa com um anticorpo de DKK1/4.

Figura 14 é uma ilustração gráfica da eficácia dose-dependente de um anticorpo de DKK1/4 em osso anabólico.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos anticorpos de DKK1/4 isolados, particularmente anticorpos humanos que especificamente ligam a DKK1 ou DKK4 e que inibem as propriedades funcionais de DKK1 ou DKK4. Em uma modalidade preferida, o anticorpo de DKK1/4 não liga especificamente a DKK2 ou DKK3. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são derivados de seqüências de cadeia pesada e leve particular e/ou compreendem características estruturais particulares tais como regiões de CDR compreendendo seqüências de aminoácido particulares. A invenção fornece anticorpos isolados, métodos de fazer tais anticorpos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas que compreendem tais anticorpos e composições farmacêuticas que contêm os anticorpos, imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. A invenção também refere-se aos métodos de usar os anticorpos para inibir um distúrbio ou condição associada a DKK1 ou DKK4. Doenças e distúrbios contemplados incluem, mas não são limitadas a, lesões osteolíticas - especialmente lesões osteolíticas associadas a um mieloma, especialmente um mieloma múltiplo, ou com cânceres de osso, mama, cólon, melanócitos, hepatócitos, epitélio, esôfago, cérebro, pulmão, próstata ou pâncreas ou metástase dos mesmos; perda óssea associada à transplantação. Outras doenças ou distúrbios incluem mas não são limitados a, por exemplo, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular

(HCC), mieloma incluindo mieloma múltiplo, diabetes, obesidade, definhamento muscular, doença de Alzheimer, osteoporose, osteopenia, reumatismo, colite e/ou perda de cabelo indesejada.

5 Para que a presente invenção possa ser entendida mais facilmente, certos termos são definidos primeiro. Definições adicionais estão expostas ao longo da descrição detalhada.

O termo "resposta imune" refere-se à ação de, por exemplo, linfócitos, células de apresentação de antígeno, células fagocitárias, granulócitos, e macromoléculas solúveis produzidas pelas células acima ou pelo fígado (incluindo anticorpos, citocinas, e complemento) que resulta em dano se-
10 letivo para, destruição de, ou eliminação do corpo humano de patógenos invasores, células ou tecidos infetados com patógenos, células cancerosas, ou, em casos de autoimunidade ou inflamação patológica, células ou tecidos humanos normais.

15 Uma "via de transdução de sinal" refere-se à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que representam um papel na transmissão de um sinal de uma porção de uma célula para outra porção de uma célula. Como aqui usado, a frase "receptor de superfície celular" inclui, por exemplo, moléculas e complexos de moléculas capazes de receber
20 um sinal e capazes da transmissão de um tal sinal ao longo da membrana plasmática de uma célula. Um exemplo de um "receptor de superfície celular" da presente invenção é um receptor ao qual a molécula de proteína de DKK1 ou DKK4 se liga. Tais receptores de superfície celular incluem, mas não são limitadas a, Frizzled (Fz), LRP (LRP5 e LRP6), e Kremen (Krm).

25 Como aqui usado, o termo "anticorpo" refere-se aos anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia simples, e fragmentos dos mesmos tais como F_{ab} , $F_{(ab)2}$, F_v , e outros fragmentos que retêm a função de ligação de antígeno do anticorpo de origem. Como tal, um anticorpo pode referir-se a uma imunoglobulina ou glicoproteína, ou fragmento ou porção das mesmas, ou a uma construção que
30 compreende uma porção de ligação de antígeno compreendida dentro de uma estrutura semelhante à imunoglobulina modificada, ou a uma porção de

ligação de antígeno compreendida dentro de uma construção que compreende uma estrutura ou andaime não semelhante à imunoglobulina.

Como aqui usado, o termo "anticorpo monoclonal" refere-se a uma composição de anticorpo que tem uma população de anticorpo homogênea. O termo não é limitado com relação às espécies ou fonte do anticorpo, nem é intencionado ser limitado pela maneira em que é feito. O termo abrange imunoglobulinas inteiras como também fragmentos tais como F_{ab} , $F_{(ab)2}$, F_v , e similares que retêm a função de ligação de antígeno do anticorpo. Anticorpos monoclonais de qualquer espécie mamífera podem ser usados nesta invenção. Em prática, porém, os anticorpos tipicamente serão de rato ou de origem murina por causa da disponibilidade das linhagens celulares de rato ou murinas para uso em fazer as linhagens celulares híbridas requeridas ou hibridomas para produzir anticorpos monoclonais.

Como aqui usado, o termo "anticorpo policlonal" refere-se a uma composição de anticorpo que tem uma população de anticorpo heterogênea. Anticorpos policlonais são freqüentemente derivados do soro agrupado de animais imunizados ou de humanos selecionados.

Como aqui usado, a frase "anticorpos de cadeia simples" refere-se aos anticorpos preparados determinando os domínios de ligação (tanto de cadeia pesada como leve) de um anticorpo de ligação, e provendo uma metade de ligação que permite preservação da função de ligação. Isto forma, em essência, um anticorpo radicalmente abreviado, tendo apenas aquela parte do domínio variável necessária para ligar ao antígeno. Determinação e construção de anticorpos de cadeia simples são descritas na Patente U. S. N°. 4.946.778 para Ladner et al.

Um "anticorpo de ocorrência natural" é uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como

V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ser também subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), entremeadas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs dispostas do término amino ao término carbóxi na ordem a seguir: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina para tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico.

O termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de antígeno"), como aqui usado, refere-se à sequência de proteína que liga o alvo, por exemplo, uma ou mais CDRs. Ela inclui, por exemplo, anticorpos de comprimento total, um ou mais fragmentos de um anticorpo, e/ou CDRs em um andaime relacionado à não-imunoglobulina que retém a habilidade para especificamente ligar a um antígeno (por exemplo, DKK1). A função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser executada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo incluem um fragmento de F_{ab} , um fragmento monovalente que consiste nos domínios de V_L , V_H , C_L e de $CH1$; um fragmento de $F(ab)_2$, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos de F_{ab} ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; um fragmento de F_d que consiste nos domínios de V_H e $CH1$; um fragmento de F_v que consiste nos domínios de V_L e V_H de um braço simples de um anticorpo; um fragmento de dAb (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546) que consiste em um domínio de V_H ; e uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR).

Como aqui usado, um "antígeno" ou um "epítipo" alternadamente refere-se a uma sequência de polipeptídeo em uma proteína alvo especificamente reconhecida por uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo.

po, fragmento de anticorpo, ou seus equivalentes. Um antígeno ou epítopo compreende pelo menos 6 aminoácidos que podem ser contíguos dentro de uma seqüência alvo ou não-contígua. Um epítopo conformacional pode compreender resíduos não-contíguos, e opcionalmente pode conter resíduos de aminoácido natural ou sinteticamente modificados. Modificações para
 5 resíduos incluem, mas não são limitadas a: fosforilação, glicosilação, PEGilação, ubiquitinização, furanilização e outros.

Além disso, embora os dois domínios do fragmento de F_v , V_L e V_H sejam codificados através de genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que os permite serem feitos como uma cadeia de proteína simples em que as regiões V_L e V_H emparelham-se para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia simples F_v (scFv); vide por exemplo, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; e Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples são também intencionados ser abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas aqueles de habilidade na técnica, e os fragmentos são triados para utilidade da mesma maneira como são os anticorpos intactos.

20 Como descrito aqui, as variantes conservadoras incluem resíduos de aminoácido em quaisquer das seqüências de aminoácido identificadas, particularmente alterações conservadoras que são bem conhecidas a alguém de habilidade usual na técnica de engenharia de proteína.

Um "anticorpo isolado", como aqui usado, refere-se a um anticorpo que está substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente liga a DKK1 está substancialmente livre de anticorpos que especificamente ligam antígenos diferentes de DKK1). Um anticorpo isolado que especificamente liga a DKK1 pode, porém, ter reatividade cruzada com outros antígenos, tais como moléculas de DKK1 de outras espécies, ou outros
 25 membros da família tais como DKK4 ou parólogo relacionados. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celu-
 30

lar e/ou químicas.

O termo "anticorpo humano", como aqui usado, é intencionado incluir anticorpos tendo regiões variáveis em que a estrutura e regiões de CDR são derivadas de seqüências de origem humana. Além disso, se o anticorpo contiver uma região constante, a região constante também é derivada de tais seqüências humanas, por exemplo, seqüências de linha germinativa humana, ou versões mutadas de seqüências de linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por seqüências humanas (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica *in vitro* ou através de mutação somática *in vivo*). Porém, o termo "anticorpo humano", como aqui usado, não é intencionado incluir anticorpos em que as seqüências de CDR derivadas da linha germinativa de outras espécies mamíferas, tais como um camundongo, foram enxertadas nas seqüências de estrutura humana.

O termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se aos anticorpos que exibem uma especificidade de ligação simples que tem regiões variáveis em que a estrutura e regiões de CDR são derivadas das seqüências humanas. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não-humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma que compreende um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve fundido com uma célula imortalizada.

Como aqui usado, o termo "anticorpos humanizados" significam que pelo menos uma porção das regiões de estrutura de uma imunoglobulina é derivada das seqüências de imunoglobulina humana. Uns anticorpos "humanizados" tais como anticorpos com seqüências de CDR derivadas da linha germinativa de outras espécies, especialmente uma espécie mamífera, por exemplo, um camundongo que foi enxertado sobre as seqüências de estrutura humana. Tecnologias exemplares incluem tecnologia de humanização de PDL.

Como aqui usado, o termo "anticorpos convertidos em anticorpos humanos engenheirados ("humaneered")" significa anticorpos que ligam

o mesmo epítopo mas diferem em seqüência. Tecnologias exemplares incluem anticorpos convertidos em anticorpos humanos engenheirados ("humanneered") produzidos por tecnologia de humaneering de Kalobios, em que a seqüência da região de ligação de antígeno é derivada, por exemplo, por mutação, ao invés devido às substituições de aminoácido conservadoras.

O termo "anticorpo humano recombinante", como aqui usado, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, modificados ou isolados através de meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que são transgênicos ou transcromossômicos para os genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado deles, anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, por exemplo, de um transfectoma, anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo humana recombinante, combinatória, e anticorpos preparados, expressos, modificados ou isolados por quaisquer outros meios que envolvam corte de toda ou uma porção de um gene de imunoglobulina humana, seqüências para outras seqüências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis em que a estrutura e regiões de CDR são derivadas de seqüências de imunoglobulina de linha germinativa humana. Em certas modalidades, porém, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para as seqüências de Ig humana for usado, mutagênese somática *in vivo*) e desse modo as seqüências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas e relacionadas às seqüências V_H e V_L de linha germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linha germinativa do anticorpo humano *in vivo*.

Como aqui usado, "isótipo" refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, IgA, IgD, IgM, IgE, IgG tais como IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) que é fornecido pelos genes da região constante de cadeia pesada.

As frases "um anticorpo que reconhece um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são usadas alternadamente aqui com o termo "um anticorpo que especificamente liga a um antígeno". Como aqui

usado, um anticorpo que "especificamente liga a DKK1 humano" é intencio-
 nado referir-se a um anticorpo que liga a DKK1 humano com uma K_D de 5×10^{-9} M ou menos, 2×10^{-9} M ou menos, ou 1×10^{-10} M ou menos. Um anti-
 corpo que "reage cruzado com um antígeno diferente de DKK1 humano" é
 5 intencionado a referir-se a um anticorpo que liga àquele antígeno com uma
 K_D de $0,5 \times 10^{-8}$ M ou menos, 5×10^{-9} M ou menos, ou 2×10^{-9} M ou menos.
 Um anticorpo que "não reage cruzado com um antígeno particular" é inten-
 cionado a referir-se a um anticorpo que liga àquele antígeno, com uma K_D de
 $1,5 \times 10^{-8}$ M ou mais, ou uma K_D de $5^{-10} \times 10^{-8}$ M ou 1×10^{-7} M ou mais. Em
 10 certas modalidades, tais anticorpos que não reagem cruzado com o antígeno
 exibem essencialmente ligação indetectável contra estas proteínas em en-
 saios de ligação padrões.

Como aqui usado, um anticorpo que "inibe ligação de DKK1 para
 um receptor de superfície celular" tal como LRP, Fz ou Krm, refere-se a um
 15 anticorpo que inibe ligação de DKK1 ao receptor com uma K de 1 nM ou
 menos, 0,75 nM ou menos, 0,5 nM ou menos, ou 0,25 nM ou menos.

Como aqui usado, "osteólise" refere-se a uma diminuição em
 densidade óssea que pode ser devido a vários mecanismos de ação incluín-
 do, por exemplo, atividade de osteoblasto diminuída, atividade de osteoclas-
 20 to aumentada. Osteólise, portanto, abrange mecanismos que genericamente
 afetam densidade óssea mineral. Como aqui usado, um anticorpo que "inibe
 atividade osteolítica" é intencionado a referir-se a um anticorpo que inibe
 perda de densidade óssea aumentando a formação de osso ou bloqueando
 uma ressorção óssea.

25 O termo "C" ou "C", como aqui usado, é intencionado a referir-se
 à taxa de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular, en-
 quanto que o termo " K_{dis} " ou " K_D ", como aqui usado, é intencionado a referir-
 se à taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular.
 O termo " K_D ", como aqui usado, é intencionado a referir-se à constante de
 30 dissociação que é obtida da razão de K_D para C (isto é K_D/C) e é expressada
 como uma concentração molar (M). Valores de K_D para anticorpos podem
 ser determinados usando métodos bem estabelecidos na técnica. Um méto-

do para determinar a K_D de um anticorpo é usar a ressonância de plasmon de superfície, por FMT, ou usar um sistema de biossensor tal como um sistema de Biacore®.

5 Como aqui usado, o termo "afinidade" refere-se à resistência de interação entre o anticorpo e o antígeno nos sítios antigênicos simples. Dentro de cada sítio antigênico, a região variável do "braço" de anticorpo interage através de forças não-covalentes fracas com antígeno em numerosos sítios; quanto mais interações, mais forte a afinidade.

10 Como aqui usado, o termo "avidez" refere-se a uma medida informativa da estabilidade geral ou resistência do complexo de anticorpo-antígeno. É controlado através de três fatores principais: afinidade de epítipo de anticorpo; a valência do antígeno e anticorpo; e o arranjo estrutural das partes interagentes. Por fim estes fatores definem a especificidade do anticorpo que é a probabilidade que o anticorpo particular está ligando a um
15 epítipo de antígeno preciso.

Para adquirir uma sonda de avidez mais alta, um conjugado dimerico (duas moléculas de JWJ-1 acopladas a um marcador de FACS) pode ser construído, desse modo fazendo interações de afinidade baixa (tais como com o anticorpo de linha germinativa) mais facilmente detectado por
20 FACS. Além disso, outros meios para aumentar a avidez da ligação de antígeno envolvem gerar dímeros ou multímeros de quaisquer das construções de fibronectina descritas aqui dos anticorpos de DKK1 ou DKK4. Tais multímeros podem ser gerados através de ligação covalente entre módulos individuais, por exemplo, imitando a ligação do término C ao N natural ou imitando os dímeros de anticorpo que são unidos através de suas regiões cons-
25 tantes. As ligações modificadas na interface de Fc/Fc podem ser covalentes ou não-covalentes. Além disso, pares de dimerização ou multimerização diferentes de Fc podem ser usados em DKK1 ou híbridos de DKK4 para criar tais estruturas de ordem mais alta.

30 Como aqui usado, o termo "reatividade cruzada" refere-se a um anticorpo ou população de anticorpos que ligam a epítipos em outros antígenos. Isto pode ser causado por avidez ou especificidade baixas do anti-

corpo ou por antígenos distintos múltiplos tendo epítomos idênticos ou bem parecidos. Reatividade cruzada às vezes é desejável quando um quiser ligação geral a um grupo relacionado de antígenos ou ao tentar marcação de espécies cruzadas quando a seqüência de epítomo de antígeno não for altamente conservada em evolução.

Como aqui usado, o termo "afinidade alta" ou "especificidade alta" para um anticorpo de IgG refere-se a um anticorpo que tem uma K_D de 10^{-8} M ou menos, 10^{-9} M ou menos, ou 10^{-10} M ou menos para um antígeno alvo. Porém, ligação de "afinidade alta" pode variar para outros isótipos de anticorpo. Por exemplo, ligação de "afinidade alta" para um isótipo de IgM refere-se a um anticorpo tendo uma K_D de 10^{-7} M ou menos, ou 10^{-8} M ou menos.

Como aqui usado, o termo "sujeito" inclui qualquer humano ou animal não-humano.

O termo "animal não-humano" inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não-mamíferos, tais como primatas não-humanos, ovelhas, cachorros, gatos, cavalos, vacas, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

Como aqui usado, o termo, "otimizado" significa que uma seqüência de nucleotídeo foi alterada para codificar uma seqüência de aminoácido usando códons que são preferidos na célula ou organismo de produção, e/ou a seqüência de nucleotídeo foi alterada para remover os sítios doadores de corte ou aceitantes de corte latentes. Tabelas de códon otimizadas são bem conhecidas na técnica por uma ampla variedade de espécies. Seqüências para os sítios doadores e aceitantes de corte são também conhecidos na técnica e podem ser identificados sítios de corte latentes, por exemplo, por análise de transcrição ou dados de expressão. Células de produção incluem, mas não são limitadas a, uma célula procariótica tal como por exemplo, uma célula procariótica tal como um baculovírus ou uma bactéria (*E. coli*), ou uma célula eucariótica, por exemplo, levedura (por exemplo, *Pichia*), uma célula de ovário de hamster chinês (CHO), uma célula de mieloma ou uma célula humana. A seqüência de nucleotídeo otimizada é modificada para reter completamente ou tanto quanto possível a seqüência de aminoácido e o número de resíduo originalmente codificado pela seqüência

de nucleotídeo de partida, que é também conhecida como a sequência "parental". As sequências otimizadas aqui foram modificadas para ter códons que são preferidos nas células de produção, porém a expressão otimizada destas sequências em outras células eucarióticas e procarióticas é também
5 intencionada aqui. As sequências de aminoácido codificadas por sequências de nucleotídeo otimizadas são opcionalmente referidas como otimizadas.

Em modalidades relacionadas, as sequências de polipeptídeo das composições neutralizantes de anti-DKK1/4 da invenção, e os nucleotídeos que as codificam, são preferivelmente otimizadas para produção e uso
10 clínico. Características que podem ser otimizadas para uso clínico incluem, mas não são limitadas a, por exemplo, meia-vida, farmacocinética (PK), antigenicidade, função efetora, liberação de FcRn, e resposta do paciente incluindo atividades da citotoxicidade de célula dependente de anticorpo (ADCC) ou da citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

15 Como aqui usado, "doenças associadas a DKK1" ou "doenças associadas a DKK4" incluem, mas não são limitadas a, lesões osteolíticas especialmente lesões osteolíticas associadas a um mieloma, especialmente um mieloma múltiplo, ou com cânceres de osso, mama, cólon, melanócitos, hepatócitos, epitélio, esôfago, cérebro, pulmão, próstata ou pâncreas ou me-
20 tástase dos mesmos; perda óssea associada à transplantação. Outras doenças ou distúrbios incluem mas não são limitados a, por exemplo, osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular (HCC), mieloma incluindo mieloma múltiplo, diabetes, obesidade, definhamento muscular, doença de Alzheimer, osteoporose, osteopenia, reumatismo, colite e/ou perda de
25 cabelo indesejada.

Como aqui usado, um "tratamento" é uma intervenção executada com a intenção de impedir o desenvolvimento ou alterar a patologia de um distúrbio. Conseqüentemente, "tratamento" refere-se a tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles em necessidade de
30 tratamento incluem aqueles já com o distúrbio como também aqueles em que o distúrbio é para ser prevenido. Em tratamento de tumor (por exemplo, câncer), um agente terapêutico pode diretamente diminuir a patologia de

células tumorais, ou tornar as células tumorais mais suscetível ao tratamento através de outros agentes terapêuticos, por exemplo, radiação e/ou quimioterapia. A "patologia" de câncer inclui todos os fenômenos que comprometem o bem-estar do paciente. Esta inclui, sem limitação, crescimento anormal ou incontrolável de células, metástase, interferência com o funcionamento normal de células vizinhas, liberação de citocinas ou outros produtos secretórios em níveis anormais, supressão ou agravamento de resposta inflamatória ou imunológica, etc.

Tratamento de pacientes que sofrem de sintomas clínicos, bioquímicos, radiológicos ou subjetivos da doença, tais como osteólise, pode incluir aliviar alguns ou todos tais sintomas ou reduzir a predisposição à doença.

Em geral, uma composição neutralizante de anti-DKK1/4 da invenção impede, trata, ou melhora as doenças relacionadas a Wnt associadas a DKK1 ou DKK4 ou ambos, mas não doenças associadas a DKK2, DKK3 ou com outros moduladores da via de Wnt.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas subseções a seguir.

A via de Wnt é um regulador principal da diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSC) em osteoblastos. É também um fator de sobrevivência importante para osteoblastos ativos. Dickkopf-1 (DKK1) é um antagonista da via de Wnt expresso predominantemente em osso em adultos e é sobre-regulado em pacientes de mieloma com lesões osteolíticas. Um anticorpo de anti-DKK1/4 de neutralização é um agente verdadeiramente anabólico que age através do aumento da atividade osteoblástica enquanto simultaneamente reduz a atividade osteoclastótica. Em contraste, fármacos atuais tais como PTH, que são comercializados como agentes anabólicos, de fato aumentam os marcadores associados tanto ao osteoblasto como osteoblastos.

Fornecido na invenção são anticorpos policlonais e monoclonais selecionados para ligar a DKK1. Um anticorpo preferido tem uma afinidade de menos de 10 pM contra DKK1 humano. Em algumas modalidades, as reações cruzadas de anticorpo de anti-DKK1 com DKK4 (Kd~300 pM) mas

não DKK2 (análise de afinidade contínua).

Um epítopo preferido para um anticorpo de anti-DKK1 ou anti-DKK4 é mapeado no domínio de Cys-2 (AAs 189-263) que é conhecido ser responsável pela ligação de LRP6 e Kremen. Em uma modalidade, o epítopo
5 inclui pelo menos seis, e no máximo trinta, resíduos de aminoácido do domínio de Cys-2 de um Polipeptídeo de DKK1 ou um de DKK4. Em uma certa modalidade, o epítopo inclui uma extensão de pelo menos seis aminoácidos contíguos. Em outras modalidades, o sítio de ligação preferido é não-linear, isto é, inclui resíduos de aminoácido não-contíguos. Em algumas modalidades,
10 ligação depende da N-glicosilação. Apenas um sítio de N-glicosilação é prognosticado, no resíduo 256 no domínio de Cys-2.

Na presente invenção, um anticorpo de anti-DKK1 de neutralização bloqueia a interação de DKK1 com LRP6 em ELISA e ensaios de ligação de superfície celular. Como esperado este eficazmente neutraliza a atividade supressiva de Wnt de DKK1 a EC_{50} 's abaixo de 1 nM *in vitro*.
15

Em um modelo *in vitro* de diferenciação de osteoblasto, células de 10T1/2 de camundongo são tratadas com Wnt3A para estimular a secreção de fosfatase alcalina (AP), um marcador para atividade de osteoblasto. DKK1 bloqueia a produção de AP neste modelo e os anticorpos da invenção
20 reverterem completamente esta inibição.

Em certas modalidades, um anticorpo da invenção exibe farmacocinética linear de dose (AUC) em camundongos, com uma meia-vida terminal dependente de dose de 35-96 horas em camundongos em uma dose de 20-200 µg/camundongo.

25 Usando o modelo intratibial de metástase de tumor de próstata osteolítico, os anticorpos da invenção inibem dano de osso cortical induzido por tumor. Efeitos no osso trabecular são perplexos neste modelo pela observação que implantes de tumor e implantes imitados causam dano mecânico ao osso, que resulta em um aumento inicial no osso tecido que é remodelado depois, desse modo causando uma diminuição evidente no volume
30 de osso. Em uma certa modalidade, um anticorpo da invenção aumenta a produção de osso tecido em tumor e simula tíbias implantadas e inibe a di-

minuição no volume de osso acompanhando remodelagem.

Em modalidades relacionadas, alterações nos marcadores de osso (osteocalcina, sRANKL, OPG, AP, TRAP) são usadas para demonstrar efeitos clínicos de anticorpos da invenção em doenças relacionadas a osso e prognosticar resultados clínicos de tratamentos com níveis farmacologicamente eficazes de um anticorpo de anti-DKK1 de neutralização como fornecido aqui. Krm liga-se a DKK aproximadamente na mesma região como LRP. Krm necessário para inibição de sinal de Wnt por meio de interação de DKK com LRP. Krm-DKK-LRP complexado para ser internalizado para desativação da via de Wnt.

Uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização da invenção preferivelmente liga DKK1 ou DKK4, bloqueando sua interação com LRP e/ou Krm, assim neutralizando os efeitos de DKK1 ou DKK4 na via de sinalização de Wnt. Reativação da via de Wnt ocorre apenas onde DKK1 e/ou DKK4 estão limitados.

Ensaios padrões para avaliar a habilidade de ligação dos anticorpos para DKK1 de várias espécies são conhecidos na técnica, incluindo por exemplo, ELISAs, western blot e RIAs. Ensaios adequados são descritos em detalhes nos Exemplos. A cinética de ligação (por exemplo, afinidade de ligação) dos anticorpos também pode ser avaliada por ensaios padrões conhecidos na técnica, tais como por análise de Biacore, ensaio de BioVeris SET, FMAT, quimiluminescência, e/ou ensaios de inibição ou ensaios de liberação de sinal de SPR. Ensaios são descritos para avaliar os efeitos dos anticorpos nas propriedades funcionais de DKK1 em mais detalhes nos Exemplos.

Conseqüentemente, um anticorpo que "inibe" uma ou mais destas propriedades funcionais de DKK1 (por exemplo, bioquímicas, imunológicas, atividades biológicas celulares, fisiológicas ou outras, ou outras) como determinado de acordo com as metodologias conhecidas na técnica e descritas aqui, será entendido referir-se a uma diminuição estatisticamente significativa na atividade particular com relação àquela vista na ausência do anticorpo (por exemplo, ou quando um anticorpo de controle de especificidade irrelevante estiver presente). Um anticorpo que inibe a atividade dos efei-

tos de DKK1 tais como diminuição estatisticamente significativa em pelo menos 10% do parâmetro medido, por pelo menos 50%, 80% ou 90%, e em certas modalidades um anticorpo da invenção pode inibir mais que 95%, 98% ou 99% da atividade funcional de DKK1.

5 MEMBROS da FAMÍLIA Dickkopf

Metabolismo de osso apropriado envolve uma rede complexa de vias reguladoras e interconexões entre osteoblastos, osteoclastos e o estroma circunvizinho. Desequilíbrios nestes mecanismos reguladores são envolvidos em condições osteolíticas tais como osteoporose, lesões osteolíticas induzidas por tumor, transplante renal e hepático induzido por perda de osso, e perda óssea induzida por terapia anti-hormonal. Estas condições podem ter sintomas severos incluindo dor de osso, fraturas, compressão vertebral, e mobilidade reduzida. A maioria dos tratamentos aprovados ou correntemente sob avaliação clínica atua predominantemente inibindo a função dos osteoclastos. Por exemplo, bisfosfonatos tais como ácido zoladrônico (Zometa) são o padrão atual de cuidado e atuam inibindo a função dos osteoclastos e sobrevivência. Enquanto os bisfosfonatos sejam em geral eficazes, alguns pacientes não respondem robustamente ou descontinuam o uso devido à toxicidade renal ou osteonecrose [Markowitz 2003] [Ruggiero 2004]. Além disso há fármacos investigatórios múltiplos que alvejam desenvolvimento de osteoclastos tal como anticorpos de neutralização de RANKL e M-CSF, ou função dos osteoclastos tal como inibidores de Catepsina K.

Estimulação da atividade de osteoblasto forneceria um mecanismo novo para tratar doença osteolítica. A via de Wnt representa um papel principal na diferenciação e atividade de osteoblasto, enquanto a família de Dickkopf (DKK) de antagonistas foi identificada em particular como reguladores fundamentais deste processo *in vitro* (vide [Krishnan 2006] para revisão). *In vitro*, Wnt é um fator de sobrevivência e diferenciação de osteoblastos essencial. Validação clínica para o papel da via de Wnt é fornecida através de mutações no co-receptor de Wnt, LRP5. Mutações de inativação em LRP5 resultam em síndrome de osteoporose-pseudoglioma (OPPG) [Ai 2005], enquanto mutações de ativação resultam em massa de osso alta [Boyden

2002]. Estas mutações de ativação são encontradas no domínio extracelular e foram demonstradas prejudicar a ligação à família de Dickkopf (DKK) dos antagonistas de Wnt.

DKK1 foi relatado ser sobre-expressado em células de mieloma de pacientes com lesões de osso mas ausente em células plasmáticas normais ou em células plasmáticas de pacientes sem lesões de osso [Tian 2004][Politou 2006]. Uma tal sobre-expressão de DKK1 através de células de mieloma pode transtornar o equilíbrio normal entre os osteoblastos e osteoclastos bloqueando a diferenciação dos osteoblastos, e desse modo promovendo ressorção óssea. Além disso, alguns dos tratamentos antitumor usados para mieloma, tais como dexametasona, foram relatados sobre-regular DKK1 [Ohnaka 2004]. Portanto, um anticorpo de neutralização de anti-DKK1 deveria permitir reativação da via de Wnt em lesões osteolíticas, ao mesmo tempo não afetando a sinalização de Wnt em outros tecidos onde os níveis de DKK1 são relativamente baixos ou onde os outros antagonistas predominam. Em adultos, DKK1 foi relatado ser altamente expresso apenas em osso [Li 2006], sugerindo um papel contínuo para DKK1 na regulação do metabolismo de osso em adultos.

Camundongos transgênicos que sobre-expressam Wnt1 em tecido de mama desenvolvem carcinomas mamários [Tsukamoto 1988] e ~90% dos cânceres colorretais humanos têm mutações em APC ou β -catenina, dois componentes citoplásmicos da via de Wnt [Morin 1997][Rowan 2000]. Este tipo de evidência aumenta as preocupações que ativação da via de Wnt pudesse ser um risco para iniciação ou progressão de tumor aumentada. Além disso, DKKs são sub-reguladas em tumores colorretais e melanomas, sugerindo um papel supressivo potencial de tumor.

Um polipeptídeo de DKK da invenção inclui DKK1 (SEQ ID NO:1) e DKK4 (SEQ ID NO:124), como também DKK2 (SEQ ID NO: 122) e DKK3 (SEQ ID NO:123). Membros da família de DKK têm dois domínios de CYS (CYS1 e CYS2) como mostrados na Tabela A - Membro da família de DKK1 PileUp. Proteínas de DKK contêm um ácido peptídeo sinal N-terminal, dois domínios de CYS contendo agrupamentos de resíduos de cisteína se-

parados por uma região de ligador divergente, e um sítio de N-glicosilação C-terminal potencial. O domínio de CYS2 em DKK4 tem uma função de ligação de lipídio que pode facilitar as interações de WNT/DKK com a membrana plasmática. N°. de ac. de OMIM. 605417.

5

Tabela A: Membro da Família de DKK1 PileUp			
hDKK1	-----	-----	-----
hDKK2	-----	-----	-----
hDKK3	MQRLGATLLC	LLLAADVPTA	PAPAPTATSA PVKPGPALSY PQEEATLNEM
hDKK4	-----	-----	-----
51	100		
hDKK1	-----	M MALGAAGATR	VFVAMVAAAL GGHPLLGVSA TLNSVLNSNA
hDKK2	-----	M AALMRSKDSS	CCLLLAAVL MVESSQ IGSSRAKLNS
hDKK3	FREVEELMED	TQHKLRSAVE	EMEAEEAAAK ASSEVNLANL PPSYHNETNT
hDKK4	-----	-----	-----
101	150		
hDKK1	IKNLPPPLGG	AAGHPGSAVS	AAPGILYPG. ..GNKYQTID NYQPY
hDKK2	IKS...SLGG	ET..PGQAAN	RSAG.MYQGL AFGGSKKGKN LGQAY
hDKK3	DTKVGNNTIH	VHREIHKITN	NQTGQMFSE TVITSVGDEE GRRSH
hDKK4	-----	MVAA VLLGLSWLCS	PLGALVLDNF NIRSSADLHG ARKGS
151	CYS1	200	
hDKK1	EECGTDEYCA	SPTRGGDAGV	QICLACRKRR KRCMRHAMCC PGNYCKNGIC
hDKK2	KECEVGRYCH	SPHQGSSA..	..CMVCRRKK KRCHRDGMCC PSTRCNNGIC
hDKK3	EDCGPSMYCQ	FASFQ	YTCQPCRGR MLCTRDSECC GDQLCVWGHG
hDKK4	TDCNTRKFCL	QPRD....EK	PFCATCRGLR RRCQRDAMCC PGTLCVNDVC
201	250		
hDKK1	VSSDQN..HF	RGEI...EET	ITESFGNDH. STLD.GYSRR TTLSSKMYHT
hDKK2	IPVTES..IL	TPHIPALDGT	RHRDRNHGHI SNHDLGWQNL GRPHTKMSHI
hDKK3	TKMA.....		T
hDKK4	TTMEDATPIL	ERQLDEQDGT	.HAEGTTGH. .PVQENQPKR KPSIKKSQGR
251	CYS2	300	
hDKK1	KGQEGSV	CLR SSDCASGLCC	A..RHFWSKI CKPVLKEGQV CTKHRRK...
hDKK2	KGHEGDP	CLR SSDCIEGFCC	A..RHFWTKI CKPVLHQGEV CTKQRKK...
hDKK3	RGSNGTI	CDN QRDCQPLCC	AFQRLGLFPV CTPLVEGEL CHDPASRLLD
hDKK4	KGQEGES	CLR TFDCGPGGCC	A..RHFWTKI CKPVLLEGQV CSRRGHK...
301	350		
hDKK1	...G.SHGLE	IFQRCYCGEG	LSCRIQKDHH QASNSSRLHT QQRH-----
hDKK2	...G.SHGLE	IFQRCDCAKG	LSCKVWKD.A TYSSKARLHV QQKI-----
hDKK3	LITWELEPDG	ALDRCPASG	LLC..... QPHSHSLVYV QKPTFVGSRD
hDKK4	...DTAQAPE	IFQRDCGPG	LLCRSQLTSN R..QHARLRV QQKIEKL---
351	400		
hDKK1	-----	-----	-----
hDKK2	-----	-----	-----
hDKK3	QDGEILLPRE	VPDEYEVGSF	MEEVRQELED LERSLTEEMA LGEPAAAAAA
hDKK4	-----	-----	-----
401			
hDKK1	-----	(SEQ ID NO: 1)	
hDKK2	-----	(SEQ ID NO:122)	

CYS 1

CYS 2

hDKK3 LLGGEEI (SEQ ID NO:123) hDKK4 ~~~~~~ (SEQ ID NO:124)

ANTICORPOS CONTRA DKK1 E DKK4

Em uma modalidade preferida, o anticorpo da invenção é específico a uma proteína de DKK humana. Em uma modalidade mais preferida, o anticorpo da invenção.

- 5 Um anticorpo de neutralização de DKK1 ou DKK4 é distinto das modificações da via de Wnt que foram ligadas à promoção de tumor. A via de Wnt é regulada por uma rede complexa de ligandos extracelulares, receptores e antagonistas dos quais DKK1 é apenas um. Devido à expressão restrita de DKK1 nos adultos e sua redundância funcional com outros antagonistas de Wnt, um anticorpo de DKK1 de neutralização é improvável de causar ativação difundida da sinalização de Wnt ou portanto, tumorigênese. Isto é também suportado por duas observações: primeiro, ativando mutações de LRP5 (inibindo ligação de DKK) induz um fenótipo de massa de osso alta mas não tem nenhum risco de câncer aumentado evidente [Moon 2004], enquanto camundongos nulos de DKK1 heterozigoto ou de Doubleridge tem níveis de DKK1 diminuídos, fenótipo de massa de osso alta, mas nenhuma taxa aumentada relatada de formação de tumor [MacDonald 2004].

- 15 Um anticorpo de anti-DKK1 deveria positivamente impactar a doença osteolítica induzida por mieloma ao mesmo tempo não aumentando o risco de tumorigênese de novo. É esperado que um tal anticorpo fosse usado em combinação com quimioterapias antitumorais e possivelmente com fármacos de antirressorção de osso que inibem função dos osteoclastos.

ANTICORPOS POLICLONAIS

- 25 Anticorpos da invenção podem ser anticorpos policlonais, anticorpos policlonais especialmente humanos. Policlonais são derivados do soro agrupado de animais imunizados ou de humanos selecionados.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

- 30 Anticorpos da invenção são preferivelmente os anticorpos monoclonais humanos, tais como os isolados e estruturalmente caracterizados, e.g., nos Exemplos 1-8. Sequências de aminoácido de V_H específicas dos anticorpos são mostradas, por exemplo, em SEQ ID NOs: 2-20. Sequências

de aminoácido de V_L específicas dos anticorpos são mostradas, por exemplo, em SEQ ID NOs: 21-39.

Uma sequência de aminoácido de V_H do anticorpo pode ser otimizada para expressão em uma célula mamífera, por exemplo, tal como a sequência mostrada em SEQ ID NO: 119. Uma sequência de aminoácido de V_L dos anticorpos pode ser otimizada para expressão em uma célula mamífera, por exemplo, tal como a sequência mostrada em SEQ ID NO: 118. Igualmente, as sequências podem ser otimizadas para expressão, por exemplo, em levedura, bactérias, hamster e outras células, dependendo de que sistema de expressão é preferido para a característica sendo otimizada. Outros anticorpos da invenção incluem aminoácidos que foram mutados, ainda têm pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 por cento de identidade nas regiões de CDR com as regiões de CDR descritas nas sequências descritas acima.

Também, sequências de nucleotídeo parentais de cadeia leve de comprimento total são mostradas em SEQ ID NOs: 97-100. Sequências de nucleotídeo parentais de cadeia pesada de comprimento total são mostradas em SEQ ID NOs: 101-103. Sequências de nucleotídeo de cadeia leve de comprimento total otimizadas para expressão em uma célula mamífera são mostradas em SEQ ID NOs: 104-107. Sequências de nucleotídeo de cadeia pesada de comprimento total otimizadas para expressão são mostradas em uma célula mamífera em SEQ ID NOs: 108-110. Sequências de aminoácido de cadeia leve de comprimento total codificadas por sequências de nucleotídeo de cadeia leve otimizadas são mostradas em SEQ ID NOs: 111-114. Sequências de aminoácido de cadeia pesada de comprimento total codificadas por sequências de nucleotídeo de cadeia pesada otimizadas são mostradas em SEQ ID NOs: 115-117. Outros anticorpos da invenção incluem aminoácidos ou ácidos nucleicos que foram mutados, ainda têm pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99 por cento de identidade às sequências descritas acima.

Uma vez que cada um destes anticorpos pode ligar a DKK1, as sequências de cadeia leve de comprimento total, de cadeia pesada de com-

primento total V_H , V_L e (seqüências de nucleotídeo e seqüências de aminoácido) podem ser "misturadas e emparelhadas" para criar outras moléculas de ligação de anti-DKK1 da invenção. Ligação de DKK1 de tais anticorpos "misturados e emparelhados" pode ser testada usando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, ELISAs). Quando estas cadeias forem misturadas e emparelhadas, uma seqüência de V_H de um emparelhamento de V_H/V_L particular deveria ser substituída com uma seqüência de V_H estruturalmente similar. Igualmente uma seqüência de cadeia pesada comprimento total de um emparelhamento de cadeia pesada de comprimento total particular/de cadeia leve de comprimento total deveria ser substituído com uma seqüência de cadeia pesada de comprimento total estruturalmente similar. Igualmente, uma seqüência de V_L de um emparelhamento de V_H/V_L particular deveria ser substituída com uma seqüência de V_L estruturalmente similar. Igualmente uma seqüência de cadeia leve de seqüência de cadeia leve de comprimento total de um emparelhamento de cadeia pesada de comprimento total particular/de cadeia leve de comprimento total deveria ser substituída com uma seqüência de cadeia leve de comprimento total estruturalmente similar. As seqüências de cadeia leve de comprimento total e de cadeia pesada de comprimento total, V_H , V_L dos anticorpos da presente invenção são particularmente tratáveis mediante mistura e emparelhamento, uma vez que estes anticorpos usam seqüências de cadeia leve de comprimento total e de cadeia pesada de comprimento total, V_H , V_L derivadas das mesmas seqüências de linha germinativa e desse modo exibem similaridade estrutural.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo: uma região de V_H que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20 e 119; e uma região de V_L que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 118; em que o anticorpo especificamente liga a DKK1.

Exemplos de combinações de cadeia pesada e leve incluem: uma região de V_H que compreende a seqüência de aminoácido SEQ ID NO:

2 e uma região de V_L que compreende a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 21; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 3 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 22; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 4 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 23; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 5 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 24; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 6 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 25; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 7 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 28; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 8 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 29; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 9 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 30; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 10 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 31; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 11 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 32; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 12 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 33; ou uma região de V_H que compreende a SEQ ID NO: 119 e uma região de V_L que compreende a SEQ ID NO: 118.

Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo tendo: uma cadeia pesada de comprimento total que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 115-117; e uma cadeia leve de comprimento total que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 111-114.

Desse modo, exemplos de combinações de cadeia pesada de comprimento total e de cadeia leve de comprimento total, respectivamente, incluem: SEQ ID NO: 115 com SEQ ID NO: 111; ou SEQ ID NO: 116 com SEQ ID NO: 112; ou SEQ ID NO: 117 com SEQ ID NO: 113; ou SEQ ID NO: 117 com SEQ ID NO: 114.

Em outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreendendo uma cadeia pesada de comprimento total codificada por uma sequência de nu-

cleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 101-103; e uma cadeia leve de comprimento total codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 97-100.

Desse modo, exemplos de nucleotídeos que codificam cadeias pesadas e leves de comprimento total, respectivamente, que podem ser combinadas incluem: SEQ ID NO: 101 e 97; ou SEQ ID NO: 102 e 98; ou uma SEQ ID NO: 103 e 99; ou SEQ ID NO: 103 e 100.

Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação de antígeno que foi otimizada para expressão na célula tendo: uma cadeia pesada de comprimento total que compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 108-110; e uma cadeia leve de comprimento total que compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 104-107.

Em ainda outro aspecto, a invenção fornece anticorpos que compreendem a cadeia pesada e cadeia leve CDR1s, CDR2s e CDR3s dos anticorpos, ou combinações das mesmas. As seqüências de aminoácido das CDR1s de V_H dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20, e 49-56. As seqüências de aminoácido das CDR2s de V_H dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 2-20 e 57-64. As seqüências de aminoácido das CDR3s de V_H dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 2-20 e 65-72. As seqüências de aminoácido das CDR1s de V_L dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 21-39 e 73-80. As seqüências de aminoácido das CDR2s de V_L dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 21-39 e 81-88. As seqüências de aminoácido das CDR3s de V_L dos anticorpos são mostradas em SEQ ID NOs: 21-39 e 89-96. As regiões de CDR são delineadas usando o sistema de Kabat (Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação de NIH No. 91-3242).

Dado que cada um destes anticorpos pode ligar a DKK1 e que especificidade de ligação de antígeno é fornecida primariamente pelas regiões de CDR1, 2 e 3, as seqüências de CDR1, 2 e 3 de V_H e as seqüências

de CDR1, 2 e 3 de V_L podem ser "misturadas e emparelhadas" (isto é, CDRs de anticorpos diferentes pode ser misturadas e emparelhadas, embora cada anticorpo tenha que conter uma CDR1, 2 e 3 de V_H e uma CDR1, 2 e 3 de V_L para criar outras moléculas de ligação de anti-DKK1 da invenção. Ligação de DKK1 de tais anticorpos "misturados e emparelhados" pode ser testada usando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, ELISAs). Quando seqüências de CDR de V_H são misturadas e emparelhadas, as seqüência de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência de V_H particular deveriam ser substituídas com uma(s) seqüência(s) de CDR estruturalmente similar(es). Igualmente, quando as seqüências de CDR de V_L são misturadas e emparelhadas, a seqüência de CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência de V_L particular deveria ser substituída com uma(s) seqüência(s) de CDR estruturalmente similar(es). Além disso, seqüência de CDR1, CDR2 e/ou de CDR3 de uma seqüência de V_H ou de V_L particular específica ou fortuitamente pode ser mutada para criar anticorpos que podem ser testados para características de afinidade ou ligação. Será facilmente evidente ao artesão normalmente versado que novas seqüências de V_H e V_L podem ser modificadas substituindo uma ou mais seqüências da região de CDR de V_H e/ou V_L com seqüências estruturalmente similares das seqüências de CDR mostradas aqui para anticorpos monoclonais da presente invenção.

Um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo tem: uma região de CDR1 de V_H que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20 e 49-56; uma região de CDR2 de V_H que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20 e 57-64; uma região de CDR3 de V_H que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20 e 65-72; uma região de CDR1 de V_L que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 73-80; uma região de CDR2 de V_L que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 81-88; e uma região de CDR3 de V_L que compreende uma seqüência de aminoácido sele-

cionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 89-96; em que o anticorpo especificamente liga a DKK1.

Em uma certa modalidade, o anticorpo consiste em: uma região de CDR1 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 2; uma região de CDR2 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 6; uma região de CDR3 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 7; uma região de CDR1 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 21; uma região de CDR2 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 22; e uma região de CDR3 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 23.

Em outra modalidade, o anticorpo consiste em: uma região de CDR1 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 3; uma região de CDR2 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 12; uma região de CDR3 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 13; uma região de CDR1 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 24; uma região de CDR2 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 25; e uma região de CDR3 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 26.

Em ainda outra modalidade, o anticorpo consiste em: uma região de CDR1 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 4; uma região de CDR2 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 14; uma região de CDR3 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 15; uma região de CDR1 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 27; uma região de CDR2 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 28; e uma região de CDR3 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 29.

Em outra modalidade, o anticorpo consiste em: uma região de CDR1 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 5; uma região de CDR2 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 16; uma região de CDR3 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 17; uma região de CDR1 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 30; uma região de CDR2 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 31; e uma região de CDR3 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 32.

Em uma certa modalidade, o anticorpo consiste em: uma região de CDR1 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 8; uma região de CDR2 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 18; uma região de CDR3 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 19; uma região de CDR1 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 33; uma região de CDR2 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 34; e uma região de CDR3 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 35.

Em outra modalidade, o anticorpo consiste em: uma região de CDR1 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 9; uma região de CDR2 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 10; uma região de CDR3 de V_H que compreende a SEQ ID NO: 11; uma região de CDR1 de V_L que compreende a SEQ ID NO: V_H 36; uma região de CDR2 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 37; e uma região de CDR3 de V_L que compreende a SEQ ID NO: 38.

Como aqui usado, um anticorpo humano compreende regiões pesadas ou de V_L ou cadeias pesadas ou leves de comprimento total que são "o produto de" ou "derivadas de" uma seqüência de linha germinativa particular se as regiões variáveis ou cadeias de comprimento total do anticorpo forem obtidas de um sistema que usa genes de imunoglobulina de linha germinativa humana. Tais sistemas incluem imunizar um camundongo transgênico carregando genes de imunoglobulina humana com o antígeno de interesse ou triar uma biblioteca de genes de imunoglobulina humana exibida no fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma seqüência de imunoglobulina de linha germinativa humana pode ser identificado como tal comparando a seqüência de aminoácido do anticorpo humano às seqüências de aminoácido de imunoglobulinas de linha germinativa humanas e selecionando a seqüência de imunoglobulina de linha germinativa humana que está na seqüência mais próxima (isto é, maior% de identidade) à seqüência do anticorpo humano. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma seqüência de imunoglobulina de linha germinativa humana particular pode conter diferenças de aminoácido quando comparado à seqüência de linha germinativa, por exemplo, devido às mutações somáticas de ocorrência natural ou introdução intencional de mutação loco-direcionada. Porém, um anticorpo humano selecionado tipicamente é pelo menos 90% idêntico em seqüência de aminoácidos a uma seqüência de aminoácido codificada por um gene de imunoglobulina de linha germinativa humana e contém resíduos de aminoácido que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparou às seqüências de aminoácido de imunoglobulina de linha germinativa de outras espécies (por exemplo, seqüências de linha germinativa murinas). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, ou pelo

menos 95%, ou até mesmo pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntico em sequência de aminoácido à sequência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinativa. Tipicamente, um anticorpo humano derivado de uma sequência de linha germinativa humana particular exibirá não mais que 10 diferenças de aminoácido da sequência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinativa humana. Em certos casos, o anticorpo humano pode exibir não mais que 5, ou até mesmo não mais que 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácido da sequência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinativa.

10 ANTICORPOS HOMÓLOGOS

Em ainda outra modalidade, um anticorpo da invenção tem sequências de aminoácido de cadeia pesada e leve de comprimento total; sequências de nucleotídeo de cadeia pesada e leve de comprimento total, sequências de nucleotídeo de cadeia pesada e leve de região variável, ou sequências de aminoácido de cadeia pesada e leve de região variável que são homólogas às sequências de aminoácido e de nucleotídeo dos anticorpos descritos aqui, e em que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas da composição de anti-DKK1/4 de neutralização da invenção.

Por exemplo, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, compreendendo uma região de V_H e uma região de V_L , em que: a região de V_H compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20 e 119; a região de V_L compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 118; o anticorpo especificamente liga a DKK1 e/ou DKK4, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo neutraliza ligação de uma proteína de DKK1 a LRP6, Fz e/ou Krm, ou o anticorpo neutraliza ligação de uma proteína de DKK4 a LRP, Pz e/ou Krm.

Em um outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, compreendendo

uma cadeia pesada de comprimento total e uma cadeia leve de comprimento total, em que: a cadeia pesada de comprimento total compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 115-117; a cadeia leve de comprimento total compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 111-114; o anticorpo especificamente liga a DKK1, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo inibe ligação da proteína de DKK1 ao receptor de DKK1 ou o anticorpo inibe ligação do receptor de DKK1 prevenindo ou melhorando osteólise ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ impedindo ou melhorando lesões osteolíticas ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando câncer.

Em outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, compreendendo uma cadeia pesada de comprimento total e uma cadeia leve de comprimento total, em que: a cadeia pesada de comprimento total compreende uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 101-103; a cadeia leve de comprimento total compreende uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 97-100; o anticorpo especificamente liga a DKK1, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo inibe ligação da proteína de DKK1 ao receptor de DKK1 ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando osteólise ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando lesões osteolíticas ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando câncer.

Em outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, que foi otimizado para expressão em uma célula, compreendendo uma cadeia pesada de comprimento total e uma cadeia leve de comprimento total, em que: a cadeia pesa-

da de comprimento total compreende uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 108-110; a cadeia leve de comprimento total compreende uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 104-107; o anticorpo especificamente liga a DKK1, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo inibe ligação da proteína de DKK1 ao receptor de DKK1 ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando osteólise ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando lesões osteolíticas ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando câncer.

Em outro exemplo, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, que foi otimizado para expressão em uma célula, compreendendo uma região de V_H e uma região de V_L , em que: a cadeia pesada de comprimento total compreende uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 121; a cadeia leve de comprimento total compreende uma sequência de nucleotídeo que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 120; o anticorpo especificamente liga a DKK1, e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo inibe ligação da proteína de DKK1 ao receptor de DKK1 ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando osteólise ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando lesões osteolíticas ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando câncer.

Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três das propriedades funcionais debatidas acima. O anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico.

Como aqui usado, a porcentagem de homologia entre as duas

seqüências de aminoácido ou duas seqüências de nucleotídeo é equivalente à porcentagem de identidade entre as duas seqüências. A porcentagem de identidade entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (isto é, % homologia = # de posições idênticas/# total de posições x 100), levando em conta o número de intervalos, e o comprimento de cada intervalo que necessita ser introduzido para alinhamento ótimo das duas seqüências. A comparação das seqüências e determinação da porcentagem de identidade entre as duas seqüências pode ser realizada usando um algoritmo matemático, como descrito nos exemplos não-limitativos abaixo.

A porcentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácido pode ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de intervalo de 12 e uma penalidade de intervalo de 4. Além disso, a porcentagem de identidade entre as duas seqüências de aminoácido pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) que foi incorporado no programa de GAP no pacote de software de GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), usando ou uma matriz de Blossum 62 ou uma matriz de PAM250, e um peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

Adicional ou alternativamente, as seqüências de proteína da presente invenção podem também ser usadas como uma "seqüência de consulta" para executar uma pesquisa junto às bases de dados públicas para, por exemplo, identificar as seqüências relacionadas. Tais pesquisas podem ser executadas usando o programa de XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al., 1990 J. Mol. Biol. 215:403-10. As pesquisas de proteína de BLAST podem ser executadas com o programa de XBLAST, contagem = 50, comprimento de palavra = 3 para obter as seqüências de aminoácido homólogas às moléculas de anticorpo da invenção. Para obter alinhamentos intervalados para propósitos de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado

como descrito em Altschul et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Ao utilizar os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros predefinidos dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Vide <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

5 ANTICORPOS COM MODIFICAÇÕES CONSERVADORAS

Em certas modalidades, um anticorpo da invenção tem uma região de V_H que consiste em seqüências de CDR1, CDR2, e CDR3 e uma região de V_L que consistem em seqüências de CDR1, CDR2, e CDR3, em que uma ou mais destas seqüências de CDR têm seqüências de aminoácido especificadas com base nos anticorpos descritos aqui ou modificações conservadoras das mesmas, e em que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas da composição de anti-DKK1/4 de neutralização da invenção. Conseqüentemente, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, consistindo em uma região de V_H que consiste em seqüências de CDR1, CDR2, e CDR3 e uma região de V_L que consistem em seqüências de CDR1, CDR2, e CDR3, em que: as regiões de V_H de CDR1 são seqüências que consistem em seqüências de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20, 49-56, e modificações conservadoras das mesmas; a região de V_H de CDR2 são seqüências que consistem em seqüências de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 2-20, 57-64, e modificações conservadoras das mesmas; a região de V_H de CDR3 são seqüências que consistem em seqüências de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 2-20, 65-72, e modificações conservadoras das mesmas; as regiões de V_L de CDR1 são seqüências que consistem em seqüências de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 21-39, 73-80, e modificações conservadoras das mesmas; as regiões de V_L de CDR2 são seqüências que consistem em seqüências de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 21-39, 81-88, e modificações conservadoras das mesmas; as regiões de V_L de CDR3 são seqüências que

consistem em seqüências de aminoácido selecionadas do grupo que consiste em seqüências de aminoácido SEQ ID NOs: 21-39, 89-96, e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo especificamente liga a DKK1; e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo inibe ligação da proteína de DKK1 ao receptor de DKK1 ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando osteólise ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando lesões osteolíticas ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando câncer.

Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais listadas debatidas acima. Tais anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos.

Em outras modalidades, um anticorpo da invenção tem uma seqüência de cadeia pesada de comprimento total e uma seqüência de cadeia leve de comprimento total, em que uma ou mais destas seqüências têm seqüências de aminoácido especificadas com base nos anticorpos descritos aqui ou modificações conservadoras das mesmas, e em que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas da composição de anti-DKK1/4 de neutralização da invenção. Conseqüentemente, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, consistindo em uma cadeia pesada de comprimento total e uma cadeia leve de comprimento total em que: a cadeia pesada de comprimento total tem seqüências de aminoácido selecionadas do grupo de SEQ ID NOs: 115-117, e modificações conservadoras das mesmas; e a cadeia leve de comprimento total tem seqüências de aminoácido selecionadas do grupo de SEQ ID NOs: 111-114, e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo especificamente liga a DKK1; e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo inibe ligação da proteína de DKK1 ao receptor de DKK1 ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando osteólise ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando lesões osteolíticas ou o anticorpo inibe

ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando câncer.

Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais listadas debatidas acima. Tais anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos.

Em outras modalidades, um anticorpo da invenção otimizado para expressão em uma célula tem uma seqüência de região de V_H e uma seqüência de região de V_L , em que uma ou mais destas seqüências têm seqüências de aminoácido especificadas com base nos anticorpos descritos aqui ou modificações conservadoras das mesmas, e em que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas da composição de anti-DKK1/4 de neutralização da invenção. Conseqüentemente, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, consistindo em uma região de V_H e uma região de V_L em que: a região de V_H tem seqüências de aminoácido selecionadas do grupo de SEQ ID NO: 119, e modificações conservadoras das mesmas; e a região de V_L tem seqüências de aminoácido selecionadas do grupo de SEQ ID NOs: 118, e modificações conservadoras das mesmas; o anticorpo especificamente liga a DKK1; e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o anticorpo inibe ligação da proteína de DKK1 ao receptor de DKK1 ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando osteólise ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando lesões osteolíticas ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando câncer.

Em várias modalidades, o anticorpo pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais listadas debatidas acima. Tais anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos humanos, anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos.

Como aqui usado, o termo "modificações de seqüência conservadoras" é intencionado a referir-se às modificações de aminoácido que não afetam ou alteram significativamente as características de ligação do anticorpo que contém a seqüência de aminoácido. Tais modificações conserva-

doras incluem substituições, adições e deleções de aminoácidos. Modificações podem ser introduzidas em um anticorpo da invenção por técnicas padrões conhecidas na técnica, tais como mutagênese dirigida e mutagênese mediada por PCR.

- 5 Substituições de aminoácido conservadoras são as em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidi-
- 10 na), cadeias laterais acídicas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares descarregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não-polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina,
- 15 valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Desse modo, um ou mais resíduos de aminoácido podem ser substituídos dentro das regiões de CDR de um anticorpo da invenção com outros resíduos de aminoácido da mesma família de cadeia lateral, e o anticorpo alterado pode ser testado para função retida usando os
- 20 ensaios funcionais descritos aqui.

ANTICORPOS QUE LIGAM AO MESMO EPÍTOPO QUE A COMPOSIÇÃO DE ANTI-DKK1/4 DE NEUTRALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

- Em outra modalidade, a invenção fornece anticorpos que ligam ao mesmo epítipo como as várias composições de anti-DKK1/4 de neutrali-
- 25 zação da invenção fornecidas aqui ligam. Tais anticorpos adicionais podem ser identificados com base em sua habilidade para competição cruzada (por exemplo, para competitivamente inibir a ligação de, em uma maneira estatisticamente significativa) com outros anticorpos da invenção em Ensaios de ligação de DKK1 padrões. A habilidade de um anticorpo de teste para inibir a
- 30 ligação de anticorpos da presente invenção a DKK1 humano demonstra que o anticorpo de teste pode competir com aquele anticorpo para ligar a DKK1 humano; um tal anticorpo pode, de acordo com hipóteses não-limitativas,

ligar ao epítopo mesmo ou um relacionado (por exemplo, um estruturalmente similar ou espacialmente proximal) em DKK1 humano como o anticorpo com o qual ele compete. Em uma certa modalidade, o anticorpo que liga ao mesmo epítopo em DKK1 humano como os anticorpos da presente invenção
 5 é um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos monoclonais humanos podem ser preparados e isolados como descrito nos Exemplos.

CAMELÍDEO E OUTROS ANTICORPOS DE CADEIA PESADA

Proteínas de anticorpo obtidas de membros da família de camelo e dromedário (*Camelus bactrianus* e *Camelus dromaderius*) a incluindo mem-
 10 bros mundiais novos tais como espécies de lhama (*Lama paccos*, *Lama glama* e *Lama vicugna*) foram caracterizadas com respeito ao tamanho, complexidade estrutural e antigenicidade para sujeitos humanos. Certos anticorpos de IgG desta família de mamíferos como encontrado na Nature carecem de cadeias leves, e são desse modo estruturalmente distintos da es-
 15 trutura quaternária de quatro cadeias típica que tem duas cadeias pesadas e duas leves, para anticorpos de outros animais. Vide PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 publicado em 3 de março de 1994).

Uma região do anticorpo de camelídeo que é o domínio de variável simples pequeno identificada como V_{HH} pode ser obtida através de en-
 20 genharia genética para render uma proteína pequena tendo afinidade alta por um alvo, resultando em uma proteína derivada de anticorpo de peso molecular baixo conhecida como um "nanocorpo de camelídeo". Vide patente U. S. número 5.759,808 emitida em 2 de junho de 1998; vide também Stijle-
 mans, B., et al., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M., et al.,
 25 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M., et al. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 Int J Cancer 89: 456-62; e Lauwereys, M., et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Bibliotecas modificadas de anticorpos de camelídeo e fragmentos de anticorpo estão comercialmente disponíveis, por exemplo, de Ablynx, Ghent, Bélgica. Como com outros anti-
 30 corpos de origem não-humana, uma sequência de aminoácido de um anticorpo de camelídeo pode ser recombinantemente alterada para obter-se uma sequência que mais estritamente se assemelha a uma sequência hu-

mana, isto é, o nanocorpo pode ser "humanizado". Desse modo a antigenicidade natural baixa dos anticorpos de camélídeo para humanos pode ser também reduzida.

5 O nanocorpo de camélídeo tem um peso molecular aproximadamente de um décimo do de uma molécula de IgG humana, e a proteína tem um diâmetro físico de apenas alguns nanômetros. Uma consequência do tamanho pequeno é a habilidade dos nanocorpos de camélídeo de ligarem aos sítios antigênicos que são funcionalmente invisíveis às proteínas de anticorpo maiores, isto é, nanocorpos de camélídeo são úteis como reagentes para de-
10 tectar antígenos que são do contrário secretos usando técnicas imunológicas clássicas, e como possíveis agentes terapêuticos. Desse modo ainda outra consequência do tamanho pequeno é que um nanocorpo de camélídeo pode inibir como resultado de ligar-se a um sítio específico em um sulco ou fenda estreita de uma proteína alvo, e consequentemente pode servir em uma ca-
15 pacidade que mais estritamente se assemelha à função de um fármaco clássico de peso molecular baixo que à de um anticorpo clássico.

O peso molecular baixo e tamanho compacto também resultam em nanocorpos de camélídeo que são extremamente termoestáveis, estáveis em pH extremo e à digestão proteolítica, e fracamente antigênicos. Ou-
20 tra consequência é que os nanocorpos de camélídeo passam facilmente do sistema circulatório para tecidos, e até mesmo cruzam a barreira hematoencefálica e podem tratar distúrbios que afetam o tecido nervoso. Nanocorpos podem também facilitar o transporte de fármaco ao longo da barreira hematoencefálica. Vide pedido de patente U. S. 20040161738 publicado em 19 de
25 agosto de 2004. Estas características combinadas com a antigenicidade baixa em humanos indicam grande potencial terapêutico. Também, estas moléculas podem ser expressadas completamente em células procarióticas tais como *E. coli* e podem ser expressadas como proteínas de fusão com bacteriófago e são funcionais.

30 Consequentemente, uma característica da presente invenção é um anticorpo de camélídeo ou nanocorpo tendo afinidade alta por DKK1. Em certas modalidades aqui, o anticorpo de camélídeo ou nanocorpo é produzi-

do naturalmente no animal de camélídeo, isto é, é produzido pelo camélídeo seguindo imunização com DKK1 ou um fragmento de peptídeo do mesmo, usando técnicas descritas aqui para outros anticorpos. Alternativamente, o nanocorpo de camélídeo de anti-DKK1/4 de neutralização é modificado, isto é, produzido por seleção por exemplo de uma biblioteca de fago que exibe proteínas de nanocorpo de camélídeo apropriadamente mutageneizadas usando procedimentos de seleção com DKK1 e/ou DKK4 como um alvo como descrito nos exemplos aqui. Nanocorpos modificados podem também ser personalizados através de engenharia genética para ter uma meia-vida em um sujeito recipiente de 45 minutos a duas semanas.

Além dos anticorpos de Camélídeo, anticorpos de cadeia pesada ocorrem naturalmente em outro animal incluindo mas não limitado, por exemplo, certas espécies de tubarão e baiacu (vide, por exemplo, Publicação de PCT WO 03/014161). Embora domínios variáveis derivados de tais anticorpos de cadeia pesada possam ser usados na invenção, o uso de anticorpos de cadeia pesada derivados de Camélídeo e/ou das seqüências de domínio variáveis dos mesmos é preferido otimização, humanização, humanengineering, e outros e/ou para uso clínico em humanos.

ANTICORPOS CRIADOS E MODIFICADOS

Um anticorpo da invenção também pode ser preparado usando um anticorpo que tem uma ou mais das seqüências de V_H e/ou V_L mostradas aqui como material de partida para criar um anticorpo modificado, cujo anticorpo modificado pode ter propriedades alteradas do anticorpo de partida. Um anticorpo pode ser modificado modificando um ou mais resíduos dentro de uma ou ambas regiões variáveis (i. e., V_H e/ou V_L), por exemplo dentro de uma ou mais regiões de CDR e/ou dentro de uma ou mais regiões de estrutura. Adicional ou alternativamente, um anticorpo pode ser modificado modificando resíduos dentro da(s) região(ões) constante(s), por exemplo para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo.

Um tipo de engenharia de região variável que pode ser executada é enxerto de CDR. Anticorpos interagem predominantemente com antígenos alvos através de resíduos de aminoácido que estão localizados nas seis regi-

ões de determinação de complementaridade de cadeia pesada e leve (CDRs). Por este motivo, as seqüências de aminoácido dentro das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais que nas seqüências fora das CDRs. Porque as seqüências de CDR são responsáveis pela maioria das interações de anti-

5 corpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitem as propriedades de anticorpos de ocorrência natural específicos construindo vetores de expressão que incluem as seqüências de CDR do anticorpo de ocorrência natural específico enxertado nas seqüências de estrutura de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (vide, por exemplo, Riechmann, L. et al.,

10 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Patente U. S. Nº. 5.225.539 para Winter, e Patentes U.S. Nºs. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen et al.)

Conseqüentemente, outra modalidade da invenção refere-se a

15 um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, compreendendo uma região de V_H que compreende as seqüências de CDR1 tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20, 49-56; seqüências de CDR2 tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ

20 ID NOs: 2-20 e 57-64; seqüências de CDR3 tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20 e 65-72, respectivamente; e uma região de V_L que tem seqüências de CDR1 tendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 73-80; seqüências de CDR2 tendo uma seqüência de ami-

25 noácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 81-88; e seqüências de CDR3 que consistem em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 89-96, respectivamente. Desse modo, tais anticorpos contêm as seqüências de CDR de V_H e V_L de anticorpos monoclonais, ainda podem conter seqüências de es-

30 trutura diferentes destes anticorpos.

Tais seqüências de estrutura podem ser obtidas de bases de dados de DNA públicas ou referências publicadas que incluem seqüências

de gene de anticorpo de linha germinativa. Por exemplo, seqüências de DNA de linha germinativa para genes humanos de cadeia pesada e região de V_L podem ser encontrados na base de dados "VBase" de seqüência de linha germinativa humana (disponível na Internet em www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), como também em Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação de NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; e Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836; os conteúdos de cada uma destas são expressamente incorporados aqui por referência.

Um exemplo de seqüências de estrutura para o uso nos anticorpos da invenção são aquelas que são estruturalmente similares às seqüências de estrutura usadas por anticorpos selecionados da invenção, por exemplo, seqüências de consenso e/ou seqüências de estrutura usadas por anticorpos monoclonais da invenção. As seqüências de CDR1, 2 e 3 de V_H , e as seqüências de CDR1, 2 e 3 de V_L podem ser enxertadas nas regiões de estrutura que têm a seqüência idêntica àquela encontrada no gene de imunoglobulina de linha germinativa da qual a seqüência de estrutura deriva, ou as seqüências de CDR podem ser enxertadas nas regiões de estrutura que contêm uma ou mais mutações quando comparadas às seqüências de linha germinativa. Por exemplo, foi observado que em certas circunstâncias é benéfico mutar os resíduos dentro das regiões de estrutura para manter ou intensificar o antígeno que liga a habilidade do anticorpo (vide por exemplo, Patentes U.S. N^{os}. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen et al).

Outro tipo de modificação de região variável é mutar os resíduos de aminoácido dentro das regiões CDR1, CDR2 e/ou de CDR3 de V_H e/ou V_L , para assim melhorar uma ou mais propriedades de ligação (por exemplo, afinidade) do anticorpo de interesse, conhecido como "maturação de afinidade". Mutagênese loco-direcionada ou mutagênese mediada por PCR pode ser executada para introduzir a(s) mutação(ões) e o efeito na ligação de anticorpo, ou outra propriedade funcional de interesse, pode ser avaliado em ensaios *in vitro* ou *in vivo* como descritos aqui e fornecidos nos Exemplos.

Modificações conservadoras (como debatidas acima) podem ser introduzidas. As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácidos. Além disso, tipicamente não mais que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos são alterados dentro de uma região de CDR.

- 5 Conseqüentemente, em outra modalidade, a invenção fornece composição de anti-DKK1/4 de neutralização isolada, ou porções de ligação de antígeno da mesma, consistindo em uma região de V_H que tem: uma região de CDR1 de V_H que consiste em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que tem SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20, 49-56 ou uma seqüência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos quando comparadas às SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20, 49-56; uma região de CDR2 de V_H que tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20 e 57-64, ou uma seqüência de aminoácido que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos quando comparada às SEQ ID NOs: 2-20 e 57-64; uma região de CDR3 de V_H que tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20 e 65-72, ou uma seqüência de aminoácido que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos quando comparada às SEQ ID NOs: 2-20 e 65-72; uma região de CDR1 de V_L que tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 73-80, ou uma seqüência de aminoácido que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos quando comparada às SEQ ID NOs: 21-39 e 73-80; uma região de CDR2 de V_L que tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 81-88, ou uma seqüência de aminoácido que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos quando comparada às SEQ ID NOs: 21-39 e 81-88; e uma região de CDR3 de V_L que tem uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 89-96, ou uma seqüência de aminoácido que tem uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácidos quando comparada às SEQ ID

NOs: 21-39 e 89-96.

Anticorpos modificados da invenção incluem aqueles em que modificações foram feitas nos resíduos de estrutura dentro de V_H e/ou V_L , por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipicamente tais modificações de estrutura são feitas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, um método é para "re-mutar" um ou mais resíduos de estrutura para a seqüência de linha germinativa correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que sofreu mutação somática pode conter resíduos de estrutura que diferem da seqüência de linha germinativa da qual o anticorpo é derivado. Tais resíduos podem ser identificados comparando as seqüências de estrutura de anticorpo às seqüências de linha germinativa das quais o anticorpo é derivado. Para devolver as seqüências de região de estrutura em sua configuração de linha germinativa, as mutações somáticas podem ser "re-mutadas" para a seqüência de linha germinativa, por exemplo, por mutagênese dirigida ou mutagênese mediada por PCR. Tais anticorpos "re-mutados" são também intencionados a serem abrangidos pela invenção.

Outro tipo de modificação de estrutura envolve mutar um ou mais resíduos dentro da região de estrutura, ou até mesmo dentro de uma ou mais regiões de CDR, para remover os epítomos de célula T para assim reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Este método é também referido como "desimunização" e é descrito em mais detalhes na publicação de Patente U. S. N°. 20030153043 por Carr et al.

Além disso ou como alternativa para modificações feitas dentro da estrutura ou regiões de CDR, anticorpos da invenção podem ser modificados para incluir modificações dentro da região de Fc , tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como meia-vida de soro, fixação de complemento, ligação de receptor de Fc , e/ou citotoxicidade celular antígeno-dependente. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser modificado quimicamente (por exemplo, uma ou mais metades químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou ser modificado para alterar sua glicosilação, novamente alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma de estas modalidades é descrita em mais detalhes abai-

xo. A numeração de resíduos na região de Fc é à do índice EU de Kabat.

Em uma modalidade, a região de dobradiça de CH1 é modificada de modo que o número de resíduos de cisteína na região de dobradiça é alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Este método é descrito
5 também na Patente U. S. N°. 5.677.425 por Bodmer et al. O número de resíduos de cisteína na região de dobradiça de CH1 é alterado, por exemplo, para facilitar a montagem das cadeias leves e pesadas ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

Em outra modalidade, a região de dobradiça de FC de um anti-
10 corpo é mutada para diminuir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácido são introduzidas na região de interface de domínio de CH₂-CH₃ do fragmento de dobradiça de Fc de modo que o anticorpo tem ligação de proteína de Staphylococcyi A prejudicada (SpA) com relação à ligação de SpA de domínio de dobradiça de Fc
15 nativo. Este método é descrito em mais detalhes na Patente U. S. N°. 6.165.745 através de Ward et al.

Em outra modalidade, o anticorpo é modificado para aumentar sua meia-vida biológica. Vários métodos são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das mutações a seguir podem ser introduzidas: T252L, T254S,
20 T256F, como descritas na Patente U. S. N°. 6.277.375 para Ward. Alternativamente, para aumentar a metade vida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região de CH1 ou de C_L para conter um receptor de aproveitamento que liga o epítipo tirado das duas alças de um domínio de CH2 de uma região de Fc de uma IgG, como descrito nas Patentes U.S. N°. 25 5.869.046 e 6.121.022 por Presta et al.

Em ainda outras modalidades, a região de Fc é alterada substituindo pelo menos um resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido diferente para alterar as funções efetoras do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido
30 diferente de modo que o anticorpo tem uma afinidade alterada por um efector de ligando mas retém a habilidade de ligação de antígeno do anticorpo de origem. O efector de ligando ao qual afinidade é alterada pode ser, por exem-

plo, um receptor de Fc ou o componente de C1 de complemento. Este método é descrito em mais detalhes nas patentes U.S. N^{os}. 5.624.821 e 5.648.260, ambos por Winter et al.

5 Em outra modalidade, um ou mais aminoácidos selecionados de resíduos de aminoácido podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente de modo que o anticorpo tem ligação de C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente complemento (CDC) reduzida ou abolida. Este método é descrito em mais detalhes nas Patentes U.S. Nos. 6.194.551 através de Idusogie et al.

10 Em outra modalidade, um ou mais resíduos de aminoácido são alterados para assim alterar a habilidade do anticorpo para fixar o complemento. Este método é descrito também na Publicação de PCT WO 94/29351 pro Bodmer et al.

15 Em ainda outra modalidade, a região de Fc é modificada para aumentar a habilidade do anticorpo para mediar citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou aumentar a afinidade do anticorpo por um receptor de Fcγ modificando um ou mais aminoácidos. Este método é descrito também na Publicação de PCT WO 00/42072 por Presta. Além disso, os sítios de ligação em IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcγRn foram mapeados e variantes com ligação melhorada foram descritas
20 (vide Shields, R. L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

Em ainda outra modalidade, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, um anticorpo aglicosilado pode ser feito (isto é, o anticorpo carece de glicosilação). Glicosilação pode ser alterada, por exemplo,
25 para aumentar a afinidade do anticorpo por um "antígeno". Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, alterando um ou mais sítios de glicosilação dentro da seqüência de anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas resultando na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de estrutura de região variável para assim eliminar glicosilação naquele sítio. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo por antígeno. Um tal método é descrito em mais detalhes
30 nas Patentes U.S. N^{os}. 5.714.350 e 6.350.861 por Co et al.

Adicional ou alternativamente, um anticorpo pode ser feito tendo um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado tendo quantidades reduzidas de resíduos de fucosila ou um anticorpo tendo estruturas de bifurcação aumentadas de GlcNac. Tais padrões de glicosilação alterados foram demonstrados aumentar a habilidade de ADCC dos anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, expressando o anticorpo em uma célula hospedeira com maquinaria de glicosilação alterada. As células com maquinaria de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras em que para expressar anticorpos recombinantes da invenção para assim produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, EP 1.176.195 por Hang et al. descreve uma linhagem celular com um gene de FUT8 funcionalmente rompido, que codifica uma fucosil transferase de modo que os anticorpos expressos em uma tal linhagem celular exibem hipofucosilação. Publicação de PCT WO 03/035835 por Presta descreve uma linhagem celular de CHO variante, células de Lec13, com habilidade reduzida para ligar fucose aos carboidratos ligados a Asn(297), também resultando em hipofucosilação de anticorpos expressos naquela célula hospedeira (vide também Shields, R. L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Publicação de PCT WO 99/54342 por Umana et al. descreve linhagens celulares modificadas para expressar glicosil transferases modificadoreas de glicoproteína (por exemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII)) de modo que os anticorpos expressos nas linhagens celulares modificadas exibem estruturas de GlcNac de bifurcação aumentada que resulta em atividade de ADCC aumentada dos anticorpos (vide também Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

Outra modificação dos anticorpos aqui que é contemplada pela invenção é pegilação. Um anticorpo pode ser pegilado para, por exemplo, aumentar a meia-vida biológica (por exemplo, soro) do anticorpo. Para pegilar um anticorpo, o anticorpo, ou fragmento do mesmo, tipicamente é reagido com polietileno glicol (PEG), tal como um éster reativo ou derivado de aldeído de PEG, sob condições em que um ou mais grupos de PEG são ligados ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. A pegilação pode ser realizada por

uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Como aqui usado, o termo "polietileno glicol" é intencionado abranger quaisquer das formas de PEG que foram usadas para derivatizar outras proteínas, tais como mono (C1-C10)alcóxi- ou arilóxi-polietileno glicol ou polietileno glicol-maleimida. Em certas modalidades, o anticorpo para ser pegilado é um anticorpo aglicosilado. Métodos para proteínas de pegilação são conhecidos na técnica e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Vide por exemplo, EP 0 154 316 por Nishimura et al. e EP 0 401 384 por Ishikawa et al.

10 ANDAIMES DE NÃO-IMUNOGLOBULINA

Uma ampla variedade de anticorpo/estruturas ou andaimes de imunoglobulina pode ser empregada desde que o polipeptídeo resultante inclua pelo menos uma região de ligação que é específica para a proteína alvo. Tais estruturas ou andaimes incluem os cinco idiotipos principais de imunoglobulinas humanas, ou fragmentos dos mesmos (tais como aqueles revelados em outro lugar aqui), e incluem imunoglobulinas de outras espécies animais, preferivelmente tendo aspectos humanizados. Anticorpos de cadeia pesada simples tais como aqueles identificados em camelídeos e/ou tubarão são de interesse particular nesta consideração. Estruturas, andaimes e fragmentos novos continuam sendo descobertos e desenvolvidos por aqueles versados na técnica.

Em um aspecto, a invenção refere-se a gerar anticorpos com base em não-imunoglobulina usando andaimes de não-imunoglobulina sobre os quais CDRs da invenção podem ser enxertadas. Estruturas e andaimes de não-imunoglobulina conhecidas ou futuras podem ser empregados, 25 contanto que eles compreendam uma região de ligação específica para a proteína alvo de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 122. Tais compostos são conhecidos aqui como "polipeptídeos que compreendem uma região de ligação específica ao alvo". Estruturas ou andaimes de não-imunoglobulina conhecidas 30 incluem, mas não são limitados a, Adnectinas (fibronectina) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurique, Suíça), anticorpos de domínio (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) e Ablynx nv

(Zwijnaarde, Bélgica)), lipocalina (Anticalin) (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemanha), imuno-farmacêuticos modulares pequenos (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicorpos (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Proteína A (Affibody AG, Sweden) e afilina (gama-cristalina ou ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemanha).

(i) ADNECTINAS - TERAPÊUTICAS DE COMPOSTOS

Os andaimes de adnectina são com base no domínio de fibronectina do tipo III (por exemplo, o décimo módulo do domínio de fibronectina do tipo III (domínio 10 de Fn3). O domínio de fibronectina do tipo III tem 7 ou 8 filamentos betas que são distribuídos entre as duas folhas betas, que por si só embalam uma à outra para formar o núcleo da proteína, e também contendo alças (análogas às CDRs) que conecta os filamentos betas entre si e são expostos a solvente. Há pelo menos três tais alças em cada borda do sanduíche de folha beta onde a borda é o limite da proteína perpendicular para a direção dos filamentos betas. (US 6.818.418).

Estes andaimes com base em fibronectina não são uma imunoglobulina, embora a dobra geral esteja estritamente relacionada à do fragmento de anticorpo funcional menor, a região variável da cadeia pesada compreendendo a unidade de reconhecimento de antígeno inteira em IgG de camelo e lhama. Por causa desta estrutura, o anticorpo de não-imunoglobulina imita as propriedades de ligação de antígeno que são similares em Nature e afinidade às dos anticorpos. Estes andaimes podem ser usados em uma randomização de alça e estratégia de embaralhamento *in vitro* que é similar ao processo de maturação de afinidade dos anticorpos *in vivo*. Estas moléculas com base em fibronectina podem ser usadas como andaimes onde as regiões de alça da molécula podem ser substituídas com CDRs da invenção usando técnicas de clonagem padrões.

(ii) ANQUIRINA - PARES MOLECULARES

A tecnologia é com base em usar proteínas com módulos de repetição derivados de anquirina como andaimes para carregar regiões variáveis que podem ser usadas para ligar a alvos diferentes. O módulo de repetição de anquirina é um polipeptídeo de 33 aminoácidos que consiste em

duas hélices α antiparalelas e uma volta β . Ligação das regiões variáveis é principalmente otimizada usando exibição de ribossoma.

(iii) MAXICORPOS/AVÍMEROS - AVIDIA

Avímeros são derivados de proteína contendo domínio A natural tal como LRP-1. Estes domínios são por Nature usados para interações de proteína-proteína e em humano mais de 250 proteínas são estruturalmente com base nos domínios A. Avímeros consistem em vários monômeros diferentes de "domínio A" (2-10) ligados por meio de ligadores de aminoácido. Avímeros podem ser criados que podem ligar ao antígeno alvo usando a metodologia descrita em, por exemplo, 20040175756; 20050053973; 20050048512; e 20060008844.

(vi) PROTEÍNA A - AFFIBODY

Ligandos de afinidade de Affibody® são proteínas pequenas, simples compostas de um pacote de três hélices com base no andaime de um dos domínios de ligação de IgG da Proteína A. Proteína A é uma proteína de superfície da bactéria *Staphylococcus aureus*. Este domínio de andaime consiste em 58 aminoácidos destes 13 são randomizados para gerar bibliotecas de Affibody® com um número grande de variantes de ligando (Vide por exemplo, US 5.831.012). Moléculas de Affibody® imitam anticorpos, elas têm um peso molecular de 6 kDa, comparadas ao peso molecular de anticorpos que são de 150 kDa. Apesar de seu tamanho pequeno, o sítio de ligação das moléculas de Affibody® é similar ao de um anticorpo.

(v) ANTICALINAS - PIERIS

Anticalins® são produtos desenvolvidos pela companhia Pieris ProteoLab AG. Eles são derivados de lipocalinas, um grupo difundido de proteínas pequenas e robustas que estão usualmente envolvidos no transporte fisiológico ou armazenamento de compostos quimicamente sensíveis ou insolúveis. Várias lipocalinas naturais ocorrem em tecidos humanos ou líquidos do corpo.

A arquitetura da proteína são imunoglobulinas rememorativas, com alças hipervariáveis em cima de uma estrutura rígida. Porém, em contraste com anticorpos ou seus fragmentos recombinantes, lipocalinas são

compostos de uma cadeia de polipeptídeo simples com 160 a 180 resíduos de aminoácido, apenas sendo marginalmente maior que um domínio de imunoglobulina simples.

O conjunto de quatro alças que compõem a bolsa de ligação mostra plasticidade estrutural pronunciada e tolera uma variedade de cadeias laterais. O sítio de ligação pode desse modo ser reformado em um processo proprietário para reconhecer moléculas alvos prescritas de forma diferentes com afinidade alta e especificidade.

Uma proteína de família de lipocalina, a proteína de ligação de bilina (BBP) de *Pieris Brassicae* foi usada para desenvolver anticalinas através de mutageneização do conjunto de quatro alças. Um exemplo de um pedido de patente que descreve "anticalinas" é PCT WO 199916873.

(vi) AFFILIN - PROTEÍNAS DE SCIL

Moléculas de Affilin™ são proteínas de não-imunoglobulina pequenas que são projetadas para afinidades específicas para proteínas e moléculas pequenas. Novas moléculas de Affilin™ podem ser muito rapidamente selecionadas de duas bibliotecas, cada uma destas é com base em uma proteína de andaime derivada humano diferente.

Moléculas de Affilin™ não mostram nenhuma homologia estrutural às proteínas de imunoglobulina. Proteínas de Scil empregam dois andaimes de Affilin™, um destes é uma proteína da lente dos olhos gama cristalina, estrutural, humana e o outro é proteínas da superfamília de "ubiquitina". Ambos os andaimes humanos são muito pequenos, mostram estabilidade de temperatura alta e são quase resistentes às alterações de pH e agentes desnaturantes. Esta estabilidade alta é principalmente devido à estrutura de folha beta expandida das proteínas. Exemplos de proteínas derivadas cristalinas gama são descritos em WO200104144 e exemplos de proteínas "semelhantes à ubiquitina" são descritos em WO2004106368.

MÉTODOS DE CRIAR ANTICORPOS

Como debatido acima, os anticorpos de anti-DKK1 tendo seqüências de V_H e de V_L ou seqüências de cadeia pesada e leve de comprimento total mostradas aqui podem ser usadas para criar novos anticorpos

de anti-DKK1/4 modificando as seqüências de cadeia pesada e/ou de cadeia leve de comprimento total, seqüências de V_H e/ou V_L , ou a(s) região(ões) constante(s) ligada(s) a estas. Desse modo, em outro aspecto da invenção, as características estruturais de um anticorpo de anti-DKK1 da invenção são

5 usadas para criar anticorpos de anti-DKK1/4 estruturalmente relacionados retendo pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tal como ligar a DKK1 ou DKK4 humanos ou ambos e também inibindo uma ou mais propriedades funcionais de DKK1 ou DKK4 ou ambos.

Por exemplo, uma ou mais regiões de CDR dos anticorpos da

10 presente invenção, ou mutações dos mesmos, podem ser combinados re-combinantemente com regiões de estrutura conhecidas e/ou outras CDRs para criar anticorpos de anti-DKK1 adicionais, recombinalemente modificados, da invenção, como debatido acima. Outros tipos de modificações incluem aquelas descritas na seção anterior. O material de partida para o método

15 de engenharia é uma ou mais das seqüências de V_H e/ou V_L fornecidas aqui, ou uma ou mais regiões de CDR das mesmas. Para criar o anticorpo modificado, não é necessário preparar de fato (isto é, expressar como uma proteína) um anticorpo que tem uma ou mais das seqüências de V_H e/ou V_L fornecidas aqui, ou uma ou mais regiões de CDR das mesmas. Do contrário, a

20 informação contida na(s) seqüência(s) é usada como o material de partida para criar uma(s) seqüência(s) de "segunda geração" derivada(s) da(s) seqüência(s) original(is) e depois a seqüência(s) de "segunda geração" é preparada e expressada como uma proteína.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a invenção provê um

25 método para preparar um anticorpo de anti-DKK1 que consiste em: uma seqüência de anticorpo de região de V_H tendo uma seqüência de CDR1 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20, 49-56, uma seqüência de CDR2 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20 e 57-64 e/ou uma seqüência de CDR3 selecionada do grupo que consiste

30 em SEQ ID NOs: 2-20 e 65-72; e uma seqüência de anticorpo de região de V_L que tem uma seqüência de CDR1 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 73-80, uma seqüência de CDR2 selecionada do grupo

que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 81-88 e/ou uma sequência de CDR3 selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-39 e 89-96; alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da sequência de anticorpo de região de V_H e/ou a sequência de anticorpo de região de V_L para criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e expressar a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a invenção provê um método para preparar um anticorpo de anti-DKK1 que consiste em: uma sequência de anticorpo de cadeia pesada de comprimento total que tem uma sequência selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 115-117; e uma sequência de anticorpo de cadeia leve de comprimento total que tem uma sequência selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 111-114; alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da sequência de anticorpo de cadeia pesada de comprimento total e/ou da sequência de anticorpo de cadeia leve de comprimento total para criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e expressar a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

Em outra modalidade, a invenção provê um método para preparar uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização otimizada para expressão mamífera que consiste em: uma sequência de anticorpo de região de V_H que tem uma sequência selecionada do grupo de SEQ ID NO: 119; e uma sequência de anticorpo de região de V_L que tem uma sequência selecionada do grupo de SEQ ID NO: 118; alterar pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da sequência de anticorpo de região de V_H e/ou da sequência de anticorpo de região de V_L para criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e expressar a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

Técnicas de biologia molecular padrões podem ser usadas para preparar e expressar a sequência de anticorpo alterada. O anticorpo codificado pela(s) sequência(s) de anticorpo alterada(s) é um que retém uma, algumas ou todas as propriedades funcionais das composições de anti-DKK1/4 de neutralização descritas aqui cujas propriedades funcionais incluem, mas não são limitadas a, especificamente ligar a DKK1 humano; e o anticorpo apresenta pelo menos uma das propriedades funcionais a seguir: o

anticorpo inibe ligação de proteína de DKK1 ao receptor de DKK1, ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando osteólise, ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ assim prevenindo ou melhorando lesões osteolíticas, ou o anticorpo inibe ligação de receptor de DKKQ prevenindo ou melhorando câncer.

O anticorpo alterado pode exibir uma ou mais, duas ou mais, ou três ou mais das propriedades funcionais debatidas acima.

As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser avaliadas usando ensaios padrões disponíveis na técnica e/ou descritos aqui, tais como aqueles expostos nos Exemplos (por exemplo, ELISAs).

Em certas modalidades dos métodos de criar anticorpos da invenção, mutações podem ser introduzidas fortuita ou seletivamente ao longo de toda ou parte de uma sequência de codificação de anticorpo de anti-DKK1 e os anticorpos de anti-DKK1 modificados resultantes podem ser triados para ligar atividade e/ou outras propriedades funcionais como descritas aqui. Os métodos mutacionais foram descritos na técnica. Por exemplo, Publicação de PCT WO 02/092780 por Short descreve métodos para criar e triar mutações de anticorpo usando mutagênese de saturação, montagem de ligação sintética, ou uma combinação das mesmas. Alternativamente, Publicação de PCT WO 03/074679 por Lazar et al. descreve métodos de usar métodos de triagem computacionais para otimizar propriedades físico-químicas dos anticorpos.

A região constante de Fc de um anticorpo é crítica para determinar a meia-vida de soro e funções efetoras, isto é, as atividades citotóxicidade de célula dependente de anticorpo (ADCC) ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Pode-se criar mutantes específicos do fragmento de Fc para alterar a função efetora e/ou meia-vida de soro (vide, por exemplo, Xencor Technology, vide também, por exemplo, WO2004029207).

Um método para alterar a função efetora e meia-vida de soro de um anticorpo é enxertar a região variável de um fragmento de anticorpo com um fragmento de Fc tendo a função efetora apropriada. Isótipos de IgG1 ou de IgG4 podem ser selecionados para célula atividade mortal, enquanto que

isótipo de IgG2 pode ser usado para anticorpos silenciosos ou neutralizantes (sem atividade mortal de célula).

Anticorpos silenciosos com meia-vida de soro longa podem ser obtidos fazendo fusão quimérica de regiões variáveis de um anticorpo com
 5 uma proteína de soro tal como HSA ou uma ligação de proteína a tal proteína de soro, tal como proteína de ligação de HSA.

Funções efetoras podem também ser alteradas modulando o padrão de glicosilação do anticorpo. Glycart (por exemplo, US6.602.684), Biowa (por exemplo, US6.946.292) e Genentech (por exemplo
 10 WO03/035835) criou linhagens celulares mamíferas para produzir anticorpos com função efetora aumentada ou diminuída. Especialmente, anticorpos não fucosilados terão atividades de ADCC intensificadas. Glycofi também desenvolveu linhagens celulares de levedura capazes de produzir glicoformas específicas de anticorpos.

15 MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO QUE CODIFICAM ANTICORPOS DA INVENÇÃO

Outro aspecto da invenção refere-se às moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção. Exemplos de seqüências de nucleotídeo de cadeia leve de comprimento total parentais são mostradas
 20 nas SEQ ID NOs: 97-100. Exemplos de seqüências de nucleotídeo de cadeia pesada de comprimento total parentais são mostradas nas SEQ ID NOs: 101-103. Exemplos de seqüências de nucleotídeo de cadeia leve de comprimento total otimizadas para expressão em uma célula são mostrados nas SEQ ID NOs: 104-107. Exemplos de seqüências de nucleotídeo de ca-
 25 deia pesada de comprimento total otimizadas para expressão em uma célula são mostrados nas SEQ ID NOs: 108-110.

Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisado de célula, ou ácidos nucleicos podem ser em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é "isolado"
 30 ou "tornado substancialmente puro" quando purificado longe de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, através de técnicas padrões, incluindo trata-

mento alcalino/SDS, bandagem de CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e similares bem conhecidos na técnica. Vide, F. Ausubel, et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing e Wiley Interscience, Nova Iorque. Um ácido nucléico da invenção pode ser, por exemplo, DNA ou RNA e pode ou não conter seqüências intrônicas. Em uma modalidade, o ácido nucléico é uma molécula de cDNA. O ácido nucléico pode estar presente em um vetor tal como um vetor de exibição de fago, ou em um vetor de plasmídeo recombinante.

Os ácidos nucléicos da invenção podem ser obtidos usando técnicas de biologia moleculares padrões. Para anticorpos expressos por hibridomas (por exemplo, hibridomas preparados de camundongos transgênicos que carregam genes de imunoglobulina humana como descritos mais abaixo), cDNAs que codificam as cadeias leves e pesadas do anticorpo feito pelo hibridoma podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão ou técnicas de clonagem de cDNA. Para anticorpos obtidos de uma biblioteca de genes de imunoglobulina (por exemplo, usando técnicas de exibição de fago), ácido nucléico que codifica o anticorpo pode restabelecer de vários clones de fago que são os membros da biblioteca.

Uma vez fragmentos de DNA que codificam os segmentos de V_H e V_L são obtidos, estes fragmentos de DNA podem ser também manipulados por técnicas de DNA recombinantes padrões, por exemplo para converter os genes de região variáveis para genes de cadeia de anticorpo de comprimento total, para genes de fragmento de F_{ab} ou para um gene de scFv. Nestas manipulações, um fragmento de DNA de codificação de V_L ou V_H é operativamente ligado a outra molécula de DNA, ou a um fragmento que codifica outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligador flexível. O termo "operativamente ligado", como usado neste contexto, é intencionado significar que os dois fragmentos de DNA são unidos de uma maneira funcional, por exemplo, de modo que as seqüências de aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam dentro da estrutura, ou de modo que a proteína seja expressa sob controle de um promotor desejado.

O DNA isolado que codifica a região de V_H pode ser convertido a

um gene de cadeia pesada de comprimento total operativamente ligando o DNA de codificação de V_H a outra molécula de DNA que codifica regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As seqüências de genes de região constante de cadeia pesada humanos são conhecidas na técnica (vide por exemplo, Kabat, E. A., al de el., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação de NIH No. 91-3242) e fragmentos de DNA que abrangem estas regiões podem ser obtidos por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD. A um fragmento de gene de cadeia pesada de F_{ab} , o DNA de codificação de V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA que codifica apenas a região constante de CH1 de cadeia pesada.

O DNA isolado que codifica a região de V_L pode ser convertido em um gene de cadeia leve de comprimento total (como também em um gene de cadeia leve de F_{ab}) operativamente ligando o DNA de codificação de V_L a outra molécula de DNA que codifica a região constante de cadeia leve, C_L . As seqüências dos genes de região constante de cadeia leve humanos são conhecidas na técnica (vide por exemplo, Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação de NIH No. 91-3242) e fragmentos de DNA que abrangem estas regiões podem ser obtidas por amplificação de PCR padrão. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante capa ou uma lambda.

Para criar um gene de scFv, os fragmentos de DNA de codificação de V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um ligador flexível, por exemplo, codificando a seqüência de aminoácido (Gly4 - Ser)₃, de modo que as seqüências de V_H e V_L podem ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões de V_L e V_H unidas pelo ligador flexível (vide por exemplo, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990 Nature 348:552-554).

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS DA INVENÇÃO

Anticorpos monoclonais (mAbs) podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional por exemplo, a técnica de hibridação de célula somática padrão de Kohler e Milstein, 1975 Nature 256: 495. Muitas técnicas para produzir anticorpo monoclonal podem ser empregadas por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

Um sistema animal para preparar hibridomas é o sistema murino. Produção de hibridoma no camundongo é um procedimento bem estabelecido. Protocolos e técnicas de imunização para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Pares de fusão (por exemplo, células de mieloma murino) e procedimentos de fusão são também conhecidos.

Anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal murino preparado como descrito acima. DNA que codifica as imunoglobulinas de cadeia pesada e leve pode ser obtido do hibridoma murino de interesse e modificado para conter sequências de imunoglobulina não-murinas (por exemplo, humanas) usando técnicas de biologia moleculares padrões. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis murinas podem ser ligadas às regiões constantes humanas usando métodos conhecidos na técnica (vide por exemplo, Patente U. S. N°. 4.816.567 para Cabilly et al.). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões de CDR murinas podem ser inseridas em uma estrutura humana usando métodos conhecidos na técnica. Vide por exemplo, Patente U. S. N°. 5225539 para Winter, e Patentes U.S. N°. 5530101; 5585089; 5693762 e 6180370 para Queen et al.

Em uma certa modalidade, os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos direcionados contra DKK1 podem ser gerados usando camundongos transgênicos ou transcromossômicos que carregam partes do sistema imune humano ao invés do sistema de camundongo. Estes camundongos transgênicos e transcromossômicos incluem camundongos referidos aqui como camundongos HuMAb e camundongos KM, respectivamente, e são coletivamente refe-

ridos aqui como "camundongos de Ig humana".

O camundongo HuMAb® (Medarex, Inc.) contém miniloci de gene de imunoglobulina humana que codificam as seqüências de imunoglobulina de cadeia pesada (μ e γ) e cadeia leve κ humanas não-rearranjadas, juntamente com mutações alvejadas que inativam os loci endógenos de cadeia μ e κ (vide por exemplo, Lonberg, et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859). Conseqüentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM de camundongo ou κ , e em resposta à imunização, os transgenes de humano de cadeia pesada e leve introduzidos sofrem troca de classe e mutação somática para gerar IgG κ humana de afinidade alta monoclonal (Lonberg, N. et al., 1994 supra; revisado em Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. e Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, e Harding, F. E Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). A preparação e uso de camundongos HuMAb, e as modificações genômicas carregadas por tais camundongos, é também descrita em Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; e Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, os conteúdos de todas estas são aqui especificamente incorporados por referência em sua totalidade. Vide também, Patentes U.S. N^{os}. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todas para Lonberg e Kay; Patente U. S. N^o. 5.545.807 para Surani et al.; Publicação de PCT N^{os}. WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todas para Lonberg e Kay; e Publicação de PCT No. WO 01/14424 para Korman et al.

Em outra modalidade, anticorpos humanos da invenção podem ser suscitados usando um camundongo que carrega seqüências de imunoglobulina humana em transgenes e transcromossomos tais como um camundongo que carrega um transgene de cadeia pesada humano e um

transcromossomo de cadeia leve humana. Tais camundongos, referidos aqui como "camundongos KM", são descritos em detalhes na Publicação de PCT WO 02/43478 para Ishida et al.

5 Ainda também, sistemas de animal transgênicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser usados para suscitar anticorpos de anti-DKK1 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como o Xenomouse (Abgenix, Inc.) pode ser usado. Tais camundongos são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os}. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 e
10 6.162.963 para Kucherlapati et al.

Além disso, sistemas animais transcromossômicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser usados para suscitar anticorpos de anti-DKK1 da invenção. Por exemplo, camundongos que carregam um transcromossomo de cadeia pesada humano e um transcromossomo de cadeia leve humano, referidos como "camundongos de TC", pode ser usados; tais camundongos são descritos em Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Além disso, vacas que carregam os transcromossomos de cadeia pesada e leve humanos foram descritos na técnica (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894) e
15 podem ser usados para suscitar anticorpos de anti-DKK1 da invenção.

Anticorpos monoclonais humanos da invenção podem também ser preparado usando métodos de exibição de fago para triar bibliotecas de genes de imunoglobulina humana. Tais métodos de exibição de fago para isolar anticorpos humanos são estabelecidos na técnica. Vide por exemplo:
25 patentes U.S. N^{os}. 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 para Ladner et al.; Patentes U.S. N^{os}. 5.427.908 e 5.580.717 Dotar et al.; Patentes U.S. N^{os}. 5.969.108 e 6.172.197 para McCafferty et al.; e Patentes U.S. N^{os}. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 para Griffiths et al.

30 Anticorpos monoclonais humanos da invenção podem também ser preparados usando camundongos de SCID dentro dos quais células imunes humanas foram reconstituídas de modo que uma resposta de anti-

corpo humana possa ser gerada sob imunização. Tais camundongos são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os}. 5.476.996 e 5.698.767 para Wilson et al.

- 5 Triagens de bibliotecas de anticorpo humano podem ser usadas para identificar um anticorpo da invenção. Escolha de tecnologias de triagem inclui, mas não é limitada, por exemplo exibição de fago (Morphosys), o tipo de bibliotecas (por exemplo, Biblioteca de HuCal de Morphosys), tecnologia de maturação de afinidade e seqüência de otimização de códon também.

GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS CONTRA DKK1.

- 10 DKK1 humano recombinante purificado derivado de *E. coli*, baculovírus ou células de HEK-EBNA, ou DKK1 humano recombinante purificado conjugado com hemocianina de lapa (KLH), é usado como o antígeno.

- Anticorpos monoclonais completamente humanos para DKK1 são preparados usando cepas de HCo7, HCo12 e HCo17 de camundongos transgênicos de HuMab e a cepa de KM de camundongos transcromossômicos transgênicos, cada um destes expressam genes de anticorpo humano. Em cada uma destas cepas de camundongo, o gene de cadeia leve capa de camundongo endógeno pode ser de forma homozigota rompido como descrito em Chen et al., 1993 EMBO J.12:811-820 e o gene de cadeia pesada de camundongo endógeno pode ser de forma homozigota rompido como descrito no Exemplo 1 da Publicação de PCT WO 01109187. Cada uma destas cepas de camundongo carregam um transgene capa de cadeia leve humano, KCo5, como descrito em Fishwild et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851. A cepa de HCo7 carrega o transgene de cadeia pesada humano HCo7 como descrito nas Patentes U.S. N^{os}. 5.545.806; 5.625.825; e 5.545.807. A cepa de HCo12 carrega o transgene de cadeia pesada humano HCo12 como descrito no Exemplo 2 da Publicação de PCT WO 01/09187. A coloração de HCo17 carrega o transgene de cadeia pesada humano HCo17. A cepa KNM contém o transcromossomo SC20 como descrito na Publicação de PCT WO 02/43478.
- 30

Para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos para DKK1, camundongos HuMab e camundongos KM são imunizados com

DKK1 recombinante purificado derivado de *E. coli* ou conjugado de DKK1-KLH como antígeno. Esquemas de imunização geral para camundongos HuMab são descritos em Lonberg, N., et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D., et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851 e Publicação de PCT WO 98/24884. Os camundongos são 6-16 semanas de idade na primeira infusão de antígeno. Uma preparação recombinante purificada (5-50 µg) de antígeno de DKK1 (por exemplo, purificado de células de *E. coli* transfeccionadas que expressam DKK1) é usada para imunizar os camundongos HuMab e camundongos KM intraperitoneal, subcutaneamente (Sc) ou através de injeção nas patas.

Camundongos transgênicos são imunizados duas vezes com antígeno em adjuvante de Freund completo ou adjuvante de Ribi ou intraperitoneal (IP), subcutaneamente (Sc) ou através das patas (FP), seguido por 3-21 dias de imunização IP, Sc ou FP (até um total de 11 imunizações) com o antígeno em adjuvante de Freund incompleto ou Ribi. A resposta imune é monitorada através de sangria retro-orbital. O plasma é triado por ELISA, e camundongos com titulações suficientes de imunoglobulina humana de anti-DKK1 são usados para fusões. Camundongos são reforçados intravenosamente com antígeno 3 e 2 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Tipicamente, 10-35 fusões são executadas para cada antígeno. Vários doze camundongos são imunizados para cada antígeno. Um total de 82 camundongos das cepas de camundongos HCo7, HCo12, HCo17 e KM são imunizados com DKK1.

Para selecionar anticorpos produtores de camundongos HuMab ou KM que ligou a DKK1, soros de camundongos imunizados podem ser testados por ELISA como descrito por Fishwild, D., et al., 1996. Brevemente, as placas de microtitulação são revestidas com DKK1 recombinante purificado de *E. coli* a 1-2 µg/ml em PBS, 50 µl/poços incubados a 4°C durante a noite depois bloqueados com 200 µl/poço de 5% de soro de galinha em PBS/Tween (0,05%). Diluições de plasma de camundongos imunizados com DKK1 são adicionadas a cada poço e incubadas durante 1-2 horas em temperatura ambiente. As placas são lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com um anticorpo policlonal

de Fc de IgG anti-humana de cabra conjugado com peroxidase de raiz-forte (HRP) durante 1 hora em temperatura ambiente. Após lavar, as placas são desenvolvidas com substrato de ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) e analisadas através de espectrofotômetro a OD 415-495. Camundongos que desenvolveram as titulações mais altas de anticorpos de anti-DKK1 são usados para fusões. As fusões são executadas e sobrenadantes de hibridoma são testados para atividade de anti-DKK1 por ELISA.

Os esplenócitos de camundongo, isolados dos camundongos Hu-Mab e camundongos KM, são fundidos com PEG para uma linhagem celular de mieloma de camundongo com base em protocolos padrões. Os hibridomas resultantes são depois triados para a produção de anticorpos antígeno-específicos. As suspensões de célula simples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados são fundidas em um quarto do número de células de mieloma de camundongo de SP2/0 não-segregantes (ATCC, CRL 1581) com 50% de PEG (Sigma). Células são banhadas em aproximadamente 1×10^5 /poço em placa de microtitulação de fundo chato, seguido por incubação de cerca de duas semanas em meio seletivo contendo 10% de soro bovino fetal, 10% de meio de P388D 1 (ATCC, CRL TIB-63) condicionado, 3-5% de origen (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013, com glicose alta, L glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Após 1-2 semanas, as células foram cultivadas em meio em que HAT é substituído com HT. Poços individuais são depois triados por ELISA para anticorpos de IgG monoclonal humana de anti-DKK1. Uma vez crescimento de hibridoma extensivo ocorreu, o meio é usualmente monitorado após 10-14 dias. Os hibridomas de segregação de anticorpo são recolocados na placa, triados novamente e, se ainda positivos para IgG humana, anticorpos monoclonais de anti-DKK1 são subclonados pelo menos duas vezes limitando a diluição. Os subclones estáveis são depois cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para outra caracterização.

IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS DE IG HUMANA

Quando camundongos de Ig humana forem usados para suscitar

anticorpos humanos da invenção, tais camundongos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecidos de antígeno de DKK1 e/ou DKK1 recombinante, ou uma proteína de fusão de DKK1, como descrito por Lonberg, N., et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D., et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851; e Publicação de PCT WO 98124884 e WO 01/14424. Os camundongos podem ser 6-16 semanas de idade na primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5-50 µg) de antígeno de DKK1 pode ser usada para imunizar os camundongos de Ig humana intraperitonealmente.

Procedimentos detalhados para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos para DKK1 são descritos acima. Experiência cumulativa com vários antígenos mostrou que os camundongos transgênicos respondem quando inicialmente imunizados de modo intraperitoneal (IP) com antígeno no adjuvante de Freund completo, seguido por imunizações IP a cada duas semanas (até um total de 6) com antígeno no adjuvante de Freund incompleto. Porém, adjuvantes diferentes de Freund são também observados ser eficazes. Além disso, células inteiras na ausência de adjuvante são observadas ser altamente imunogênicas. A resposta imune pode ser monitorada no curso do protocolo de imunização com amostras de plasma que são obtidas através de sangria retro-orbital. O plasma pode ser triado por ELISA, e os camundongos com titulações suficientes de imunoglobulina humana de anti-DKK1 podem ser usados para fusões. Os camundongos podem ser reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. É esperado que 2-3 fusões para cada imunização possam necessitar ser executadas. Entre 6 e 24 camundongos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Usualmente cepas de HCo7 e HCo12 são usadas. Além disso, 12 transgenes de HCo7 e HCo podem ser procriados juntos em um camundongo simples tendo dois transgenes de cadeia pesada humanos diferentes (HCo7/HCo12).

30 GERAÇÃO DE HIBRIDOMAS QUE PRODUZ ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS

Para gerar hibridomas que produzem anticorpos monoclonais hu-

manos da invenção, esplenócitos e/ou células de linfonodo podem ser isolados de camundongos imunizados e fundidos com uma linhagem celular imortalizada apropriada, tal como uma linhagem celular de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser triados para a produção de anticorpos antígeno-específicos. Por exemplo, suspensões de célula simples de linfócitos esplenicos de camundongos imunizados podem ser fundidas com um sexto do número de células de mieloma de camundongo não-segregantes P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com 50% de PEG. Células são banhadas em aproximadamente 2 x 145 em placas de microtitulação de fundo chato, seguido por uma incubação de duas semanas em meio seletivo contendo 20% de Soro de Clone Fetal, 18% de meios condicionados "653", 5% de origen (IGEN), 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2 mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina e 1X HAT (Sigma; HAT é adicionado 24 horas após a fusão). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio em que HAT é substituído com HT. Poços individuais podem depois ser triados por ELISA para anticorpos de IgM e de IgG monoclonais humanas. Uma vez crescimento de hibridoma extensivo ocorre, o meio pode ser usualmente observado após 10-14 dias. Os hibridomas de segregação de anticorpo podem ser recolocados em placa, triados novamente, e se ainda positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes limitando a diluição. Os subclones estáveis podem depois ser cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

Para purificar anticorpos monoclonais humanos, os hibridomas selecionados podem ser crescidos em frascos agitadores de dois litros para purificação do anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG eluída pode ser verificada por eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para assegurar pureza. A solução de tampão pode ser trocada em PBS, e a concentração pode ser determinada por OD₂₈₀ usando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos

monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C .

GERAÇÃO DE TRANSFECTOMAS PRODUZINDO ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos da invenção também podem ser produzidos em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinantes e métodos de transfecção de gene como são bem conhecidos na técnica (por exemplo, Morrison, S., (1985) Science 229:1202).

Por exemplo, para expressar os anticorpos, ou fragmentos de anticorpo dos mesmos, DNAs que codificam cadeias leves e pesadas de comprimento parcial ou total podem ser obtidos através de técnicas de biologia molecular padrões (por exemplo, amplificação de PCR ou clonagem de cDNA usando um hibridoma que expressa o anticorpo de interesse) e os DNAs podem ser inseridos nos vetores de expressão de modo que os genes são operativamente ligados às seqüências de controle transcricionais e translacionais. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" é intencionado significar que um gene de anticorpo é ligado em um vetor de modo que as seqüências de controle transcricionais e translacionais dentro do vetor sirvam sua função intencionada de regular a transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as seqüências de controle de expressão são escolhidos para ser compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vetor separado ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão através de métodos padrões (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento de gene de anticorpo e vetor, ou ligação de extremidade cega se nenhum sítio de restrição estiver presente). As regiões leves e de V_H dos anticorpos descritos aqui podem ser usadas para criar genes de anticorpo de comprimento total de qualquer isótipo de anticorpo os inserindo em vetores de expressão que já codificam regiões constantes de cadeia pesada e de cadeia leve do isótipo desejado de modo que o segmento de V_H é operati-

vamente ligado ao(s) segmento(s) de CH dentro do vetor e o segmento de V_L é operativamente ligado ao segmento de C_L dentro do vetor. Adicional ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor de modo que o peptídeo sinal é ligado dentro da estrutura ao término amino do gene de cadeia de anticorpo. O peptídeo sinal pode ser um peptídeo sinal de imunoglobulina ou um peptídeo sinal heterólogo (isto é, um peptídeo sinal de uma proteína de não-imunoglobulina).

Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção carregam seqüências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. O termo "seqüência reguladora" é intencionado incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou translação dos genes de cadeia de anticorpo. Tais seqüências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). É para ser apreciado por aqueles versados na técnica que o projeto do vetor de expressão, incluindo a seleção de seqüências reguladoras, pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Seqüências reguladoras para expressão de célula hospedeira mamífera incluem elementos virais que direcionam níveis altos de expressão de proteína em células mamíferas, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de citomegalovírus (CMV), Símio Vírus 40 (SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (Ad-MLP)), e polioma. Alternativamente, seqüências reguladoras não-virais podem ser usadas, tais como o promotor de ubiquitina ou promotor de P-globina. Ainda também, elementos reguladores compostos de seqüências de fontes diferentes, tais como o sistema de promotor de SRa contendo seqüências do promotor prematuro de SV40 e a repetição terminal longa de vírus de leucemia de célula T humano tipo 1 (Takebe, Y., et al., 1988 Mol.

Cell. Biol. 8:466-472).

Além dos genes de cadeia de anticorpo e seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem carregar seqüências adicionais, tais como seqüências que regulam a replicação do
5 vetor nas células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção das células hospedeiras às quais o vetor foi introduzido (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas por Axel et al.). Por exemplo, tipicamente o gene de marcador selecionável confere resistên-
10 cia a fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira à qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis incluem o gene de diidrofolato reductase (DHFR) (para uso em células hospedeiras de dhfr com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418).

15 Para expressão das cadeias leves e pesadas, o(s) vetor(es) de expressão codificando as cadeias pesadas e leves são transfeccionados em uma célula hospedeira através de técnicas padrões. As várias formas do termo "transfecção" são intencionada a abranger uma ampla variedade de técnicas comumente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospe-
20 deira procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção de DEAE-dextrana e outros. É teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas. Expressão de anticorpos em células eucarióticas, em particular células hospedeiras mamíferas, é debatida porque tais células eucarióticas, e
25 em particular células mamíferas, são mais prováveis que as células procarióticas de montar e segregar um anticorpo corretamente dobrado e de ligação de antígeno. Expressão procariótica dos genes de anticorpo foi relatada ser ineficaz para a produção de rendimentos altos de anticorpo ativo (Chefe, M. A. e Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13).

30 Células hospedeiras mamíferas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem Ovário de Hamster chinês (células CHO) (incluindo células de CHO de dhfr, descrito por Urlaub e Chasin, 1980

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 usado com um marcador de FR de DH selecionável, por exemplo, como descrito em R. J. Kaufman e P. A. Sharp 1982 Mol Biol. 159:601-621, células de mieloma de NSO, células COS e células SP2. Em particular, para uso com células de mieloma de NSO, outro sistema de expressão é o sistema de expressão de gene de GS mostrado em WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338.841. Quando vetores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpo são introduzidos nas células hospedeira mamíferas, os anticorpos são produzidos cultivando as células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou secreção do anticorpo no meio de cultura onde as células hospedeiras são crescidas. Os anticorpos podem restabelecer-se do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrões.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo uma ou uma combinação de uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização, ou de porção(ões) de ligação de antígeno da mesma, da presente invenção, formuladas juntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável. Tais composições podem incluir um ou uma combinação de (por exemplo, dois ou mais diferentes) anticorpos, ou imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunoconjugados ou biespecíficos) que ligam a epítomos diferentes no antígeno alvo ou que têm atividades complementares.

Composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes.

Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um anticorpo de anti-DKK1 da presente invenção combinado com pelo menos um outro agente anti-inflamatório ou antiosteoprotético. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados em terapia de combinação são descritos em maior detalhe abaixo na seção sobre usos dos anticorpos da invenção.

Como aqui usado, "o veículo farmaceuticamente aceitável" inclui quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes de absorção, e outros que são fisiologicamente compatíveis. O veículo deveria ser adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da rota de administração, o composto ativo, isto é, anticorpo, imunconjugado, ou molécula biespecífica, pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis. Um "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto de origem e não dá efeito toxicológico indesejado (vide por exemplo, Berge, S. M., et al., 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não-tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, hidrobromico, hidroiodico, fosforoso e outros, como também de ácidos orgânicos não-tóxicos tais como ácidos alifáticos mono e di-carboxílicos, ácidos alcanóicos fenil-substituídos, ácidos alcanóicos de hidróxi, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e outros. Sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalinos terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e outros, como também de aminas orgânicas não-tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e outros.

Uma composição farmacêutica da invenção também pode incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfato de sódio, sulfito de sódio e outros; antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno bu-

tilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol, e outros; e agentes quelantes de metal, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e outros.

Exemplos de veículos aquosos e não-aquosos adequados que
5 podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e outros), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como azeite de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. Fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de re-
10 vestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

Estas composições podem também conter adjuvantes tais como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. Prevenção da presença de microorganismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização, supra, como pela inclusão de
15 vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol, e outros. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e outros nas composições. Além disso, absorção prolongada da forma farmacêutica injetável
20 pode ser provocada pela inclusão de agentes tais como os que tardam a absorção, monoestearato de alumínio e gelatina.

Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes
25 para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto desde que quaisquer meios convencionais ou agente sejam incompatíveis com o composto ativo, uso dos mesmos nas composições farmacêuticas da invenção é contemplado. Compostos ativos adicionais podem também ser incorporados nas composições.

30 Composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra

estrutura ordenada adequada para concentração de fármaco alta. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e outros), e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, pode-se incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada incluindo na composição um agente que tarda a absorção por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de componentes enumerados acima, conforme requerido, seguido por microfiltração de esterilização. Em geral, dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril contendo um meio de dispersão básico e os outros componentes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento (liofilização) que rende um pó do componente ativo mais qualquer componente desejado adicional de uma solução previamente filtrada estéril deste.

A quantidade de componente ativo que pode ser combinado com um material de veículo para produzir uma forma de dosagem simples variará, dependendo do sujeito sendo tratado, e do modo particular de administração. A quantidade de componente ativo que pode ser combinado com um material de veículo para produzir uma forma de dosagem simples em geral será aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Em geral, fora cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de componente ativo, de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, ou de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de componente ativo em combinação com um veículo far-

maceuticamente aceitável.

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolo simples pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o passar do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma de unidade de dosagem como aqui usada refere-se às unidades fisicamente distintas adaptadas como dosagens unitárias para os sujeitos a ser tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para a unidade de dosagem forma da invenção é ditada e diretamente dependente das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico particular a ser alcançado, e as limitações inerentes na técnica de compor um tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Para administração do anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 200 mg/kg, e mais usualmente 0,01 a 50 mg/kg, do peso do corpo do hospedeiro. Por exemplo dosagens podem ser 0,3 mg/kg do peso do corpo, 1 mg/kg do peso do corpo, 3 mg/kg do peso do corpo, 5 mg/kg do peso do corpo ou 10 mg/kg do peso do corpo ou dentro da faixa de 1-20 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar requer administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses ou uma vez a cada três a 6 meses. Regimes de dosagem para um anticorpo de anti-DKK1 da invenção incluem 1 mg/kg do peso do corpo ou 3 mg/kg do peso do corpo por administração intravenosa, com o anticorpo sendo dado usando um dos programas de doseamento a seguir: a cada quatro semanas para seis dosagens, depois a cada três meses; a cada três semanas; 3 mg/kg do peso do corpo uma vez seguidos por 1 mg/kg do peso do corpo a cada três semanas.

Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com especificidades de ligação diferentes são administrados simultaneamente, em cujo caso a dosagem de cada anticorpo administrado cai dentro das faixas indicadas. Anticorpo é usualmente administrado em ocasiões múltiplas.

- 5 Intervalos entre dosagens simples podem ser, por exemplo, semanal, mensal, a cada três meses ou anualmente. Intervalos podem também ser irregulares como indicado medindo os níveis de anticorpo no sangue do paciente para o antígeno alvo ou de algum biomarcador tal como OCN, OPG ou P1NP. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para alcançar uma con-
- 10 centração de anticorpo de plasma de cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos cerca de 25-300 µg/ml.

- Alternativamente, anticorpo pode ser administrado como uma formulação de liberação contínua em cujo caso administração menos frequente é requerida. Dosagem e frequência variam, dependendo da meia-
- 15 vida do anticorpo no paciente. Em geral, anticorpos humanos mostram a meia-vida mais longa, seguidos por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, e anticorpos não-humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar, dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é adminis-
- 20 trada em intervalos relativamente infreqüentes em um período longo de tempo. Alguns pacientes continuam recebendo tratamento para o resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é às vezes requerida até progressão da doença ser reduzida ou terminada ou até que o paciente mostre melhora parcial ou
- 25 completa dos sintomas da doença. Depois disso, o paciente pode ser administrado com um regime profilático.

- Níveis de dosagem atuais dos componentes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados para obter uma quantidade do componente ativo que seja eficaz para alcançar a resposta tera-
- 30 pêutica desejada para um paciente, composição, e modo de administração particulares, sem ser tóxicos ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das

composições particulares da presente invenção empregada, ou do éster, sal ou amida das mesmas, da rota de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto particular sendo empregado, da duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação
5 com as composições particulares empregadas, da idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente sendo tratado, e também de fatores conhecidos nas técnicas médicas.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo de anti-DKK1 da invenção pode resultar em uma diminuição na severidade dos
10 sintomas da doença, um aumento na frequência e duração dos períodos sem sintomas da doença, ou uma prevenção do prejuízo ou inaptidão devido à aflição da doença.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma ou mais rotas de administração usando um ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado pelo artesão versado, a rota e/ou modo de administração variará, dependendo dos resultados desejados. Rotas de administração para anticorpos da invenção incluem rotas de administração intravenosas, intramusculares, intradérmicas, intraperitoneais, parenterais, subcutâneas, espinhais ou outras, por exemplo
15 por injeção ou infusão. A frase "administração parenteral" como aqui usada significa modos de administração diferentes de administração enteral e tópica, usualmente através de injeção, e incluem, sem limitação, injeção intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueana, subcutânea, subcuticular,
20 intrarticular, subcapsular, subaraquinóide, intraespinhal, epidural e intraesternal e infusão.

Alternativamente, um anticorpo da invenção pode ser administrado por uma rota não-parenteral, tal como uma rota de administração tópica, epidérmica ou mucosa, por exemplo, intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou topicamente.
30

Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que protegerão o composto contra liberação rápida, tal como uma formulação de libe-

ração controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulado. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como acetato de vinila de etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático podem ser usados. Muitos métodos para a
5 preparação de tais formulações são patenteados ou em geral conhecidos àqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, *sustained and Controlled Release Drug Delivery*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade,
10 uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tal como os dispositivos mostrados nas Patentes U.S. Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 ou 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: Patente U. S.
15 N°. 4.487.603, que mostra uma bomba de micro-infusão implantável para dispensar medicação a uma taxa controlada; Patente U. S. N°. 4.486.194, que mostra um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; Patente U. S. N°. 4.447.233, que mostra uma bomba de infusão de medicação para liberar medicação a uma taxa de infusão precisa; Patente
20 U. S. N°. 4.447.224, que mostra um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para liberação de fármaco contínua; Patente U. S. N°. 4.439.196, que mostra um sistema de liberação de fármaco osmótico tendo compartimentos de multi-câmara; e Patente U. S. N°. 4.475.196, que mostra um sistema de liberação de fármaco osmótico. Estas patentes são incorpo-
25 radas aqui por referência. Muitos outros tais implantes, sistemas de liberação, e módulos são conhecidos àqueles versados na técnica.

Em certas modalidades, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para assegurar distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compos-
30 tos altamente hidrófilos. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção cruzem a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabricação de lipossomas, vide,

por exemplo, Patentes U.S. 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais metades que são seletivamente transportadas para as células ou órgãos específicos, desse modo intensificam a liberação de fármaco alvejada (vide, por exemplo, V. V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). Metades de alvejamento exemplares incluem folato ou biotina (vide, por exemplo, Patente U. S. 5.416.016 para Low et al.); manosídeos (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticorpos (P. G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A de tensoativo (Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); vide também K. Keinanen; M. L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

AS COMBINAÇÕES

15 A invenção também refere-se a um método de impedir ou tratar doenças proliferativas ou doenças, tais como um câncer, em um mamífero, particularmente um humano, com uma combinação de agentes farmacêuticos que compreende:

- (a) uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização; e
- 20 (b) um ou mais agentes farmacêuticamente ativos.

A invenção também refere-se às composições farmacêuticas compreendendo:

- (a) uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização;
- (b) um agente farmacêuticamente ativo; e
- 25 (c) um veículo farmacêuticamente aceitável.

A presente invenção também refere-se a um pacote comercial ou produto compreendendo:

- (a) uma formulação farmacêutica de uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização; e
- 30 (b) uma formulação farmacêutica de um agente farmacêuticamente ativo para uso simultâneo, simultâneo, separado ou seqüencial.

OS AGENTES FARMACEUTICAMENTE ATIVOS

O termo "agentes farmaceuticamente ativos" é um vasto abrangendo muitos agentes farmaceuticamente ativos tendo mecanismos diferentes de ação. Combinações de alguns destes com anticorpos/composições de DKK1/4 de neutralização podem resultar em melhorias na terapia de câncer.

- 5 Em geral, agentes farmaceuticamente ativos são classificados de acordo com o mecanismo de ação. Muitos dos agentes disponíveis são antimetabólitos das vias de desenvolvimento de vários tumores, ou reagem com o DNA das células tumorais. Há também agentes que inibem enzimas, tais como topoisomerase I e topoisomerase II, ou que são agentes antimitóticos.

- 10 Pelo termo "agente farmaceuticamente ativo" é especialmente significado qualquer agente farmaceuticamente ativo diferente de uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização ou um derivado da mesma. Ele inclui, mas não é limitado:

- i. um inibidor de aromatase;
- 15 ii. um antiestrogênio, um antiandrógeno ou um agonista de gonadorrelina;
- iii. um inibidor de topoisomerase I ou um inibidor de topoisomerase II;
- iv. um agente ativo de microtúbulo, um agente de alquilação, um
- 20 antimetabólito antineoplástico ou um composto de platina;
- v. um composto alvejando/diminuindo uma proteína ou atividade de cinase lipídica ou uma proteína ou atividade de fosfatase lipídica, um outro composto antiangiogênico ou um composto que induz processos de diferenciação de célula;
- 25 vi. anticorpos monoclonais;
- vii. um inibidor de ciclooxigenase, um bisfosfonato, um inibidor de heparanase, um modificador de resposta biológica;
- viii. um inibidor de isoformas oncogênicas de Ras;
- ix. um inibidor de telomerase;
- 30 x. um inibidor de protease, um inibidor de metaloproteinase de matriz, um inibidor de metionina aminopeptidase, ou um inibidor de proteasoma;

- xi. agentes usados no tratamento de malignidades hematológicas ou compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de Flt-3;
 - xii. um inibidor de HSP90;
 - xiii. anticorpos antiproliferativos;
 - 5 xiv. um inibidor de histona desacetilase (HDAC);
 - xv. um composto que alveja, diminui ou inibe a atividade/função de serina/treonina mTOR cinase;
 - xvi. um antagonista de receptor de somatostatina;
 - xvii. um composto antileucêmico;
 - 10 xviii. métodos de dano de células tumorais;
 - xix. um aglutinante de EDG;
 - xx. um inibidor de ribonucleotídeo reductase;
 - xxi. um inibidor de S-adenosilametionina descarboxilase;
 - xxii. um anticorpo monoclonal de VEGF ou VEGFR;
 - 15 xxiii. terapia fotodinâmica;
 - xxiv. um esteróide angiostático;
 - xxv. um implante contendo corticosteróides;
 - xxvi. um antagonista de receptor de AT1; e
 - xxvii. um inibidor de ACE.
- 20 O termo "inibidor de aromatase", como aqui usado, refere-se a um composto que inibe a produção de estrogênio, isto é, a conversão dos substratos de androstenediona e testosterona para estrona e estradiol, respectivamente. O termo inclui, mas não é limitado a, esteróides, especialmente atamestana, exemestana e formestana; e, em particular, não-esteróides,
- 25 especialmente aminoglutetimida, rogletimida, piridoglutetimida, trilostano, testolactona, cetoconazol, vorozol, fadrozol, anastrozol e letrozol. Exemestano é comercializado como AROMASIN; formestano como LENTARON; fadrozol como AFEMA; anastrozol como ARIMIDEX; letrozol como FEMARA ou FEMAR; e aminoglutetimida como ORIMETEN. Uma combinação da invenção compreendendo um agente farmacologicamente ativo que é um inibi-
- 30 dor de aromatase é particularmente útil para o tratamento de tumores positivos de receptor hormonal, por exemplo, tumores de mama.

O termo "antiestrogênio", como aqui usado, refere-se a um composto que antagoniza o efeito dos estrogênios no nível de receptor de estrogênio. O termo inclui, mas não é limitado a, tamoxifeno, fulvestrant, raloxifeno e cloridrato de raloxifeno. Tamoxifeno pode ser administrado na forma como é comercializado, por exemplo, NOLVADEX; e cloridrato de raloxifeno é comercializado como EVISTA. Fulvestrant pode ser formulado como revelado na Patente U. S. Nº. 4.659.516 e é comercializado como FASLODEX. Uma combinação da invenção que compreende um agente farmaceuticamente ativo que é um antiestrogênio é particularmente útil para o tratamento de tumores positivos de receptor de estrogênio, por exemplo, tumores de mama.

O termo "antiandrógeno", como aqui usado, refere-se a qualquer substância que é capaz de inibir os efeitos biológicos de hormônios androgênicos e inclui, mas não é limitado a, bicalutamida (CASODEX) que pode ser formulada por exemplo, como revelado na Patente U. S. Nº. 4.636.505.

O termo "agonista de gonadorrelina", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, abarelix, goserrelina e acetato de goserrelina. Goserrelina é revelada na Patente U. S. Nº. 4.100.274 e é comercializada como ZOLADEX. Abarelix pode ser formulado, por exemplo, como revelado na Patente U. S. Nº. 5.843.901.

O termo "inibidor de topoisomerase I", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, topotecan, gimatecan, irinotecan, camptotecina e seus análogos, 9-nitrocampotecina e a camptotecina macromolecular PNU-166148 conjugada (composto A1 em WO 99/17804). Irinotecan pode ser administrado, por exemplo, na forma como é comercializado, por exemplo, sob a marca registrada CAMPTOSAR. Topotecan pode ser administrado, por exemplo, na forma que é comercializado, por exemplo, sob a marca registrada HYCAMTIN.

O termo "inibidor de topoisomerase II", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, o antraciclina, tais como doxorubicina, incluindo formulação lipossomal, por exemplo, CAELYX, daunorrubicina, incluindo formulação lipossomal, por exemplo, DAUNOSOME, epirubicina, idarrubicina e nemorrubicina; as antraquinonas mitoxantrona e losoxantrona; e as podofilo-

toxinas etoposide e teniposide. Etoposide é comercializado como ETOPOPHOS; teniposide como VM 26-BRISTOL; doxorubicina como ADRIBLASTIN ou ADRIAMYCIN; epirubicina como FARMORUBICIN; idarrubicina como ZAVEDOS; e mitoxantrona como NOVANTRON.

5 O termo "agente ativo de microtúbulo" como aqui usado, refere-se aos agentes estabilizantes de microtúbulo, desestabilizantes de microtúbulo e inibidores de polimerização de microtubulina incluindo, mas não limitados, taxanos, por exemplo, paclitaxel e docetaxel; alcalóides de vinca, por exemplo, vinblastina, especialmente sulfato de vinblastina; vincristina, especialmente sulfato de vincristina e vinorelbina; discodermolídas; colquicina e epotilonas e derivados das mesmas, por exemplo, epotilona B ou um derivado desta. Paclitaxel é comercializado como TAXOL; docetaxel como TAXOTERE; sulfato de vinblastina como VINBLASTIN R.P; e sulfato de vincristina como FARMISTIN. Também inclusas estão as formas genéricas de paclitaxel como também várias formas de dosagem de paclitaxel. Formas genéricas de paclitaxel incluem, mas não são limitadas a, cloridrato de betaxolol. Várias formas de dosagem de paclitaxel incluem, mas não são limitadas a, paclitaxel de nanopartícula de albumina comercializado como ABRAXANE; ONXOL, CYTOTAX. Discodermolida pode ser obtida, por exemplo, como
10 20 revelado na Patente U. S. N°. 5.010.099. Também inclusos estão os derivados de Epotolina que são revelados na Patente U. S. N°. 6.194.181, WO 98/10121, WO 98/25929, WO 98/08849, WO 99/43653, WO 98/22461 e WO 00/31247. Especialmente preferido é Epotolina A e/ou B.

O termo "agente de alquilação", como aqui usado, inclui, mas
25 não é limitado a, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan ou nitrosouréia (BCNU ou Gliadel), ou temozolamida (TEMODAR). Ciclofosfamida pode ser administrada, por exemplo, na forma como é comercializado, por exemplo, sob a marca registrada CYCLOSTIN; e ifosfamida como HOLOXAN.

O termo "antimetabólito antineoplástico" inclui, mas não é limitado
30 a, 5-fluorouracila (5-FU); capecitabina; gencitabina; agentes de desmetilação de DNA, tais como 5-azacitidina e decitabina; metotrexato; edatrexato; e antagonistas de ácido fólico tais como, mas não limitados, pemetrexed. Capecitabina

pode ser administrada, por exemplo, na forma como é comercializada, por exemplo, sob a marca registrada XELODA; e gencitabina como GEMZAR.

O termo "composto de platina", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, carboplatina, cis-platina, cisplatina, oxaliplatina, Satraplatina e agentes de platina tais como ZD0473. Carboplatina pode ser administrada, por exemplo, na forma como é comercializada, por exemplo, CARBOPLAT; e oxaliplatina como ELOXATIN.

O termo "compostos para alvejar/diminui uma proteína ou atividade de lipídio cinase; ou uma proteína ou atividade de lipídio fosfatase; ou outros compostos antiangiogênicos", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, inibidores de proteína tirosina cinase e/ou serina e/ou teroína cinase ou inibidores de lipídio cinase, por exemplo:

i) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade dos receptores de fator de crescimento endoteliais vasculares (VEGF), tais como compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de VEGF, especialmente compostos que inibem o receptor de VEGF, tais como, mas não limitados, derivados de 7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (AEE788); BAY 43-9006; compostos de isolcolina revelados em WO 00/09495 tais como (4-terc-butilfenil)-94-piridin-4-ilmetil-isoquinolin-1-il)-amina (AAL881); e

ii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade dos receptores de fator de crescimento derivados de plaqueta (PDGFR), tais como compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de PDGFR, especialmente compostos que inibem o receptor de PDGF, por exemplo, um derivado de N-fenil-2-pirimidina-amina, por exemplo, imatinib, SU101, SU6668 e GFB-111;

iii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade dos receptores de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR);

iv) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade do receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R), tal como compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de IGF-1R, especialmente compostos que inibem o receptor de IGF-1R. Compostos incluem mas não são limitados aos compostos revelados em WO 02/092599 e deri-

vados destes dos derivados de 4-amino-5-fenil-7-ciclobutil-pirrolo[2,3-d]pirimidina (AEW541);

v) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da família de tirosina cinase de receptor de Trk;

5 vi) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da família de tirosina cinase de receptor de Axl;

vii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade do receptor c-Met;

10 viii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da tirosina cinase de receptor Ret;

ix) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da tirosina cinase de receptor Kit/SCFR;

x) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade das tirosina cinases de receptor C-kit (parte da família de PDGFR), tais como
15 compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade da família de tirosina cinase de receptor c-kit, especialmente compostos que inibem o receptor c-kit, por exemplo, imatinib;

xi) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de membros da família de c Abl e seus produtos de fusão de genes, por exemplo,
20 BCR-Abl cinase, tais como compostos que alvejam, diminuem ou inibe a atividade dos membros da família c-Abl e seus produtos de fusão de gene, por exemplo, um derivado de N-fenil-2-pirimidina-amina, por exemplo, imatinib, PD180970, AG957, NSC 680410 ou PD173955 de ParkeDavis; BMS354825

xii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de
25 membros da família proteína cinase C (PKC) e Raf das serina/treonina cinases, membros dos membros da família MEK, SRC, JAK, FAK, PDK e Ras/MAPK, ou família de PI(3) cinase, ou da família de cinase relacionada a PI(3) cinase, e/ou os membros da família de cinase ciclina-dependente (CDK) e são especialmente aqueles derivados de estaurosporina revelados na Patente U. S. N°. 5.093.330, por exemplo, midostaurina; exemplos de compostos também incluem,
30 por exemplo, UCN-01; safingol; BAY 43-9006; Briostatina 1; Perifosina; Ilmofosina; RO 318220 e RO 320432; GO 6976; Isis 3521;

LY333531/LY379196; compostos de isoquinolina, tais como aqueles revelados em WO 00/09495; FTIs; PD184352 ou QAN697, um inibidor de P13K;

xiii) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de proteína-tirosina cinase, tais como mesilato de imatinib (GLEEVEC); thyrophostin ou pirimidilaminobenzamida e derivados destes (AMN107). Um thyrophostin é preferivelmente um composto de peso molecular baixo ($M_w < 1500$), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, especialmente um composto selecionado da classe de benzilidenomalonitrila ou o S arilbenzenomalonitrila ou classe de quinolina de bissubstrato dos compostos, mais especialmente qualquer composto selecionado do grupo que consiste em Tyrphostin A23/RG-50810, AG 99, Tyrphostin AG 213, Tyrphostin AG 1748, Tyrphostin AG 490, Tyrphostin B44, (+) enantiômero de Tyrphostin B44, Tyrphostin AG 555, AG 494, Tyrphostin AG 556; AG957 e adaphostin (éster de adamantila de ácido 4-[[[(2,5-dihidroxifenil)metil]amino]-benzóico, NSC 680410, adaphostin);

xiv) compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade da família de receptor de fator de crescimento epidérmico de tirosina cinases (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 como homo ou heterodímeros), tais como compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade da família de receptor de fator de crescimento epidérmico são especialmente compostos, proteínas ou anticorpos que inibem os membros da família de tirosina cinase de receptor EGF, por exemplo, Receptor de EGF, ErbB2, ErbB3 e ErbB4 ou liga a EGF ou ligandos relacionados a EGF, e são em particular aqueles compostos, proteínas ou anticorpos monoclonais genérica e especificamente revelados em WO 97/02266, por exemplo, o composto do Exemplo 39, ou na EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, Patente U. S. N°. 5.747.498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 e, especialmente, WO 96/30347, por exemplo, o composto conhecido como CP 358774, WO 96/33980, por exemplo, composto ZD 1839; e WO 95/03283, por exemplo, composto ZM105180, por exemplo, trastuzumab (HERCEPTIN®), cetuximab, Iressa, OSI-774, CI 1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 ou E7.6.3, e

derivados de 7H-pirrólo-[2,3-d]pirimidina que são revelados em WO 03/013541, erlotinib e gefitinib. Erlotinib pode ser administrado na forma como é comercializado, por exemplo TARCEVA, e gefitinib como IRESSA, anticorpos monoclonais humanos contra o receptor de fator de crescimento epidérmico incluindo ABX-EGFR; e

xv) Compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade/função de serina/treonina mTOR cinase são especialmente compostos, proteínas ou anticorpos que alvejam/inibem membros da família de mTOR cinase, por exemplo, RAD, RAD001, CCI-779, ABT578, SAR543, rapamicina e derivados/análogos dos mesmos, AP23573 e AP23841 de Ariad, everolimus (CERTICAN) e sirolimus. CERTICAN (everolimus, RAD) um inibidor de sinal de proliferação investigatória novo que impede proliferação de células T e células vasculares do músculo liso.

Ao referir ao anticorpo, é para incluir anticorpos monoclonais intactos, nanocorpos, anticorpos policlonais, anticorpos multi-específicos formados de pelo menos 2 anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpos desde que eles exibam a atividade biológica desejada.

A frase "composto que alveja, diminui ou inibe a atividade de uma proteína ou lipídio fosfatase" como aqui usada inclui mas não é limitada a inibidores de fosfatase 1, fosfatase 2A, PTEN ou CDC25, por exemplo, ácido ocadáico ou um derivado dos mesmos.

O termo "anticorpos monoclonais", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a bevacizumab, cetuximab, trastuzumab, Ibritumomab tiuxetan, denosumab, anti-CD40, anti-GM-CSF, e tositumomab e iodo I 131. Bevacizumab pode ser administrado na forma como é comercializado, por exemplo AVASTIN; cetuximab como ERBITUX; trastuzumab como HERCEPTIN; Rituximab como MABTHERA; Ibritumomab tiuxetan como ZEVULIN; anti-RANKL como denosumab (AMG 162), anti-CD40 como HCD122 (pedido de patente U. S. 2002-0106371), e tositumomab e iodo I 131 como BEXXAR.

A frase "outros compostos antiangiogênicos" inclui mas não é limitada a compostos tendo outro mecanismo para sua atividade, por exemplo, não relacionada à inibição de proteína ou lipídio cinase, por exemplo,

talidomida (THALOMID) e TNP-470.

A frase "compostos que induzem processos de diferenciação de célula" como aqui usado, incluem mas não são limitados a ácido retinóico, α -, γ - ou δ -tocoferol ou α - ou, γ - ou δ -tocotrienol.

5 O termo "inibidor de ciclooxigenase" como aqui usado inclui, mas não é limitado a, por exemplo, inibidores de Cox-2, ácido 5-alkil 2-arilaminofenilacético substituído e derivados, tais como celecoxib (CELEBREX), rofecoxib (VIOXX), etoricoxib, valdecoxib ou um ácido 5-alkil-2-arilaminofenilacético, por exemplo, ácido 5-metil-2-(2'-cloro-6'-fluoroanilino)fenil acético, lumiracoxib.

O termo "bisfosfonatos", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, ácido etridrônico, clodrônico, tiludrônico, pamidrônico, alendrônico, ibandrônico, risedrônico e zoldrônico. "Ácido etridrônico" pode ser administrado, por exemplo, na forma como é comercializado, por exemplo, DIDRO-
15 NEL; "ácido clodrônico" como BONEFOS; "ácido tiludrônico" como SKELID; "ácido pamidrônico" como AREDIA; "ácido alendrônico" como FOSAMAX; "ácido ibandrônico" como BONDRANAT; "ácido risedrônico" como ACTONEL; e "ácido zoldrônico" como ZOMETA.

O termo "inibidor de heparanase", como aqui usado, refere-se a
20 compostos que alvejam, diminuem ou inibem degradação de sulfato de heparina. O termo inclui, mas não é limitado a, PI 88.

O termo "modificador de resposta biológica", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a linfocina ou interferonas, por exemplo, interferona γ .

O termo "inibidor de isoformas oncogênicas de Ras", como aqui
25 usado, inclui, mas não é limitado a, H-Ras, K-Ras ou N-Ras, como aqui usado, refere-se aos compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade oncogênica de Ras, por exemplo, um inibidor de farnesil transferase (FTI), por exemplo, L-744832, DK8G557 ou R115777 (ZARNESTRA).

O termo "inibidor de telomerase", como aqui usado, inclui, mas
30 não é limitado a, compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de telomerase. Compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de telomerase são especialmente compostos que inibem o receptor de telome-

rase, por exemplo, telomestatina.

O termo "inibidor de metaloproteinase de matriz" ou (inibidor de MMP), como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, inibidores peptidomimético e não-peptidomimético de colágeno; derivados de tetraciclina, por exemplo, 5 inibidor peptidomimético de hidroxamato batimastat; e seus análogo oralmente biodisponível marimastat (BB-2516), prinomastat (AG3340), metastat (NSC 683551) BMS 279251, LADRE 12-9566, TAA211, MMI270B ou AAJ996.

O termo "inibidor de aminopeptidase metionina", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de metionina aminopeptidase. Compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de metionina aminopeptidase são, por exemplo, bengamida ou um derivado deste. 10

O termo "inibidores de proteassoma", como aqui usado, inclui compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade do proteassoma. 15 Compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade da proteassoma incluem, mas não são limitados a, PS-341; MLN 341. bortezomib ou Velcade.

A frase "agente usado no tratamento de malignidades hematológicas", como aqui usada, inclui, mas não é limitada a, inibidores de tirosina cinase semelhantes a FMS, por exemplo, compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de receptores de tirosina cinase semelhantes a FMS 20 (Flt-3R); interferona, 1-b-D-arabinofuransilacitosina (ara-c) e bissulfano; e inibidores de ALK, por exemplo, compostos que alvejam, diminuem ou inibem cinase de linfoma anaplástico.

A frase "compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de Flt-3" como aqui usada, inclui, mas não é limitada a, compostos, proteínas ou anticorpos que inibem Flt-3, por exemplo, N-benzoil-estaurosporina, midoestaurina, um derivado de estaurosporina, SU11248 e MLN518. 25

O termo "inibidores de HSP90", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de 30 ATPase intrínseca de HSP90; degradando, alvejando, diminuindo ou inibindo as proteínas de HSP90 clientes por meio da via de proteassoma de ubiquitina. Compostos alvejando, diminuindo ou inibindo a atividade de ATPase in-

trínseca de HSP90 são especialmente compostos, proteínas ou anticorpos que inibem a atividade de HSP90 ATPase, por exemplo, 17-alilamino, 17-demetoxigeldanamicina (17AAG), um derivado de geldanamicina; outros compostos relacionados à geldanamicina; inibidores de radicicol e de HDAC.

5 O termo "um anticorpo antiproliferativo" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, trastuzumab (HERCEPTIN), trastuzumab-DM1, erlotinib (TARCEVA), bevacizumab (AVASTIN), rituximab (RITUXAN), PRO64553 (anti-CD40) e Anticorpo de 2C4. Por anticorpos é significado por exemplo anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos formados de pelo menos 2 anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpos desde que eles exibam a atividade biológica desejada.

O termo "inibidor de HDAC", como aqui usado refere-se aos compostos que inibem a histona desacetilase e que possuem atividade antiproliferativa. Estes incluem, mas não são limitados a, compostos revelados em WO 02/22577, especialmente N-hidróxi-3-[4-[[[2-hidroxietil]2-(1H-indol-3-il)etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida, e N-hidróxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos (LBH589). Este também especialmente inclui ácido hidroxâmico de suberoilanolida (SAHA); éster de piridino-3-ilmetila de ácido [4-(2-amino-fenilcarbamoil)-benzil]-carbâmico e derivados dos mesmos; ácido butírico, piroxamida, tricostatina A, Oxamflatina, apicidina, Depsi-peptídeo; depudecina e trapoxina.

A frase "composto que alveja, diminui ou inibe a atividade/função de serina/teronina mTOR cinase" como aqui usada, inclui mas não é limitada a, compostos, proteínas ou anticorpos que alvejam/inibem os membros da família de mTOR cinase, por exemplo, RAD, RAD001, CCI-779, ABT578, SAR543, rapamicina e derivados/análogos dos mesmos, AP23573 e AP23841 de Ariad, everolimus (CERTICAN) e sirolimus (RAPAMUNE), CCI-779 e ABT578. CERTICAN (everolimus, RAD) um inibidor de sinal de proliferação investigacional novo que impede proliferação de células T e células vasculares do músculo liso.

O termo "antagonista de receptor de somatostatina", como aqui

usado, inclui, mas não é limitado a, agentes que alvejam, tratam ou inibem o receptor de somatostatina, tal como octreotide e SOM230.

O termo "composto antileucêmico" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, Ara-C, um análogo de pirimidina que é o derivado de 2'- α -hidróxi ribose (arabinoside) de deoxicitidina. Também incluso estão o análogo de purina de hipoxantina, 6-mercaptopurina (6-MP) e fosfato de fludarabina.

A frase "método de dano de células tumorais" refere-se aos métodos, tais como radiação de ionização. O termo "radiação de ionização", referido acima e doravante, significa que a radiação de ionização que ocorre como quaisquer raios eletromagnéticos, tais como Raios X e raios gama; ou partículas, tais como partículas alfa, beta e gama. Radiação de ionização é fornecida, mas não limitada, em terapia de radiação e é conhecida na técnica. Vide Hellman, Cancer, 4ª Edição, Vol. 1, Devita et al., Eds., págs. 248-275 (1993).

O termo "aglutinante de EDG" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, uma classe de imunossuppressores que modulam a recirculação de linfócito, tal como FTY720.

O termo "inibidor de ribonucleotídeo reductase" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, análogos de nucleosídeo de pirimidina ou de purina incluindo, mas não limitados a, fludarabina e/ou ara-C; 6-tioguanina; 5-FU; cladribina; 6-mercaptopurina, especialmente em combinação com ara-C contra ALL; e/ou pentostatina. Inibidores de ribonucleotídeo reductase são especialmente hidroxiuréia ou derivados de 2-hidróxi-1H-isoindol-1,3-diona, tais como PL-1, PL-2, PL-3, PL-4, PL-5, PL-6, PL-7 ou PL 8. Vide Nandy et al., Acta Oncologica, Vol. 33, No. 8, págs. 953-961 (1994).

O termo "inibidores de S-adenosilametionina descarboxilase", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, os compostos revelados na Patente U. S. N°. 5.461.076.

A frase "anticorpos monoclonais de VEGF ou VEGFR", como aqui usada, inclui, mas não é limitada a, compostos revelados em WO 98/35958, por exemplo, 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil)ftalazina ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, por exemplo, o succinato, ou em WO 00/09495, WO 00/27820, WO 00/59509, WO 98/11223, WO 00/27819 e EP

O 769 947; aqueles como descritos por Prewett et al., Cancer Res, Vol. 59, págs. 5209-5218 (1999); Yuan et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 93, págs. 14765-14770 (1996); Zhu et al., Cancer Res, Vol. 58, págs. 3209-3214 (1998); e Mordenti et al., Toxicol Pathol, Vol. 27, No. 1, págs. 14-21 (1999) em WO 00/37502 e WO 94/10202; ANGIOSTATIN, descrita por O'Reilly et al., Cell, Vol. 79, págs. 315-328 (1994); ENDOSTATIN, descrita por O'Reilly et al., Cell, Vol. 88, págs. 277-285 (1997); amidas de ácido antranílico; ZD4190; ZD6474; SU5416; SU6668; bevacizumab; ou anticorpos anti-VEGF ou anticorpos de receptor anti-VEGF, por exemplo, rhuMAb e RHUFab; ap-
 10 tâmero de VEGF, por exemplo, Macugon; inibidores de FLT-4; inibidores de FLT-3; anticorpo de IgG1 de VEGFR-2; Angiozyme (RPI 4610); e Avastan.

O termo "terapia fotodinâmica", como aqui usado, refere-se à terapia que usa certas químicas conhecidas como agentes de fotossensibilização para tratar ou impedir cânceres. Exemplos de terapia fotodinâmica
 15 incluem, mas não são limitadas a, tratamento com agentes, tais como, por exemplo, VISUDYNE e porfímero de sódio.

O termo "esteróide angiostático", como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, agentes que bloqueiam ou inibem angiogênese, tal como, por exemplo, anecortave, triancinolona, hidrocortisona, 11- α -epiidrocotisol, cortexolona, 17 α -hidroxiprogesterona, corticosterona, desoxicorticosterona, testosterona, estrona e dexametasona.
 20

A frase "corticosteróides contendo implante" como aqui usada, inclui, mas não é limitada a, agentes, tais como, por exemplo, fluocinolona e dexametasona.

25 O termo "antagonista de receptor AT1" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, agentes, tais como DIOVAN.

O termo "inibidor de ACE" como aqui usado, inclui, mas não é limitado a, CIBACEN, benazepril, enazepril (LOTENSIN), captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, quinapril, ramipril, perindopril e trandolapril.

30 Outros agentes farmacologicamente ativos incluem, mas não são limitados a, alcalóides de planta, agentes e antagonistas hormonais, modificadores de resposta biológica, preferivelmente linfocinas ou interferonas,

oligonucleotídeos antissenses ou derivados de oligonucleotídeos; ou agentes diversos ou agentes com outro mecanismo de ação ou desconhecido.

Em cada caso onde citações de pedidos de patente ou publicações científicas forem dadas, em particular com respeito às respectivas reivindicações dos compostos e aos produtos finais dos exemplos de funcionamento nelas, o assunto dos produtos finais, as preparações farmacêuticas e as reivindicações são por este meio incorporado no presente pedido de patente por referência para estas publicações. Compreendidos são igualmente os estereoisômeros correspondentes, como também as modificações de cristal correspondentes, por exemplo, solvatos e polimorfos que são revelados nelas. Os compostos usados como componentes ativos nas combinações reveladas aqui podem ser preparados e administrados como descrito nos documentos citados, respectivamente.

A estrutura dos agentes ativos identificados por números de código, nomes genéricos ou comerciais pode ser tirada da edição atual do compêndio padrão "The Merck Index" ou das bases de dados, por exemplo, Patentes Internacionais, por exemplo, Publicações Mundiais IMS, ou as publicações mencionadas acima e abaixo. O conteúdo correspondente dos mesmos é por este meio incorporado por referência.

Será entendido que referências aos componentes (a) e (b) são significadas também incluir os sais farmaceuticamente aceitáveis de quaisquer das substâncias ativas. Se as substâncias ativas compreendidas dos componentes (a) e/ou (b) tiverem, por exemplo, pelo menos um centro básico, elas podem formar sais de adição de ácido. Sais de adição de ácido correspondentes podem também ser formados tendo, se desejado, um centro básico adicionalmente presente. Substâncias ativas tendo um grupo de ácido, por exemplo, COOH, podem formar sais com bases. As substâncias ativas compreendidas dos componentes (a) e/ou (b) ou uns sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos podem também ser usadas em forma de um hidrato ou incluem outros solventes usados para cristalização.

Desse modo, em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para a prevenção de tratamento de doenças proliferati-

vas ou doenças que são desencadeadas através de angiogênese persistente em um mamífero, preferivelmente um paciente humano que compreende tratar o paciente simultânea ou seqüencialmente com quantidades farmacêuticamente eficazes de uma combinação de:

- 5 (a) uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização; e
 (b) um agente farmacêuticamente ativo.

Em modalidade preferida, a presente invenção fornece uma preparação farmacêutica compreendendo:

- (a) uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização; e
- 10 (b) um ou mais agentes farmacêuticamente ativos selecionados do grupo que consiste em um inibidor de aromatase; um antiestrogênio; um antiandrógeno; um agonista de gonadorrelina; um inibidor de topoisomerase I; um inibidor de topoisomerase II; um agente ativo de microtúbulo; um agente de alquilação; um antimetabólito antineoplástico; um composto de platina;
- 15 um composto de alvejamento/diminuição de uma atividade de proteína ou lipídio cinase ou uma atividade de proteína ou lipídio fosfatase, um composto antiangiogênico; um composto que induz processos de diferenciação de células; anticorpos monoclonais; um inibidor de ciclooxigenase; um bisfosfonato; um inibidor de heparanase; um modificador de resposta biológica; um
- 20 inibidor de isoformas oncogênicas de Ras; um inibidor de telomerase; um inibidor de protease, um inibidor de metaloproteinase de matriz, um inibidor de metionina aminopeptidase; um inibidor de proteassoma; agentes que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de Flt-3; um inibidor de HSP90; anticorpos antiproliferativos; um inibidor de HDAC; um composto que alveja, diminui ou inibe a atividade/função de mTOR cinase de serina/teronina; anta-
- 25 gonista de receptor de somatostatina; um composto antileucêmico; método de dano de células tumorais; um aglutinante de EDG; um inibidor de ribonucleotídeo reductase; um inibidor de S-adenosilametonina descarboxilase; um anticorpo monoclonal de VEGF ou VEGFR; terapia fotodinâmica; um es-
- 30 teróide angiostático; um implante contendo corticosteróides; antagonista de receptor de AT1; e um inibidor de ACE.

Qualquer da combinação de componentes (a) e (b), o método de

tratar um animal de sangue quente compreendendo administrar estes dois componentes, uma composição farmacêutica compreendendo estes dois componentes para uso simultâneo, separado ou seqüencial, o uso da combinação para a demora de progressão ou o tratamento de uma doença proliferativa ou para a fabricação de uma preparação farmacêutica para estes propósitos ou um produto comercial que compreendem um tal combinação de componentes (a) e (b), tudo como mencionado ou definido acima, será referido subsequenteemente também como combinação da invenção (de forma que este termo refere-se a cada uma destas modalidades que desse modo podem substituir este termo onde apropriado).

Administração simultânea pode, por exemplo, ocorrer na forma de uma combinação fixa com dois ou mais componentes ativos, ou administrando dois ou mais componentes ativos que são formulados simultaneamente de modo independente. Uso seqüencial (administração) preferivelmente significa administração de um (ou mais) componente(s) de uma combinação em um ponto de tempo, outros componentes em um ponto de tempo diferente que é em uma maneira cronicamente escalonada, preferivelmente de modo que a combinação mostra mais eficiência que os compostos simples administrados de forma independente (especialmente mostrando sinergismo). Uso separado (administração) preferivelmente significa administração dos componentes da combinação independentemente um do outro em pontos de tempo diferentes, preferivelmente significando que os componentes (a) e (b) são administrados de modo que nenhuma sobreposição de níveis de sangue mensuráveis de ambos os compostos esteja presente de uma maneira sobreposta (ao mesmo tempo).

Também combinações de duas ou mais de administração seqüencial, separada e simultânea são possíveis, preferivelmente de modo que os fármacos de componente de combinação mostrem um efeito terapêutico conjunto que excede o efeito encontrado quando os fármacos de componente de combinação forem usados independentemente em intervalos de tempo tão grandes que nenhum efeito mútuo em sua eficiência terapêutica pode ser encontrado, um efeito sinérgico sendo especialmente preferido.

O termo "demora de progressão" como aqui usado significa administração da combinação em pacientes que estão em um pré-estágio ou em uma fase prematura, da primeira manifestação ou uma recaída da doença a ser tratada, em quais pacientes, por exemplo, uma pré-forma da doença correspondente é diagnosticada ou quais pacientes estão em uma condição, por exemplo, durante um tratamento médico ou uma condição resultante de um acidente sob a qual é provável que uma doença correspondente desenvolverá.

"Juntamente terapeuticamente ativo" ou "efeito terapêutico conjunto" significam que os compostos podem ser dados separadamente (em uma forma cronicamente escalonada, especialmente uma maneira seqüência-específica) em tais intervalos de tempo que eles preferivelmente, no animal de sangue quente, especialmente humano, a ser tratado, ainda mostrem uma interação (preferivelmente sinérgica) (efeito terapêutico conjunto). Se este for o caso, podem inter alia ser determinados seguindo os níveis de sangue, mostrando que ambos os compostos estão presentes no sangue do humano a ser tratado pelo menos durante certos intervalos de tempo.

"Farmaceuticamente eficaz" preferivelmente refere-se a uma quantidade que é terapeuticamente ou em um sentido mais vasto também profilaticamente eficaz contra a progressão de uma doença proliferativa.

O termo "um pacote comercial" ou "um produto", como aqui usado especialmente define um "kit de partes" no sentido que os componentes (a) e (b) como definidos acima podem ser dosados independentemente ou pelo uso de combinações fixas diferentes com quantidades distinguidas dos componentes (a) e (b), isto é, simultaneamente ou em pontos de tempo diferentes. Além disso, estes termos compreendem um pacote comercial que compreende (especialmente combinando) como componentes de componentes ativos (a) e (b), juntamente com instruções para uso simultâneo, seqüencial (cronicamente escalonados, em seqüência tempo-específica, preferencialmente) ou (menos preferivelmente) separados dos mesmos na demora de progressão ou tratamento de uma doença proliferativa. As partes do kit de partes podem depois, por exemplo, ser administradas simultânea ou cronologicamente escalonadas, que é em pontos de tempo diferentes e com

intervalos de tempo iguais ou diferentes para qualquer parte do kit de partes. Muito preferivelmente, os intervalos de tempo são escolhidos de modo que o efeito na doença tratada no uso combinado das partes é maior que o efeito que seria obtido através de uso apenas de qualquer um dos pares de combinação (a) e (b) (como pode ser determinado de acordo com os métodos padrões. A razão das quantidades totais do par de combinação (a) para o par de combinação (b) a serem administrados na preparação combinada pode ser variada, por exemplo, para atender as necessidades de uma subpopulação de paciente a ser tratada ou as necessidades do paciente isolado cujas necessidades diferentes podem ser devido à doença particular, idade, sexo, peso do corpo, etc. dos pacientes. Preferivelmente, há pelo menos um efeito benéfico, por exemplo, uma intensificação mútua do efeito dos pares de combinação (a) e (b), em particular um efeito mais que efeito que consequentemente poderia ser alcançado com doses mais baixas de cada um dos fármacos combinados, respectivamente, que toleráveis no caso de tratamento com os fármacos individuais apenas sem combinação, produzindo efeitos vantajosos adicionais, por exemplo, menos efeitos colaterais ou um efeito terapêutico combinado em uma dosagem não-eficaz de um ou ambos dos pares de combinação (componentes) (a) e (b), e muito preferivelmente um sinergismo forte dos pares de combinação (a) e (b).

Ambos no caso do uso da combinação de componentes (a) e (b) e do pacote comercial, qualquer combinação de uso simultâneo, sequencial e separado é também possível, significando que os componentes (a) e (b) podem ser administrados em um ponto de tempo simultaneamente, seguido por administração de apenas um componente com toxicidade de hospedeiro mais baixa ou cronicamente, por exemplo, mais de 3-4 semanas de doseamento diário, e em ponto de tempo posterior e subsequente o outro componente ou a combinação de ambos os componentes em um ponto de tempo mais posterior (em cursos de tratamento de combinação de fármaco subsequentes para um efeito antitumor ótimo) ou outros.

A COMBINAÇÃO DA INVENÇÃO pode também ser aplicada em combinação com outros tratamentos, por exemplo, intervenção cirúrgica,

hipertermia e/ou terapia de irradiação.

As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção podem ser preparadas através de meios convencionais e podem ser aquelas adequadas para administração enteral, tal como oral ou retal, e parenteral para mamíferos incluindo o homem, compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor de VEGF e pelo menos um agente farmacologicamente ativo sozinho ou em combinação com um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis, especialmente aqueles adequados para aplicação enteral ou parenteral.

As composições farmacêuticas compreendem de cerca de 0,00002 a cerca de 100%, especialmente, por exemplo, no caso de diluições de infusão que estão prontas para usar, de 0,0001 a 0,02%, ou, por exemplo, no caso de concentrados ou formulações de injeção ou infusão especialmente parenterais, de cerca de 0,1% a cerca de 95%, preferivelmente de cerca de 1% a cerca de 90%, mais preferivelmente de cerca de 20% a cerca de 60% de componente ativo (em peso de peso, em cada caso). Composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser, por exemplo, em forma de dose de unidade, tal como na forma de ampolas, frascos, drágeas, tabletes, sacos de infusão ou cápsulas.

A dosagem eficaz de cada um dos pares de combinação empregados em uma formulação da presente invenção podem variar, dependendo do composto particular ou composições farmacêuticas empregadas, o modo de administração, a condição sendo tratada e a severidade da condição sendo tratada. Médico, clínico ou veterinário de habilidade usual pode facilmente determinar a quantidade eficaz de cada um dos componentes ativos necessários para impedir, tratar ou inibir o progresso da condição.

Tyrphostins, especialmente Adaphostin, são preferivelmente administrados a um animal de sangue quente, especialmente um humano em uma dosagem na faixa de cerca de 1-6000 mg/dia, mais preferivelmente 25-5000 mg/dia, o mais preferivelmente 50-4000 mg/dia. A menos que do contrário declarado aqui, o composto é preferivelmente administrado de um a 5, especialmente de 1-4 vezes por dia.

Preparações farmacêuticas para a terapia de combinação para administração enteral ou parenteral são, por exemplo, aquelas em formas de dosagem de unidade, tais como tabletes revestidos com açúcar, cápsulas ou supositórios, e além disso ampolas. Se não indicadas do contrário, estas

5 formulações são preparadas através de meios convencionais, por exemplo, por meio de processos convencionais de mistura, granulação, revê de açúcar, dissolução ou liofilização. Será apreciado que o conteúdo unitário de um par de combinação contido em uma dose individual de cada forma de dosagem não necessita em si mesmo constituir uma quantidade eficaz uma vez que a

10 quantidade eficaz necessária pode ser alcançada por administração de uma pluralidade de unidades de dosagem. Alguém de habilidade na técnica tem a habilidade para determinar quantidades farmacêuticamente eficazes apropriadas dos componentes de combinação.

Preferivelmente, os compostos ou os sais farmacêuticamente

15 aceitáveis dos mesmos, são administrados como uma formulação farmacêutica oral na forma de um tablete, cápsula ou xarope; ou como injeções parenterais se apropriado.

Na preparação das composições para administração oral, quaisquer meios farmacêuticamente aceitáveis podem ser empregados tais como

20 água, glicóis, óleos, alcoóis, agentes aromatizantes, conservantes, agentes de coloração. Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem amidos, açúcares, celulosas microcristalinas, diluentes, agentes de granulação, lubrificantes, aglutinantes, agentes desintegrantes.

Soluções do componente ativo, e também suspensões, e solu-

25 ções ou suspensões aquosas especialmente isotônicas, são úteis para administração parenteral do componente ativo, isto sendo possível, por exemplo, no caso de composições liofilizadas compreendendo o componente ativo sozinho ou junto com um veículo farmacêuticamente aceitável, por exemplo, manitol, para tais soluções ou suspensões serem produzidas antes do

30 uso. As composições farmacêuticas podem ser esterilizadas e/ou compreender excipientes, por exemplo, conservantes, estabilizantes, agentes intumescentes e/ou emulsificantes, solubilizantes, sais para regular a pressão

osmótica e/ou tampões, e são preparadas de uma maneira conhecida per se, por exemplo, por meio de processos convencionais de dissolução ou liofilização. As soluções ou suspensões podem compreender substâncias de aumento de viscosidade, tais como carboximetilcelulose de sódio, carboximetilcelulose, dextrana, polivinilpirrolidona ou gelatina. Suspensões em óleo compreendem, como o componente de óleo, os óleos vegetal, sintéticos ou semi-sintéticos habituais para propósitos de injeção.

O agente isotônico pode ser selecionado de qualquer um daqueles conhecidos na técnica, por exemplo manitol, dextrose, glicose e cloreto de sódio. A formulação de infusão pode ser diluída com o meio aquoso. A quantidade de meio aquoso empregada como um diluente é escolhida de acordo com a concentração desejada de componente ativo na solução de infusão. Soluções de infusão podem conter outros excipientes comumente empregados nas formulações a serem administradas intravenosamente tais como antioxidantes.

A presente invenção também refere-se a "uma preparação combinada" que, como aqui usado, especialmente define um "kit de partes" no sentido que as pares de combinação (a) e (b) como definidas acima podem ser dosadas independentemente ou pelo uso de combinações fixas diferentes com quantidades distintas dos pares de combinação (a) e (b), isto é, simultaneamente ou em pontos de tempo diferentes. As partes do kit de partes podem depois, por exemplo, ser administradas simultânea ou cronologicamente escalonadas, que é em pontos de tempo diferentes e com intervalos de tempo iguais ou diferentes para qualquer parte do kit de partes. A razão das quantidades totais do par de combinação (a) para o par de combinação (b) a serem administradas na preparação combinada pode ser variada, por exemplo, para atender as necessidades de uma sub-população de paciente a ser tratada ou as necessidades do paciente isolado com base na severidade de qualquer efeito colateral que o paciente sofra.

30 USOS E MÉTODOS DA INVENÇÃO

Os anticorpos (e imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da presente invenção têm terapêuticas e utilidades de diagnóstico *in vitro* e *in*

vivo. Por exemplo, estas moléculas podem ser administradas às células em cultura, por exemplo *in vitro* ou *in vivo*, ou em um sujeito, por exemplo, *in vivo*, para tratar, impedir ou diagnosticar uma variedade de distúrbios. O termo "sujeito" como aqui usado é intencionado a incluir os animais humanos e não-humanos. Animais não-humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não-mamíferos, tais como primatas não-humanos, ovelhas, cachorros, gatos, vacas, cavalos, galinhas, anfíbios, e répteis. Os métodos são particularmente adequados para tratar pacientes humanos tendo um distúrbio associado à expressão de DKK1. Quando anticorpos para DKK1 forem administrados juntamente com outro agente, os dois podem ser administrados em ordem ou simultaneamente.

Em uma modalidade, os anticorpos (e imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da invenção podem ser usados para detectar níveis de DKK1, ou níveis de células contendo DKK1. Isto pode ser alcançado, por exemplo, contactando uma amostra (tal como uma amostra *in vitro*) e uma amostra de controle com o anticorpo de anti-DKK1 sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo e DKK1. Qualquer complexo formado entre o anticorpo e DKK1 é detectado e comparado na amostra e no controle. Por exemplo não-limitativo, métodos de detecção padrões são bem conhecidos na técnica, tal como por exemplo, ELISA, MALDI e ensaios citométricos de fluxo, podem ser executados usando as composições da invenção.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção também provê métodos para detectar a presença de DKK1 (por exemplo, antígeno de DKK1 humano) em uma amostra, ou medir a quantidade de DKK1, compreendendo contactar a amostra, e uma amostra de controle, com um anticorpo da invenção, ou uma porção de ligação de antígeno dos mesmos que especificamente liga a DKK1 sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo ou porção do mesmo e DKK1. A formação de um complexo é depois detectada, em que uma diferença na formação complexa entre a amostra comparada à amostra de controle é indicativa da presença de DKK1 na amostra.

Também dentro do escopo da invenção estão kits que consistem

nas composições (por exemplo, anticorpos, anticorpos humanos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas) da invenção e instruções para uso. O kit pode também conter pelo menos um reagente adicional, ou um ou mais anticorpos adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo tendo uma atividade complementar que liga a um epítopo no antígeno alvo distinto do primeiro anticorpo). Kits tipicamente incluem um rótulo que indica o uso intencionado dos conteúdos do kit. O termo rótulo inclui qualquer material escrito ou gravado provido dentro ou com o kit, ou que do contrário acompanha o kit.

A invenção tendo sido descrita completamente, é também ilustrada pelos exemplos a seguir e reivindicações que são ilustrativos e não são significados ser limitativos também. Aqueles versados na técnica reconhecerão ou serão capazes de apurar usando experimentação mais rotineira, numerosos equivalentes para os procedimentos específicos descritos aqui. Tais equivalentes estão dentro do escopo da presente invenção e das reivindicações. Os conteúdos de todas as referências, incluindo patentes emitidas e pedidos de patente publicados, citados ao longo desta aplicação são por este meio incorporados por referência.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: GERAÇÃO DE ANTICORPOS DKK1-ESPECÍFICOS HUMANOS DA BIBLIOTECA DE HuCAL GOLD®

Anticorpos terapêuticos contra proteína de DKK1 humana são gerados por seleção de clones tendo afinidades de ligação altas, usando como a fonte de proteínas variantes de anticorpo uma biblioteca de exibição de fago comercialmente disponível, a biblioteca MorphoSys HuCAL GOLD®. HuCAL GOLD® é uma biblioteca de Fab (Knappik et al., 2000 J. Mol. Biol. 296:57-86; Krebs et al., 2001 J Immunol. Methods 254:67-84; Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem. 278(40):38194-38205) em que todas as seis CDRs são diversificadas através de mutação apropriada, e empregando a tecnologia de CysDisplay™ para ligar fragmentos de Fab à superfície de fago (WO 01/05950 Löhning 2001).

PROCEDIMENTOS GERAIS: SALVAMENTO DE FAGEMÍDEO, AMPLIFICAÇÃO DE FAGO, E PURIFICAÇÃO

A biblioteca HuCAL GOLD® é amplificada em meio bacteriano rico padrão (2xYT) contendo 34 µg/ml de cloranfenicol e 1% de glicose (2xYT-CG). Após infecção das células a uma OD_{600nm} de 0,5 com fagos auxiliares de VCSM13 (incubando a mistura de células e fago por 30 min a 37°C sem agitar seguido por 30 min a 37°C agitando a 250 rpm), as células são centrifugadas (4120 g; 5 min; 4°C), ressuspensas em 2xYT/34 µg/ml de cloranfenicol/50 µg/ml de canamicina/0,25 mM de IPTG, e crescidas durante a noite a 22°C. Ao término deste período, as células são removidas através de centrifugação, e os fagos PEG-precipitados duas vezes do sobrenadante, ressuspensos em PBS/20% de glicerol e armazenadas a 80°C.

Amplificação de fago entre dois ciclos de procedimento de seleção é conduzida como segue: células de TG1 de cepa de *E. coli* de fase de meio-log são infectadas com fagos, são eluídas seguindo a seleção com proteína de DKK1, e são banhadas sobre LB-ágar suplementado com 1% de glicose e 34 µg/ml de cloranfenicol (placas de LB-CG). Após incubação durante a noite das placas a 30°C, as colônias bacterianas são raspadas da superfície de ágar, e usadas para inocular meio de cultura de 2xYT-CG para obter uma OD_{600nm} de 0,5, depois fagos auxiliares de VCSM13 são adicionados para obter uma infecção produtiva como descrito acima.

20 PRÉ-EXPERIMENTOS PARA PROCEDIMENTO DE SELEÇÃO DE SOLUÇÃO USANDO CONTAS MAGNÉTICAS DE STREP-TACTIN

O marcador Strep-II foi relatado ter baixa afinidade para a matriz de Strep-Tactin ($K_D \sim 1 \mu M$ de acordo com (Voss e Skerra, 1997 Protein Eng. 10:975-982), portanto, um pré-experimento é executado para avaliar a conveniência de usar contas de MagStrep revestidas com Strep-Tactin para a captura do antígeno durante as seleções de anticorpo, e evitar perda de antígeno durante os procedimentos de seleção.

Para aquele propósito, 8 mg de contas de MagStrep são incubados com 46 µg de DKK1 marcado com His-Strep durante 1 h em temperatura ambiente e a amostra é dividida em quatro tubos de Eppendorf pré-bloqueados. Um tubo serviu como o controle positivo (nenhuma lavagem) e as outras três amostras são lavadas com severidades diferentes de acordo

com a seção de procedimento de seleção manual HuCAL GOLD®. Detecção da ligação do DKK1 marcado com His-Strep para as contas de MagStrep (contas magnéticas revestidas com Strep-Tactin obtidas de IBA, Göttingen, Alemanha) é executada em BioVeris usando um anticorpo de anti-DKK1 de cabra e um anticorpo de detecção de anticabra marcado com Rubídio.

Como mostrado na Figura 1 aqui, nenhuma perda significativa de DKK1 marcado com His-Strep das contas revestidas com Strep-Tactin é detectável quando as contas não-lavadas forem comparadas com aquelas contas lavadas com severidades de HuCAL® diferentes. Desse modo, o DKK1 marcado com His-Strep parecia ser adequado para o uso nos procedimentos de seleção de solução com contas magnéticas revestidas com Strep-Tactin (contas de MagStrep).

SELEÇÃO PARA PROCEDIMENTO DE SELEÇÃO DE ANTICORPOS DKK1-ESPECÍFICOS DA BIBLIOTECA

Para a seleção de anticorpos que reconhecem DKK1 humano, duas estratégias de procedimento de seleção são aplicadas.

Em resumo, anticorpos de fato de HuCAL de GOLD® são divididos em quatro fundos gerais compreendendo combinações diferentes de genes principais de V_H (fundo geral 1 continha V_H1/5 λ K; fundo geral 2 continha V_H3 λ K; fundo geral 3 continha V_H2/4/6 λ K; e fundo geral 4 continha V_H1-6 λ K). Estes fundos gerais são individualmente submetidos a dois ciclos de DKK1 marcado com His-Strep de procedimento de seleção de solução capturado sobre contas magnéticas de StrepTactin (contas de Mega Strep; IBA), e para o terceiro ciclo de seleção apenas, ou em DKK1 marcado com His-Strep capturado sobre contas magnéticas de StrepTactin ou em proteína de DKK1 humano marcado com APP capturado por contas de Estreptavidina (Dynabeads® M-280 Estreptavidina; Dynal) com um anticorpo de anti-APP biotinizado.

Em detalhes, para o procedimento de seleção de solução usando DKK1 marcado com His-Strep acoplado às contas magnéticas de Strep-Tactin, o protocolo a seguir é aplicado: tubos pré-bloqueados são preparados (tubos de Eppendorf de 1,5 ml) por tratamento com 1,5 ml de 2x Chemi-BLOCKER diluído 1:1 com PBS durante a noite a 4°C. Contas pré-

bloqueadas são preparadas através de tratamento como segue: 580 µl (28 mg de contas) de contas magnéticas de StrepTactin são lavados uma vez com 580 µl de PBS e ressuspensos em 580 µl de 1x ChemiBLOCKER (diluído em um volume 1x PBS). Bloqueio das contas é executado nos tubos pré-
5 bloqueados durante a noite a 4°C.

Partículas de fago diluídas em PBS a um volume final de 500 µl para cada condição de procedimento de seleção são misturadas com 500 µl de 2x ChemiBLOCKER/0,1% de Tween e mantidas durante uma hora em temperatura ambiente em uma roda giratória. Pré-adsorção das partículas
10 de fago para remoção de StrepTactin ou fagos de ligação de conta é executada duas vezes: 160 µl de contas magnéticas StrepTactin bloqueadas (4 mg) são adicionados às partículas de fago bloqueadas, e são incubadas por 30 min em temperatura ambiente em uma roda giratória. Após separação das contas por um dispositivo magnético (Dynal MPC-E), o sobrenadante de
15 fago (~1,1 ml) é transferido para um tubo de reação fresco, bloqueado e pré-adsorção é repetida usando 160 µl de contas bloqueadas por 30 min. Depois, DKK1 marcado com His-Strep, ou 400 nM ou 100 nM, é adicionado às partículas de fago bloqueadas em um tubo de reação de 1,5 ml fresco, bloqueado e a mistura é incubada por 60 min em temperatura ambiente em
20 uma roda giratória.

Os complexos de fago-antígeno são capturados usando ou 320 µl ou 160 µl de contas magnéticas de StrepTactin bloqueadas adicionados aos fundos gerais de procedimento de seleção de fago de 400 nM ou de 100 nM, respectivamente que são depois incubados por 20 min em temperatura ambiente em uma roda giratória. Partículas de fago ligadas às contas magnéticas de
25 StrepTactin são colhidas novamente com o separador de partícula magnético.

Contas são depois lavadas sete vezes com PBS/ 0,05% de Tween (PBST), seguido lavando outras três vezes com PBS apenas. Eluição das partículas de fago das contas magnéticas de StrepTactin é executada
30 por adição de 200 µl de 20 mM de DTT em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0 para cada tubo durante 10 min. O eluato é colhido, e as contas são lavadas uma vez com 200 µl de PBS e o eluato de PBS é adicionado ao eluato de DTT.

Esta amostra de eluato é usada para infectar 14 ml de uma cultura de *E. coli* de TG-1 que tinha sido crescida a uma OD_{600nm} de 0,6-0,8.

Após infecção e centrifugação subsequente por 10 min a 5000 rpm cada pelota bacteriana foi ressuspensa em 500 µl de meio de 2xYT, banhada sobre placas de ágar de 2xYT-CG e incubadas durante a noite a 30°C. A manhã seguinte, as colônias resultantes são raspadas das placas e o fago é preparado por salvamento e amplificação como descrito acima.

O segundo ciclo de procedimentos de seleção de solução em DKK1 marcado com His-Strep é executado de acordo com o protocolo do primeiro ciclo, exceto que quantidades decrescentes de antígeno são usadas (50 nM, e 10 nM) e a severidade do procedimento de lavagem é alterada apropriadamente.

Duas estratégias de procedimento de seleção diferentes são aplicadas ao terceiro ciclo de seleção: a saída de fago amplificada do segundo ciclo de procedimento de seleção é fendida e submetida a duas condições de procedimento de seleção diferentes. A primeira metade da saída de fago é usada para a estratégia de procedimento de seleção padrão em DKK1 marcado com His-Strep humano capturado sobre contas de StrepTactin como descrito acima (quantidades de antígeno são 10 nM ou 1 nM, respectivamente).

A segunda variação de procedimento de seleção para o terceiro ciclo de seleção é executada em DKK1 humano marcado com APP. Proteína de DKK1 marcada com APP a uma concentração final de 50 nM ou 10 nM é misturada com 1 ml de partículas de fago pré-clareadas, do segundo ciclo, e a mistura é incubada em temperatura ambiente durante 1 hora em uma roda giratória. Em paralelo, 8 mg de Estreptavidina pré-bloqueadas de Dynabeads M-280 (Dyna) são incubados com 40 µg de anticorpo de anti-APP de camundongo biotinilado por 30 min em temperatura ambiente em uma roda giratória seguido por duas etapas de lavagem com PBST. Os complexos pré-formados que consistem em fago-anticorpos ligados a DKK1 marcado com APP são capturados pelas contas magnéticas de M-280 Streptavidin revestidas com anti-APP durante 30 min em temperatura ambiente. Eluição

de fago e amplificação são executadas como descrito acima.

SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DE FRAGMENTOS DE Fab SOLÚVEIS

As inserções de codificação de Fab dos fagemídeos de HuCAL GOLD® selecionados são subclonados em vetor de expressão pMORPH®X9_Fab_FH para facilitar a expressão rápida e eficiente de Fab solúveis. Para este propósito, o DNA de plasmídeo dos clones selecionados é digerido com enzima de restrição endonucleases *Xba*I e *Eco*RI, assim excisando a inserção de codificação de Fab (ompA-VLCL e phoA-Fd). Esta inserção é depois clonada em vetor de expressão pMORPH®X9_Fab_FH digerido com *Xba*I/*Eco*RI.

Proteínas de Fab são expressas deste vetor, e como resultado carregam dois marcadores C-terminais (FLAG™ e 6xHis, respectivamente) para detecção e purificação.

MICROEXPRESSÃO DE HuCAL GOLD® ANTICORPOS DE Fab EM *E. COLI*

Para obter quantidades suficientes de proteína codificada por cada um dos clones obtidos acima, colônias bacterianas simples resistentes a cloranfenicol são selecionadas após subclonagem dos Fabs selecionados no vetor de expressão pMORPH®X9_Fab_FH. Cada uma destas colônias são depois usadas para inocular os poços de uma placa de microtitulação de 96 poços estéril, cada poço contendo 100 µl de meio de 2xYT-CG por poço, e as bactérias são crescidas durante a noite a 37°C. Uma amostra (5 µl) de cada cultura de TG-1 de *E. coli* é transferida para uma placa de microtitulação de 96 poços fresca, estéril pré-enchida com 100 µl de meio de 2xYT suplementado com 34 µg/ml de cloranfenicol e 0,1% de glicose por poço. As placas de microtitulação são incubadas a 30°C com agitação a 400 rpm em um agitador de microplaca até que as culturas tornem-se ligeiramente turvas (~2-4 h) com uma OD_{600nm} de cerca de 0,5.

Para expressão no formato destas placas, 20 µl meio de 2xYT suplementado com 34 µg/ml de cloranfenicol e 3 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranoside) são adicionados por poço (concentração final de 0,5 mM de IPTG), as placas de microtitulação vedadas com uma fita permeável por gás, e incubadas durante a noite a 30°C agitando a 400 rpm.

GERAÇÃO DE LISADOS DE CÉLULAS INTEIRAS (EXTRATOS DE BEL)

Para cada poço das placas de expressão, 40 µl de tampão de BEL (2xPBS/EDTA: 24,7 g/l de ácido bórico, 18,7 g de NaCl/l, 1,49 g de EDTA/l, pH 8,0) contendo 2,5 mg/ml lisozima são adicionados, e as placas são incubadas por 1 h a 22°C em um agitador de placa de microtitulação (400 rpm). Os extratos de BEL são usados para análise de ligação por FRET (vide Exemplo 2).

EXPRESSÃO DE QUANTIDADES DE MICROGRAMA DE ANTICORPOS HuCAL GOLD® Fab EM *E. COLI* E PURIFICAÇÃO

Expressão de fragmentos de Fab codificada por pMORPH@X9_Fab_FH em células F de TG1 de *E. coli* é realizada em tubos de plástico de 50 ml. Para este propósito, pré-culturas inoculadas com clones simples são crescidas em meio de 2xYT-CG durante a noite a 30°C. A manhã seguinte, 50 µl de cada pré-cultura são usados para inocular 25 ml de meio de 2xYT suplementado com 34 µg/ml de Cloranfenicol, 1 mM de IPTG, e 0,1% de glicose em tubos de plástico estéreis de 50 ml, e incubados durante a noite a 30°C. Células de *E. coli* são colhidas, as pelotas de células geladas e por fim rompidas com Bicho Buster (Novagen). Os fragmentos de Fab são isolados usando Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden, Alemanha).

EXPRESSÃO DE QUANTIDADES EM MILIGRAMA DE ANTICORPOS DE FAB HuCAL GOLD® EM *E. COLI* E PURIFICAÇÃO

Expressão de fragmentos de Fab codificados por pMORPH@X9_Fab_FH em células F de TG1 é realizada em culturas de frascos agitadores usando 750 ml de meio de 2xYT suplementado com 34 µg/ml de cloranfenicol. Culturas são agitadas a 30°C até que a OD_{600nm} alcançasse 0,5. Expressão é induzida por adição de 0,75 mM de IPTG seguido por incubação por 20 h a 30°C. Células são rompidas usando lisozima, e os fragmentos de Fab são isolados através de cromatografia de Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemanha). Concentrações de proteína são determinadas através de espectrofotometria UV (Krebs et al., 2001).

EXEMPLO 2: IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS DE HuCAL® DKK1-ESPECÍFICOS

Extratos de BEL de clones de *E. coli* individuais selecionados pelas estratégias de procedimento de seleção supracitadas são analisadas por Tecnologia de Ensaio de Microvolume Fluorométrico (FMAT™, analisador 8200 Cellular Detection System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.), para identificar clones codificando Fabs DKK1-específicos. O sistema de HTS de FMAT™ 8100 é um instrumento de triagem de rendimento alto, macro-confocal de fluorescência que automatiza a detecção de ensaios não-radioativos de mistura-e-leitura com células vivas ou contas (Miraglia, J. Biomol. Screening (1999), 4(4) 193-204).

10 ANÁLISE DE LIGAÇÃO COM BASE EM TECNOLOGIA DE ENSAIO DE MICROVOLUME FLUOROMÉTRICO (FMAT) PARA DETECÇÃO DE Fabs DE LIGAÇÃO DE DKK1 DE LISADOS BACTERIANOS

Para a detecção de ligação de anticorpos de Fab de DKK1 de lisados de *E. coli* (BEL extraí), ligação é analisada com o sistema de detecção celular FMAT 8200 (Applied Biosystems). Para acoplar DKK1 marcado com His-Strep sobre contas de Expóxi M-450 (Dynal), uma amostra de 300 µl de contas de Epóxi M-450 ($1,2 \times 10^8$ contas) é transferida para um tubo de reação e capturada com um separador de partícula magnético. O sobrenadante é removido e as contas são lavadas quatro vezes em 1 ml de 100 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 7,4. Para revestimento de antígeno, 60 µg de DKK1 marcado com His-Strep são adicionados à suspensão de conta em 150 µl de 100 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 7,4. A suspensão de antígeno-conta é incubada por 16 h em temperatura ambiente em uma roda giratória. As contas revestidas são depois lavadas três vezes com PBS e ressuspensas em um volume final de 250 µl de PBS.

Para cada placa de 384 poços, uma mistura de 20 ml de PBS contendo 3% de BSA, 0,005% de Tween-20, 4 µl de contas revestidas com DKK1 ($1,9 \times 10^6$ contas) e 4 µl de anticorpo de detecção de Cy5™ são preparados. Uma amostra de 45 µl desta solução é dispensada por poço em uma placa de fundo preto/claro de 384 poços de FMAT (Applied Biosystems). Extrato de BEL contendo Fab (5 µl) é adicionado a cada poço. As placas de FMAT são incubadas em temperatura ambiente durante a noite. A manhã seguinte, placas são

analisadas no Sistema de Detecção Celular 8200 (Applied Biosystems).

- Clones positivos são obtidos, e as seqüências de cadeia pesada e leve dos clones rendendo sinais positivos, específicos em FMAT são analisadas. É observado que, 57 clones de anti-DKK1 únicos (não-redundantes) são identificados que mostraram ligação forte suficiente a DKK1 humano. Estes clones são expressados, purificados e testados para afinidade e em ensaios funcionais.

DETERMINAÇÃO DAS AFINIDADES NANOMOLARES USANDO RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE

- Usando estes clones, análise de SPR de cinética é executada em uma fatia de CM5 (Biacore, Suécia) que tinha sido revestida com uma densidade de ~400 RU de qualquer DKK1 humano recombinante, DKK1 de camundongo (R&D System), ou DKK1 cinomolgo em 10 mM de acetato de Na pH 4,5 usando química de acoplamento de amina de EDC-NHS padrão. Uma quantidade comparável de albumina de soro humana (HSA) é imobilizada na célula de fluxo de referência. PBS (136 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,76 mM de KH₂PO₄ pH 7,4) é usado como o tampão corrente. As preparações de Fab são aplicadas em série de concentração de 16 - 500 nM a uma taxa de fluxo de 20 µl/min. Fase de associação é ajustada a 60 s e fase de dissociação a 120 s. Um sumário das afinidades em nM para cada um do DKK1 humano, de camundongo, e cinomolgo determinadas por aquele método é mostrado na Tabela 1 aqui.

Tabela 1. Afinidades de Fabs selecionados para cada um de humano, camundongo, e cinomolgo

Anticorpo	K _D [nM] DKK1 humano	K _D [nM] DKK1 de camundongo*	K _D [nM] DKK1 cino*
MOR04470	3,2 ± 2,0	3,6	1,7
MOR04516	2,6 ± 0,7	2,4	1,9
MOR04454	3,2 ± 0,4	6	2,7
MOR04456	7,9 ± 0,9	11,6	8,1
MOR04461	7,6 ± 3,3	12,8	7,3
MOR04455	1,6 ± 0,3	n.d.	1,5

* medição simples

n.d.: não determinado

EXEMPLO 3: IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS DE Fab DE DKK1 ANTI-HUMANOS INIBINDO A ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DE DKK1 DE WNT

Os 57 anticorpos DKK1-específicos diferentes resultantes selecionados da biblioteca HuCAL GOLD® são usados para obter anticorpo purificado que são depois testados quanto à potência para inibir a atividade antagonística de Wnt de DKK1 humano. Destes, 17 candidatos de anticorpo são funcionalmente ativos, como mostrados nas FIGS. 2 e 4.

A atividade funcional de cada um dos Fabs de HuCAL® é verificada usando um ensaio de gene repórter de luciferase. Doze sítios de ligação de TCF/Lef são clonados a montante do gene repórter de luciferase que torna o gene de luciferase responsivo a TCF/Lef. As proteínas de Wnt canônicas levam a uma estabilização de beta-catenina, assim ativando a transcrição de TCF/Lef e produzindo a proteína de luciferase. Adição de proteína de DKK1 bloqueia a atividade de Wnt e portanto também a transcrição do gene de luciferase. Por conseguinte, os níveis de luciferase produzidos pelas respectivas células são esperados correlatar com a potência dos Fabs selecionados para bloquear a ação de DKK1.

LINHAGEM CELULAR DE REPÓRTER RESPONSIVA A TCF/LEF ESTÁVEL HEK293T/17-12xSTF

Bioensaios são executados usando a linhagem celular repórter de células renais embrionárias humanas estáveis HEK293T/17-12xSTF. As células são cultivadas em meio de glicose alta de DMEM (Invitrogen), contendo 10% de FCS (PAN ou BioWhittaker) e 1 µg/ml de depuromicina (BD Biosciences), até que 90% de confluência fossem alcançados. As células são depois tripsinizadas, contadas, e diluídas em meio de cultura sem puromicina para uma concentração de 4×10^5 células por ml. Subseqüentemente, as células são semeadas em uma placa branca, de 96 poços de fundo chato (Corning; 100 µl de suspensão de célula por poço) e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante a noite. No próximo dia, o meio de ensaio é preparado: 500 ng/ml de DKK1-APP são adicionados ao Meio Condicionado de Wnt3a (CM). Os Fabs de anti-DKK1 de HuCAL® (concentração final 20 µg/ml) e o anticorpo de DKK1 anti-humano de cabra (R&D Systems) usado como um con-

trole positivo (concentração final 1,5 µg/ml) é diluído em CM.

Um volume de 60 µl de meio é removido de cada poço da placa de ensaio sem perturbar as células aderentes, e substituído por 60 µl do anticorpo de teste ou controle, diluído em CM. As células são incubadas por mais 24 h e 100 µl de reagente de luciferase de Bright-Glo são adicionados a cada poço. Após tempo de incubação de 5 min, a luminescência é lida em um luminômetro (GenioPro, Tecan). Os resultados obtidos com 20 dos 57 Fabs são mostrados na Figura 2 aqui. A extensão de luciferase expressa é uma medida da extensão de anticorpo presente.

10 EXEMPLO 4: ANÁLISE QUANTITATIVA DE AFINIDADES DE LIGAÇÃO:
DETERMINAÇÃO DE CANDIDATOS DE FAB DE DKK1 ANTI-HUMANO
QUE INIBEM A ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DE WNT DE DKK1
DETERMINAÇÃO DE AFINIDADE

15 A fim de também caracterizar os anticorpos de anti-DKK1, a afinidade para DKK1 humano, cinomolgo, e de camundongo é determinada. A proteína de DKK1 recombinante é imobilizada em uma fatia de CM5 Biacore e os Fabs são aplicados na fase móvel em concentrações diferentes. Para uma determinação segura das afinidades monovalentes apenas tais bateladas de Fab são usadas para medições de Biacore que mostraram fração monomérica $\geq 90\%$ em uma cromatografia de exclusão de tamanho.

20 Os dados de afinidade resumidos em DKK1 humano, de camundongo, e cinomolgo são mostrados na Tabela 2. Todos os 17 Fabs testados são observados ter afinidade a DKK1 humano abaixo de 100 nM. Também, nove dos clones produziram anticorpos com afinidades menores que 10 nM.

25 Em todos os casos testados, as afinidades para DKK1 cinomolgo e de camundongo são quase idênticas àquelas para DKK1 humano.

Tabela 2. Dados de afinidade de Fabs selecionados em humano, camundongo, e cinomolgo

Anticorpo	K _D [nM] DKK1 humano	K _D [nM] DKK1 de camundongo *	K _D [nM] DKK1 cino *
MOR04480	1,0 ± 0,0	2	n.d.
MOR04455	1,6 ± 0,3	n.d.	1,5
MOR04516	2,6 ± 0,7	2,4	1,9

MOR04470	3,2 ± 2,0	3,6	1,7
MOR04454	3,2 ± 0,4	6	2,7
MOR04483	5,5 ± 0,7	n.d.	n.d.
MOR04466	6,5 ± 2,1	n.d.	n.d.
MOR04461	7,6 ± 3,3	12,8	7,3
MOR04456	7,9 ± 0,9	11,6	8,1
MOR04462	16,5 ± 2,1	n.d.	n.d.
MOR04447	22*	n.d.	n.d.
MOR04469	36 ± 0,0	n.d.	n.d.
MOR04482	36 ± 5,7	n.d.	n.d.
MOR04468	41,5 ± 21,9	n.d.	n.d.
MOR04476	44*	n.d.	n.d.
MOR04481	65*	n.d.	n.d.
MOR04503	93*	n.d.	n.d.

* medição simples

n.d.: não determinado

DETERMINAÇÃO DE EC₅₀

Os dados mostrando a concentração eficaz para 50% de inibição para os clones de anticorpos tendo a maior afinidade por DKK1 são mostrados na Tabela 3 aqui. Os dados mostram que concentrações eficazes de EC₅₀ variam de 39-95 nM, com um valor mediano entre 58 e 83 nM.

Tabela 3. Concentração eficaz para 50% de inibição de Fabs selecionados

Anticorpo	Ensaio de repórter de luciferase EC ₅₀ [nM]
MOR04470	58
MOR04516	42
MOR04454	83
MOR04456	95
MOR04461	57
MOR04455	39

EXEMPLO 5: MATURAÇÃO DE AFINIDADE DE FABS DE ANTI-DKK1 SELECIONADOS POR PERMUTA PARALELA DE CASSETES DE LCDR3 E HCDR2

10

Para otimizar as afinidades dos anticorpos descritos aqui para DKK1 para um fundo geral de fragmentos de Fab parentais, o LCDR3, estrutura 4 e a região constante das cadeias leves (405 bp) de cada Fab parental é removido usando *Bpi*I e *Sph*I, e é substituído por um repertório de LCDR3s diversificados juntamente com a estrutura 4 e o domínio constante. Uma amostra de

0,5 µg do vetor de fundo geral de aglutinante é ligada com um excesso molar de 3 vezes do fragmento inserido carregando os LCDR3s diversificados.

Em um método similar, o HCDR2 é diversificado usando os sítios de *Xho*I e *Bss*HI, e as regiões de estrutura de conexão são mantidas constantes. Para aumentar a eficiência da clonagem, o HCDR2 parental é substituído por uma sequência de fragmento central de 590 bp antes da inserção do cassete de HCDR2 diversificado.

Misturas de ligação de 11 bibliotecas diferentes são eletroporadas em 4 ml de células de TOP10 F' de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), rendendo de 2×10^7 a 2×10^8 colônias independentes. Amplificação das bibliotecas é previamente executada como descrito (Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem. 278(40):38194-38205). Para controle de qualidade, vários clones por biblioteca são fortuitamente escolhidos e seqüenciados (Sequi-Serve, Vaterstetten, Alemanha) usando preparadores CFR84 (V_L) e O-CAL_Seq_Hp (V_H).

SELEÇÃO DE CANDIDATOS PARA MATURAÇÃO DE AFINIDADE

Seis candidatos de maturação selecionados ("Fabs parental") são selecionados por terem sido caracterizados como tendo as propriedades a seguir: afinidades para DKK1 humano menor que 10 nM, com reatividade cruzada significativa para DKK1 cinomolgo e de camundongo, EC_{50} menor que 100 nM, e níveis de expressão de Fab bom a moderado em *E. coli* e falta de agregação após purificação de Fab.

Durante o curso das medições de afinidade, ficou evidente que MOR04480 é altamente instável em diluições altas. Por este motivo, MOR04480 é omitido da lista de candidatos de maturação embora tivesse a afinidade mais alta (1 nM) e o melhor EC_{50} (7 nM) de todos Fabs testados. MOR04483 teve uma afinidade alta de 5,5 nM para DKK1 humano mas é mostrado ser reativo cruzado com DKK1 de camundongo, e MOR04453 continha uma proporção alta de agregados de Fab após purificação. Portanto, estes dois anticorpos são também excluídos da maturação.

Após avaliação cuidadosa de todos os dados disponíveis, seis candidatos de maturação (MOR04454, MOR04455, MOR04456, MOR04461,

MOR04470, e MOR04516) são selecionados. As propriedades destes candidatos estão listadas na Tabela 4 aqui.

Tabela 4. Propriedades de Fabs selecionados

Anticorpo	K _D [nM] DKK1 humano	K _D [nM] DKK1 de camundongo*	K _D [nM] DKK1 cino*	EC ₅₀ [nM]	Reatividade cruzada camundongo	Expressão de Fab [mg/l]	Cromatografia de exclusão de tamanho
MOR04470	3,2 ± 2,0	3,6	1,7	58	++	32,8	#
MOR04516	2,6 ± 0,7	2,4	1,9	42	++	1,5	#
MOR04454	3,2 ± 0,4	6	2,7	83	++	17,8	#
MOR04456	7,9 ± 0,9	11,6	8,1	95	++	10,7	#
MOR04461	7,6 ± 3,3	12,8	7,3	57	++	12	#
MOR04455	1,6 ± 0,3	n.d.	1,5	39	++	9	#

5 * medição simples

n.d.: não determinado

porção monomérica > 90%

GERAÇÃO DE BIBLIOTECAS DE Fab SELECIONADAS PARA MATURAÇÃO DE AFINIDADE

10 Para obter clones tendo afinidade aumentada e atividade inibidora dos anticorpos de anti-DKK1, os clones de Fab selecionados MOR04454, MOR04455, MOR04456, MOR04461, MOR04470, e MOR4516 mostrados no exemplo anterior são submetidos a outros ciclos de diversificação e seleção, um processo conhecido como maturação de afinidade.

15 Para este propósito, regiões de CDR são diversificadas usando cassetes de maturação pré-construídos de LCDR3 e HCDR2 correspondentes por mutagênese de trinucleotídeo (Virnekås et al., 1994 Acids Nucleic Res. 22:5600-5607; Nagy et al., 2002 Nature Medicine 8:801-807). Tabela 5 aqui mostra as seqüências de LCDR3 para os clones parentais MOR04454, MOR04455, MOR04456, MOR061, MOR04470 e MOR4516.

20 MOR04455, MOR04456, MOR061, MOR04470 e MOR4516.

Tabela 5. Seqüências de LCDR3 para Fabs selecionados

Anticorpo	V _L	Seqüência de LCDR3	SEQ ID NO:
MOR04454	K1	LQYYGMPP	21
MOR04455	K1	QQYDSIPM	22
MOR04456	K3	QQYGDEPI	23
MOR04470	L2	QSYASGNTKV	25
MOR04461	L2	STWDMTVDF	24
MOR04516	L1	ASFDMGSPNV	26

Tabela 6 aqui mostra as seqüências de HCDR2 para os clones parentais MOR04454, MOR04455, MOR04456, MOR061, MOR04470 e MOR4516.

Tabela 6. Seqüências de HCDR2 para Fabs selecionados

5

Anticorpo	V _H	Seqüência de HCDR2	SEQ ID NO:
MOR04454	H3	DGSHMDKPPGYVFAF	2
MOR04455	H3	HYMDH	3
MOR04456	H3	TIYMDY	4
MOR04461	H3	MGIDLDY	5
MOR04470	H3	HGIDFDH	6
MOR04516	H5	GIPFRMRGFDY	7

Fragmentos de Fab de vetor de expressão pMOR-PH@X9_Fab_FH são subclonados no vetor de fagemídeo pMORPH@25 (vide Patente U. S. N°. 6.753.136). Este vetor fornece a proteína de fago pIII fundida N-terminalmente em um resíduo de cisteína como também uma cisteína C-terminal na cadeia de anticorpo de Fd e desse modo permite exibição ligada a dissulfeto dos respectivos fragmentos de Fab na superfície de fago. Duas estratégias diferentes são aplicadas em paralelo para otimizar a afinidade e a eficácia dos Fabs parentais.

Cinco bibliotecas de Fab de anticorpo de fago são geradas em que o LCDR3 de cinco dos seis clones parentais é substituído por um repertório de seqüências de CDR3 de cadeia leve individuais. A maturação de LCDR3 de MOR04454 não é executada, como este clone tem um sítio de restrição de *BpI* adicional em uma das regiões de CDR e a enzima de restrição de *BpI* é usada para o procedimento de clonagem de biblioteca.

Em paralelo, a região de HCDR2 de cada clone parental é substituída por um repertório de seqüências de CDR2 de cadeia pesada individuais. Cada Fab parental é excisado e substituído para um fragmento central de 590 bp. Este fragmento central de DNA facilita a separação de bandas de vetor digerido simples de digerido duplo e reduz a base dos Fabs parentais de afinidade alta durante os procedimentos de seleção de maturação. Em uma etapa subsequente, o fragmento central é excisado dos plasmídeos de codificação de Fab de cada clone parental e substituído pelo cassete de maturação de HCDR2 altamente diversificado.

Bibliotecas de maturação de afinidade grandes de mais de 2×10^7 membros são geradas através de procedimentos de clonagem padrões, e os clones diversificados são transformados em células de TOP10F eletrocompetentes de *E. coli* (Invitrogen). Fagos apresentando Fab são preparados
5 como descritos acima no Exemplo 1.

Quatro fundos gerais de maturação são construídos para facilitar o processo de seleção subsequente: fundo geral 1a consistido das bibliotecas de LCDR3 de MOR04470, e MOR04516; fundo geral 1b consistido das bibliotecas de HCDR2 de MOR04470, e MOR04516; fundo geral 2a consisti-
10 do das bibliotecas de LCDR3 de MOR04454, MOR04455, MOR04456, e MOR04461; e fundo geral 2b consistido das bibliotecas de HCDR2 de MOR04454, MOR04455, MOR04456, e MOR04461.

Para cada fundo geral o procedimento de seleção é executado em solução usando quantidades decrescentes de DKK1 marcado com His-
15 Strep e captura de fago-antígeno através de contas de Strep-Tactin. Em paralelo, cada fundo geral é aplicado nos procedimentos de seleção usando quantidades decrescentes de DKK1 biotinilado, que é capturado sobre as placas revestidas com Neutravidina. A fim de aumentar a severidade do procedimento de seleção e selecionar taxas externas melhoradas, competição
20 com Fabs parentais purificados como também antígeno não-marcado é executada durante períodos de incubação prolongados.

Imediatamente após os procedimentos de seleção os fundos gerais de fagemídeo enriquecidos são subclonados no vetor de expressão de pMORPH@X9_FH. São escolhidos cerca de 2300 clones simples, e os
25 Fabs são induzidos com IPTG.

ESTRATÉGIAS DE PROCEDIMENTO DE SELEÇÃO DE MATURAÇÃO

Procedimentos de seleção usando os quatro fundos gerais de anticorpo são executados com DKK1 marcado com His-Strep e com DKK1 biotinilado marcado com His-Strep em solução para dois ou três ciclos, res-
30 pectivamente. Para cada uma das estratégias de procedimento de seleção, competição com as proteínas de Fab parentais purificadas ou com DKK1 marcado com APP não-marcado, como também baixas concentrações de

antígeno e lavagem extensiva, é usada para aumentar a severidade.

O procedimento de seleção de solução em DKK1 marcado com His-Strep não-rotulado é executado mais de dois ciclos de seleção principalmente de acordo com o protocolo padrão descrito no Exemplo 1. Exceções para estes procedimentos são a aplicação de quantidades reduzidas de antígeno (diminuindo de 5 nM para 1 nM), a severidade alta do procedimento de lavagem ou com ou sem competidor, e períodos de incubação prolongados de anticorpo-fagos juntamente com o antígeno.

Para o primeiro ciclo de seleção usando DKK1 biotinilado, os poços de uma placa de Neutravidin são lavados duas vezes com 300 µl de PBS. Os poços são bloqueados com 2x ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA) diluídos 1:1 em PBS (Tampão de Bloqueio). Antes das seleções, os fagos de HuCAL GOLD® são também bloqueados com um volume de Tampão de Bloqueio contendo 0,1% de Tween-20 por 30 min em temperatura ambiente. As preparações de fago bloqueado são transferidas em alíquotas de 100 µl para os poços de uma placa revestida com Neutravidina por 30 min em temperatura ambiente. Esta etapa de pré-adsorção é repetida uma vez. Preparações de fago bloqueadas e pré-clareadas são incubadas com 5 nM de DKK1 biotinilado por 2 h a 22°C em uma roda giratória. Fab parental, APP-DKK1 ou nenhum competidor são adicionados e as amostras são incubadas durante a noite a 4°C em uma roda giratória.

Complexos de antígeno-fago são capturados nos poços de uma placa de Neutravidina por 20 min em temperatura ambiente. Após etapas de lavagem extensivas, partículas de fago ligadas são eluídas por adição de 200 µl de 20 mM de DTT em 10 mM de Tris pH 8,0 por poço durante 10 min em temperatura ambiente. O eluato é removido e acrescentado a 14 ml de células de TG1 de *E. coli* crescidas a uma OD_{600nm} de 0,6-0,8. Os poços são enxaguados uma vez com 200 µl de PBS e esta solução é também adicionada às células de TG1 de *E. coli*. Infecção de fago de *E. coli* é permitida por 45 min a 37°C sem agitação. Após centrifugação por 10 min a 5000 rpm, as pelotas bacterianas foram cada uma ressuspensas em 500 µl de meio de 2xYT, banhadas sobre placas de ágar de 2xYT-CG e incubadas durante a

noite a 30°C. As colônias são colhidas raspando da superfície das placas e as partículas de fago são salvas e amplificadas como descrito acima.

O segundo e terceiro ciclo da seleção são executados como descrito acima para o primeiro ciclo de seleção, exceto que as condições de lavagem são mais rigorosas e concentrações de antígeno são 1 e 0,1 nM, respectivamente.

ANÁLISE DE LIGAÇÃO COM BASE EM ELETROQUIMIOLUMINESCÊNCIA (BIOVERIS) DE Fabs DE LIGAÇÃO DE DKK1

Para a detecção de fragmentos de anticorpo DKK1-específicos de afinidade melhorada em lisados de *E. coli* (extratos de BEL), uma Estação de Trabalho de BioVeris M-384 SERIES® (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK), é usada. O ensaio é realizado em placas de microtitulação de polipropileno de 96 poços e PBS suplementado com 0,5% de BSA e 0,02% de Tween-20 como o tampão de ensaio. DKK1 humano biotinizado é imobilizado em contas paramagnéticas de estreptavidina M-280 (Dynal) de acordo com as instruções do fornecedor. Uma diluição 1:25 da solução de matéria-prima de conta é adicionada por poço. Amostras de 100 µl de extratos de BEL diluídos e contas são incubadas durante a noite em temperatura ambiente em um agitador. Para detecção, (Fab)'2 anti-humano (Dianova) marcado com BV-tag™ de acordo com as instruções do fornecedor (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) é usado.

Um conjunto de cerca de 2300 clones fortuitamente escolhidos é analisado pelo método descrito acima. Um subconjunto de 160 clones que dão os valores mais altos é escolhido para análise adicional na titulação de equilíbrio de solução.

DETERMINAÇÃO DE AFINIDADES PICOMOLARES USANDO TITULAÇÃO DE EQUILÍBRIO DE SOLUÇÃO (SET)

Para determinação de K_D , as frações de monômero (pelo menos 90% de teor de monômero, analisados por SEC analítico; Superdex75, Amersham Pharmacia) de Fab são usadas. Determinação de afinidade com base em eletroquimioluminescência (ECL) na solução e avaliação de dados são executadas basicamente como descrito por Haenel et al., 2005. Uma quantidade cons-

tante de Fab é equilibrada com concentrações diferentes (diluições 3ⁿ seriais) de DKK1 humano (4 nM de concentração de partida) na solução. DKK1 humano biotinilado acoplado às contas paramagnéticas (M-280 Streptavidin, Dynal), e (Fab)² anti-humano marcado (Dianova) com BV-tag™ (BioVeris Europe, 5 Witney, Oxfordshire, UK) é adicionado e a mistura incubada por 30 min. Subseqüentemente, a concentração de Fab não-ligado é quantificada por detecção de ECL usando o analisador M-SERIES® 384 (BioVeris Europe).

Para este propósito, 160 clones simples e purificados por Ni-NTA Agarose são selecionados na escala µg. Afinidades preliminares são 10 determinadas através de titulação de equilíbrio de solução de 4 pontos (SET) em BioVeris. Destes dados, 20 clones mostrando afinidades são selecionados. Estes Fabs são purificados na escala mg. MOR04950 é excluído da determinação de afinidade e avaliação também devido à agregação parcial do Fab, que é detectada na cromatografia de exclusão de tamanho. Afinida- 15 des finais são determinadas de duas bateladas independentes de cada clone de Fab usando uma medição de SET de 8 pontos para DKK1 humano, camundongo, e cinomolgo.

Determinação da afinidade para DKK1 de camundongo e cinomolgo é feita essencialmente como descrito acima usando DKK1 de camundongo (R&D Systems) e DKK1 cinomolgo como analito na solução em vez 20 de DKK1 humano. Para detecção de Fab livre, DKK1 humano biotinilado acoplado às contas paramagnéticas é usado. As afinidades são calculadas de acordo com Haenel et al., 2005 Anal Biochem 339.1:182-184.

Usando as condições de ensaio descritas acima, as afinidades 25 para os Fabs de anti-DKK1 otimizados para afinidade são determinadas em solução. Afinidades são determinadas para MOR04910 e MOR04946, com K_Ds abaixo de 30 pM para DKK1 humano e entre 36 e 42 pM para DKK1 de camundongo e cinomolgo. Sete anticorpos também mostraram afinidades abaixo de 100 pM para todos os três antígenos. Clone MOR04950 não mos- 30 trou ligação ao DKK1 biotinilado. As afinidades estão resumidas na Tabela 7 aqui.

Tabela 7. Afinidades de Fabs

	Afinidade [pM]: titulação de equilíbrio de solução *		
Anticorpo	DKK1 humano	Cyno DKK1	Camundongo DKK1
MOR04913	38 ± 8	51 ± 10	44 ± 48
MOR04946	25 ± 9	36 ± 9	41 ± 15
MOR04907	114 ± 7	170 ± 35	167 ± 68
MOR04945	69 ± 18	80 ± 31	74 ± 21
MOR04914	94 ± 5	140 ± 3	200 ± 261
MOR04920	53 ± 37	50 ± 20	40 ± 30
MOR04954	110 ± 54	112 ± 25	36 ± 4
MOR04952	100 ± 12	58 ± 17	71 ± 34
MOR04948	57 ± 8	67 ± 17	65 ± 25
MOR04910	24 ± 3	37 ± 11	42 ± 38
MOR04921	variação alta de atelada para batelada		
MOR04947	32 ± 19	58 ± 35	30 ± 17
MOR04951	136 ± 120	62 ± 2	132 ± 90
MOR04918	110-690	236 ± 23	550-3144
MOR04919	64 #	132 #	111 #
MOR04949	30 ± 23	55 ± 35	65 ± 36
MOR04922	90 #	70 #	50 #
MOR04911	140 #	190 #	650 #
MOR04950	nenhuma ligação		

*: pelo menos duas medições independentes executadas de duas bateladas de Fab diferente

#: medição simples apenas

EXEMPLO 6: CARACTERIZAÇÃO DE Fabs DE DKK1 DE ANTI-HUMANO OTIMIZADO PARA AFINIDADE

TÉCNICAS DE ENSAIO IMUNOABSORVENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)

- 5 Especificidade de ligação dos Fabs maduros na presença de 50% de soro humano (HS) é determinada. Diluições seriais de DKK1 humano recombinante, biotinilado são revestidas em TBS sobre placas de microtitulação de Neutravidina por 2 h em temperatura ambiente, de 8 ng DKK1 por poço para uma concentração de 125 ng DKK1 por poço. Após revestimento do antígeno, poços são bloqueados com TBS/0,05% de Tween (TBS-T) suplementado com
- 10 1% de BSA por 1 h em temperatura ambiente. Fabs purificados descritos acima ou são diluídos em TBS/4% de BSA ou TBS/50% de HS a uma concentração final de 1 µg/ml, adicionados aos poços revestidos e bloqueados e as placas são incubadas para 1 h em temperatura ambiente. Para detecção, um anticorpo

conjugado com (AP) de fosfatase alcalina de anti-FLAG (diluição de 1:5000 em TBST) e o substrato fluorogênico AttoPhos (Roche) são usados. Após cada incubação, os poços das placas de microtitulação são lavados com TBST cinco vezes, exceto após a etapa de incubação final com o anticorpo secundário marcado quando os poços são lavados três vezes.

A fluorescência é medida em uma leitora de placa de TECAN Spectrafluor. Curvas de ligação exemplares são mostradas na Figura 3 aqui. Tabela 8 resume a atividade de ligação dos Fabs de anti-DKK1 otimizados na presença de 50% de soro humano comparada à atividade de ligação em 4% de BSA variando de 83% a 100%. O valor mediano é observado ser 93%, desse modo os Fabs de anti-DKK1 são observados completamente ligarem-se ao alvo na presença de soro humano.

Tabela 8. Atividade de ligação de Fabs

Anticorpo	Atividade de ligação w/50% de soro Humano vs 4% de BSA (%)
MOR04945	89 ± 6
MOR04910	84 ± 4
MOR04946	93 ± 2
MOR04913	89 ± 9
MOR04920	90 ± 7
MOR04948	100 ± 15
MOR04952	100 ± 5
MOR04921	93*
MOR04914	83*
MOR04907	> 83*
MOR04954	> 83*
MOR04937	95*
* medição simples	

15 ENSAIO DE CÉLULA REPÓRTER DE LUCIFERASE NA PRESENÇA DE SORO HUMANO USANDO A LINHAGEM CELULAR DE U2OS

Para uma outra determinação de especificidade de ligação dos Fabs de anti-DKK1 otimizados, o ensaio de célula repórter de luciferase é repetido na presença de 15% de soro humano usando a linhagem celular de osteossarcoma U2OS. As células de U2OS (ATCC No. HTB-96) são crescidas de acordo com o protocolo do fornecedor (ATCC, Manassas, VA, USA). As células são tripsinadas, contadas, e diluídas em meio de cultura (McCoy

5a/10% de FCS) para uma concentração de 2×10^5 células/ml. Para cada 2×10^4 células, uma solução é preparada que é uma mistura de 0,075 µg de pTA-LUC-12xSuperTopFlash e 0,004 µg de phRL-SV40. Estes são misturados em um volume final de 9,8 µl de OPTI-MEM. Depois 0,2 µl de Reagente de Transfecção FuGENE 6 (Roche, Mannheim, Alemanha) é adicionado. Esta mistura de transfecção é incubada brevemente e depois misturada com as células previamente preparadas. Subseqüentemente, as células são semeadas em 100 µl por poço de um prato de cultura de célula de 96 poços de fundo chato branco e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante a noite. O próximo dia, 75 µl de meio são removidos de cada poço da placa de ensaio e substituídos por 10 µl de diluições de anticorpos de Fab HuCAL® (10 a 0,01 µg/ml diluído em meio de cultura livre de soro), 15 µl de 70% de FCS ou Soro Humano, e 50 µl do Meio Condicionado de Wnt3a, contendo 600 ng/ml de DKK1-APP são adicionados a cada poço.

Para um controle negativo, meio livre de soro é adicionado em vez das diluições de anticorpo. Para obter um sinal de luciferase máximo, controles contendo 10 µl de meio livre de soro em vez de diluições de anticorpo e 50 µl de CM de Wnt3a CM sem DKK1-APP são adicionados. Após incubação de 24 h a 37°C, 5% de CO₂, a luminescência é medida com o Sistema de Ensaio de Luciferase Dual-Glo (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 9 mostra a atividade inibidora dos Fabs de anti-DKK1 otimizados na presença de 15% de soro humano (comparada à atividade inibidora em 15% de FCS). Os dados mostram que a atividade obtida na presença de soro variou de 26% a 90%, com um valor mediano de 70-74%. Estes dados mostram que clones dos Fabs de anti-DKK1 são obtidos Fabs que função na presença de soro humano.

Tabela 9. Atividade inibidor de Fabs

Anticorpo	Ensaio de repórter luciferase com/sem Kremen; Atividade em 15% de soro humano (%)
MOR04945	74%
MOR04910	90%

MOR04946	60%
MOR04913	88%
MOR04920	75%
MOR04948	70%
MOR04952	60%
MOR04921	26%
MOR04914	80%
MOR04907	54%
MOR04954	55%
MOR04937	84%

DETERMINAÇÃO DE EC₅₀ DE Fabs DE ANTI-DKK1 OTIMIZADOS PARA AFINIDADE POR ENSAIO DE CÉLULA DE REPÓRTER DE LUCIFERASE

O teste do Fabs melhorados para afinidade no ensaio de repórter de luc TCF/LEF Wnt3a-dependente padrão usou 10 nM de DKK1 para obter inibição da expressão de luciferase. É visto que valores de EC₅₀ não puderam ser gerados por este método visto que a sensibilidade do ensaio é muito baixa. Isto é indicado por curvas de inibição muito íngremes e valores de EC₅₀ similares para todos os Fabs testados como visto na Figura 4 aqui.

Uma versão melhorada do ensaio de repórter de luc de TCF/LEF é desenvolvida. DKK1 liga às proteínas de transmembrana Kremen-1 e -2 e esta interação leva a uma inibição sinérgica forte da sinalização de Wnt (Mao et al. 2002 Nature: 417: 664-67). Portanto, cDNA de Kremen é co-transfeccionado com o ensaio de repórter de luc de TCF/LEF. O ensaio de repórter Wnt3a-dependente resultante mostrou sensibilidade altamente melhorada a DKK1, mediado por co-expressão da proteína de co-receptor de Kremen. Neste ensaio, 0,33 nM de DKK1 é suficiente para induzir inibição total de sinalização de Wnt. As titulações de Fab (a dez concentrações) são repetidas usando 0,33 nM de DKK1, e renderam curvas de inibição sigmóides (Figura 5 aqui) das quais os valores de EC₅₀ poderiam ser calculados.

Os Fabs de anti-DKK1 otimizados por afinidade são assim analisados com respeito ao EC₅₀ como descrito acima. Como mostrado na Tabela 10 aqui, os valores de EC₅₀ obtidos por este método variaram de 0,2 nM a 5,6 nM.

Tabela 10. EC₅₀ DOS Fabs

Anticorpo	Ensaio de luc de TCF/LEF com Kremen: EC ₅₀ [nM]
MOR04913	0,5
MOR04946	0,2
MOR04907	0,9
MOR04945	0,5
MOR04914	1,1
MOR04920	1,8
MOR04954	1,3
MOR04952	0,6
MOR04948	0,5
MOR04910	0,3
MOR04921	0,7
MOR04947	1,7
MOR04951	2,2
MOR04919	2,7
MOR04949	5,3
MOR04922	2
MOR04911	5,6

ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DOS Fabs OTIMIZADOS PARA AFINIDADE

- 5 As seqüências de nucleotídeo das regiões pesadas e de V_L (V_H e V_L) de todos os vinte Fabs é determinada. Seqüências de aminoácido das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) são listadas na Tabela 11A e Tabela 11B aqui.

Tabela 11A. Sequências de aminoácido de CDR's de Cadeia Pesada

	Anticorpo	VH	HCDR1	SEQ ID N°. HCDR1	HCDR2	SEQ ID N°. HCDR2	HCDR3	SEQ ID N°. HCDR3
P	MOR04455	VH3	GFTFSSYGMS	3	WVSGISGSGSYTYADSVKG	3	HYMDH	3
1	MOR04918	VH3	GFTFSSYGMS	49	WVSGISERGVIYFADSVKG	57	HYMDH	65
P	MOR04456	VH3	GFTFNNGMT	4	WVSGISGSGSYTYADSVKG	4	TIYMDY	4
2	MOR04907	VH3	GFTFNNGMT	8	WVSGISGSGSYTYADSVKG	8	TIYMDY	8
3	MOR04946	VH3	GFTFNNGMT	10	WVSGISGSGSYTYADSVKG	10	TIYMDY	10
4	MOR04949	VH3	GFTFNNGMT	50	WVSGISGSGSYTYADSVKG	58	TIYMDY	66
5	MOR04913	VH3	GFTFNNGMT	9	WVSGISGSGSYTYADSVKG	9	TIYMDY	9
P	MOR04461	VH3	GFTFSSYWMS	5	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	5	MGIDL DY	5
6	MOR04911	VH3	GFTFSSYWMS	51	WVSDIEHKRRAGGATSYA- ASVKG	59	MGIDL DY	67
7	MOR04922	VH3	GFTFSSYWMS	52	WVSMIEHKTRGGTTDYA- APVKG	60	MGIDL DY	68
8	MOR04910	VH3	GFTFSSYWMS	11	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	11	MGIDL DY	11
9	MOR04948	VH3	GFTFSSYWMS	13	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	13	MGIDL DY	13
10	MOR04919	VH3	GFTFSSYWMS	53	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	61	MGIDL DY	69
11	MOR04921	VH3	GFTFSSYWMS	12	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	12	MGIDL DY	12
P	MOR04470	VH3	GFTFSSYWMS	6	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	6	HGIDFDH	6
12	MOR04914	VH3	GFTFSSYWMS	14	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	14	HGIDFDH	14
13	MOR04945	VH3	GFTFSSYWMS	16	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	16	HGIDFDH	16
14	MOR04951	VH3	GFTFSSYWMS	54	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	62	HGIDFDH	70
15	MOR04952	VH3	GFTFSSYWMS	55	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	63	HGIDFDH	71
16	MOR04950	VH3	GFTFSSYWMS	56	WVSVIEHKSFSGSATFYA- ASVKG	64	HGIDFDH	72
17	MOR04954	VH3	GFTFSSYWMS	18	WVSVIEHKDKGGTTYA- ASVKG	18	HGIDFDH	18
18	MOR04920	VH3	GFTFSSYWMS	15	WVSSIEHKDAGYTTWYA- AGVKG	15	HGIDFDH	15
P	MOR04516	VH5	GYSFTNYIG	7	WMGIYPTDSYTNYSFSGQ	7	GIPFR- MRGFDY	7
19	MOR04947	VH5	GYSFTNYIG	19	WMGIYPGTSYTYNYSFSGQ	19	GIPFR- MRGFDY	19

Tabela 11B. Sequências de aminoácido de CDR's de Cadeia Leve

Anticorpo de MOR N°	V _L	HCDR1	SEQ ID N°	HCDR2	SEQ ID No.	hCDR3	SEQ ID N°	Comentário
P 04455	K1	RASQDISNYLH	22	LLIYGASNLQS	22	QQYDSIPM	22	
1 04918	K1	RASQDISNYLH	73	LLIYGASNLQS	81	QQYDSIPM	89	
P 04456	K3	RASQNLFSPLYA	23	LLIYGASNRAT	23	QQYGDEPI	23	
2 04907	K3	RASQNLFSPLYA	27	LLIYGASNRAT	27	QQYLSLPT	27	
3 04946	K3	RASQNLFSPLYA	29	LLIYGASNRAT	29	QQYLTPL	29	
4 04949	K3	RASQNLFSPLYA	74	LLIYGASNRAT	82	QQYLFPL	90	
5 04913	K3	RASQNLFSPLYA	28	LLIYGASNRAT	28	QQYMTLPL	28	Mutação de FW4
P 04461	L2	TGTSSDVGGFNYS	24	LMIHGGSNRPS	24	STWDMTVDF	24	
6 04911	L2	TGTSSDVGGFNYS	75	LMIHGGSNRPS	83	STWDMTVDF	91	
7 04922	L2	TGTSSDVGGFNYS	76	LMIHGGSNRPS	84	STWDMTVDF	92	
8 04910	L2	TGTSSDVGGFNYS	30	LMIHGGSNRPS	30	QSWDVSPITA	30	
9 04948	L2	TGTSSDVGGFNYS	32	LMIHGGSNRPS	32	QTWDSLFF	32	
10 04919	L2	TGTSSDVGGFNYS	77	LMIHGGSNRPS	85	QSWGVGPGGF	93	
11 04921	L2	TGTSSDVGGFNYS	31	LMIHGGSNRPS	31	QTWATSPSS	31	
P 04470	L2	TGTSSDLGGYNYS	25	LMYDVNNRPS	25	QSYASGNTKV	25	
12 04914	L2	TGTSSDLGGYNYS	33	LMYDVNNRPS	33	QSYTYTPISP	33	
13 04945	L2	TGTSSDLGGYNYS	35	LMYDVNNRPS	35	QTYDQIKLSA	35	
14 04951	L2	TGTSSDLGGYNYS	78	LMYDVNNRPS	86	QSYDPFLDVV	94	
15 04952	L2	TGTSSDLGGYNYS	79	LMYDVNNRPS	87	QSYDSPTDSV	95	
16 04950	L2	TGTSSDLGGYNYS	80	LMYDVNNRPS	88	QSYASGNTKV	96	
17 04954	L2	TGTSSDLGGYNYS	37	LMYDVNNRPS	37	QSYASGNTKV	37	
18 04920	L2	TGTSSDLGGYNYS	34	LMYDVNNRPS	34	QSYASGNTKV	34	Mutação de ponto de HCDR2
P 04516	L1	SGSSSNIGSSSFVN	26	LLIGNNSNRPS	26	ASFDMGSPNV	26	Sítios potenciais de N-glicosila
19 04947	L1	SGSSSNIGSSSFVN	38	LLIGNNSNRPS	38	ASFDMGSPNV	38	Sítios potenciais de N-glicosila
consenso1		RASQxxxxxYx	131	LLIYGASNxxx	132	QQYxxxPx	133	
consenso2		TGTSSDVGGFNYS	134	LMixDxxNRPS	135	xxWDxxxxx	136	

A análise de sequência mostrou que cinco dos seis Fabs parentais (P) renderam os sucessores melhorados para afinidade. MOR04461 e MOR04470 poderiam ser otimizados em HCDR2 como também em LCDR3. Nenhum sucessor otimizado é obtido de MOR04454. Além disso, homologia alta aparece entre anticorpos de origem distintos, como mostrado nas sequências consenso1 e consenso2 para as várias CDRs na Tabela 11B. Sequências de consenso similares podem ser fornecidos para sequências de origem mostradas na Tabela 10A usando métodos bem conhecidos a alguém versado na técnica.

Além disso, é determinado que MOR04920 tem uma mutação na região de HCDR2 (um resíduo de Ser para um Gly na pos. 73 de acordo com o esquema de numeração publicado por Honegger e Pluckthun, 2001 J Mol Biol 309.3:657-670) desse modo divergindo do projeto de HuCAL®.

MOR04913 é mostrado ter uma mutação de ponto na estrutura 4 da cadeia leve de capa (troca de Lys por Asn na posição 148). Como nesta posição não é esperado ter um efeito nas propriedades de ligação do anticorpo, a mutação é revertida para a composição de linha germinativa/de HuCAL® durante a conversão de IgG, rendendo o anticorpo MOR05145.

MOR04947 tem um sítio de glicosilação potencial em LCDR2. Este sítio não é removido quando MOR04947 é selecionado apenas como um dos candidatos de assistência.

EXEMPLO 7: PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS DE HuCAL® CONVERSÃO PARA O FORMATO DE IgG

Para expressar imunoglobulina de comprimento total (Ig), fragmentos de domínio variável de cadeias pesadas (V_H) e leves (V_L) ou são subclonados dos vetores de expressão de Fab pMORPH®X9_FH na série de vetor pMORPH®_h_Ig ou pMORPH®2_h_Ig para IgG1 humana e IgG4 humana. Vetores alternativos podem ser usados para IgG2 humana. Enzimas de restrição *EcoRI*, *MfeI*, e *BlnI* são usados para subclonagem do fragmento de domínio de V_H em pMORPH®_h_IgG1 e pMORPH®_h_IgG4. Enzimas de restrição *MfeI* e *BlnI* são usadas para subclonagem do fragmento de domínio de V_H em pMORPH®2_h_IgG1f e pMORPH®2_h_IgG4. Subclo-

nagem do fragmento de domínio de V_L em pMORPH@_h_Igk e pMORPH@2_h_Igk é executada usando os sítios de *EcoRV* e *BsiWI*, enquanto que subclonagem em pMORPH@_h_Igλ e pMORPH@2_h_Igλ2 é feita usando *EcoRV* e *HpaI*.

5 EXPRESSÃO TRANSIENTE E PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA

Células de HEK293 são transfeccionadas com uma quantidade equimolar de vetores de expressão de IgG de cadeia pesada e leve. Nos dias 4 ou 5 após transfecção, o sobrenadante de cultura de célula é colhido. Após ajustar o pH do sobrenadante em 8,0 e filtração estéril, a solução é submetida à cromatografia de coluna de proteína padrão A (Poros 20A, PE Biosystems).

10 CONVERSÃO DE Fabs PARENTAIS NOS FORMATOS DE IgG

Em paralelo ao começo da maturação de afinidade, MOR04454, MOR04456, e MOR04470 são clonados nos vetores de expressão pMORPH@_h_IgG1 e pMORPH@_h_IgG4. Podem ser usadas construções alternativas para criação de vetores de expressão de IgG2. Expressão de escala pequena é executada por transfecção transiente de células de HEK293 e as imunoglobulinas de comprimento total são purificadas do sobrenadante de cultura de célula.

Os dados mostram através de cromatografia de exclusão de tamanho que os anticorpos estão em forma monomérica. Testagem no ensaio de repórter Wnt3a-dependente provou que as proteínas são funcionais.

20 EXEMPLO 8: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDO E SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEO DE GENES OTIMIZADOS PARA EXPRESSÃO

Para aumentar expressão mamífera, alterações são introduzidas nas cadeias pesadas e leves de Fabs aqui para otimização de uso de códon para expressão em uma célula. É conhecido que vários motivos de ação negativamente cis diminuem a expressão em mamíferos. O processo de otimização aqui remove sítios de ação cis negativa (tais como sítios de corte ou sinais de poli(A)) que negativamente influenciam a expressão. O processo de otimização aqui também enriquece o conteúdo de GC, para prolongar a

30 meia-vida de mRNA.

Regiões de cadeia leve e pesada variáveis são otimizadas usando

um clone de um Fab, MOR04945 (seqüência de nucleotídeo parental de cadeia leve de comprimento total é SEQ ID NO: 98 e seqüência de nucleotídeo parental de cadeia pesada de comprimento total é SEQ ID NO: 102), isolado aqui por seleção com exibição de fago. Depois as seqüências de nucleotídeo que codifi-

5 cam cada uma das cadeias leves e pesadas inteiras destes e outros clones são cada uma otimizadas usando estes procedimentos.

PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO PARA CADEIAS DE V_H E V_L DE MOR04945

Para otimizar a seqüência de nucleotídeo e seqüência de aminoácido de cada uma das cadeias de V_L e V_H para expressão em células

10 mamíferas, o uso de códon é adaptado à impulsão de códon de genes mamíferos. Além disso, as regiões de conteúdo de GC muito alto (> 80%) ou muito baixo (< 30%) são reduzidas ou eliminadas onde possível. Alternativamente, otimização para expressão em bactérias, levedura ou baculovírus requereria adaptar o uso de códon reforçado para seus respectivos genes.

15 Durante o processo de otimização para expressão mamífera, os motivos de seqüência de ação cis a seguir são evitados: caixas TATA internas, qui-sítios e sítios de entrada ribossômica, extensões de seqüência rica em AT ou rica em GC, elementos de seqüência de motivo de instabilidade de RNA (ARE), elementos inibidores de seqüência RNA (INS), elementos de seqüência

20 responsivos a cAMP (CRS), seqüências repetidas e estruturas secundárias de RNA, sítios doadores e aceitantes de corte incluindo sítios secretos, e pontos de ramificação. Exceto como indicado, introdução de MluI e sítios de HindIII é evitada no processo de otimizar a seqüência de nucleotídeo da cadeia de V_L. Exceto como indicado, introdução de sítios de MlyI e BstEII é evitada no pro-

25 cesso de otimizar a seqüência de nucleotídeo da cadeia de V_H.

SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDO DE CADEIAS DE V_H E V_L DE MOR04945 OTIMIZADO PARA EXPRESSÃO

Uso de códon é adaptado pra aqueles mamíferos descritos para permitir as taxas de expressão mais altas e mais estáveis em uma célula

30 mamífera para as seqüências de aminoácido otimizadas resultantes para as cadeias de V_H e V_L do clone MOR04945 acima. Vide Exemplo 5.

Tabela 12A abaixo mostra as seqüências de nucleotídeo da ca-

deia leve variável senses e antissenses (AS) (SEQ ID NO: 120) e a sequência de aminoácido de cadeia leve variável resultante (designada AA) (SEQ ID NO: 118) como otimizado para expressão.

TABELA 12A. Sequências de nucleotídeo senses e antissenses, e sequências de aminoácido de cadeia de V_H otimizadas para expressão

	<i>MluI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>BstNI</i>
	ACGCGTTGCGATATCGCCCTGACCCAGCCCGCCAGCGTGTCCGG		
10	CAGCCCTGGCCAGAGC (Sense)		
1	-----+-----+-----+-----+-----+-----+		
	TGCGCAACGCTATAGCGGGACTGGGTCTGGGCGGTTCGCACAGGCCGTC		
	GGGACCGGTCTCG (AS)		
	T_R_C_D_I_A_L_T_Q_P_A_S_V_S_G_S_P_G_Q_		
15	S_ (AA)		
	<i>PvuII</i>	<i>BstNI</i>	<i>BstNI</i>
	ATCACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCAGCGACCTGGGCGGCTACAAC		
	TACGTGTCCTGG (Sense)		
61	-----+-----+-----+-----+-----+-----+		
20	TAGTGGTAGTCGACATGGCCGTGGTCGTCGCTGGACCCGCCGATGTTG		
	ATGCACAGGACC (AS)		
	I_T_I_S_C_T_G_T_S_S_D_L_G_G_Y_N_Y_V_S_		
	W_ (AA)		
25	TATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGATGATCTACGACGTG		
	AACAACAGACCT (Sense)		
121	-----+-----+-----+-----+-----+-----+		
	ATAGTCGTCTGTTGGGGCCGTTCCGGGGGTTCTCGACTACTAGATGCTGCAC		
	TTGTTGTCTGGA (AS)		
30	Y_Q_Q_H_P_G_K_A_P_K_L_M_I_Y_D_V_N_N_R_		
	P (AA)		
	<i>HinfI</i>		
	AGCGGCGTGTCCAACAGATTTCAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGC		

CAGCCTGACCATC (Sense)

181 -----+-----+-----+-----+-----+

TCGCCGCACAGGTTGTCTAAGTCGCCGTCGTTCTCGCCGTTGTGGCGG

TCGGACTGGTAG (AS)

5 S G V S N R F S G S K S G N T A S L T I (AA)

PstI

TCTGGCCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGACCTAC

10 GACCAGATCAAG (Sense)

241 -----+-----+-----+-----+-----+

AGACCGGACGTCCGACTCCTGCTCCGGCTGATGATGACGGTCTGGATG

CTGGTCTAGTTC (AS)

15 S G L Q A E D E A D Y Y C Q T Y D Q I K (AA)

HindIII

CTGTCCGCCGTGTTTGGCGGCGGAACAAAGCTT (Sense) (SEQ ID NO: 120)

301 -----+-----+-----+

20 GACAGGCGGCACAAACCGCCGCCTTGTTTCGAA (AS)

L S A V F G G G T K L (AA) (SEQ ID NO: 118)

25 Tabela 12B abaixo mostra seqüências de nucleotídeo de cadeia pesada senses e antissenses variáveis (SEQ ID NO: 121) e a seqüência de aminoácido de cadeia pesada variável resultante (designada AA) (SEQ ID NO: 119) como otimizadas para expressão.

TABELA 12B. Seqüências de nucleotídeo senses e antissenses, e seqüências de aminoácido de cadeia de V_H otimizadas para expressão

30

*MlyI**Hinfl* *BstNI* *PvuII*

GAGTCCATTGGGAGTGCAGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCG

GAGGACTGGTGCA (Sense)

1 -----+-----+-----+-----+-----+

CTCAGGTAACCCTCACGTCCGGGTCCACGTGACACCTCTCGCCGCC

TCCTGACCACGT (AS)

5 G_V_Q_A_Q_V_Q_L_V_E_S_G_G_G_L_V_Q (AA)

BstNI

GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCT

TCAGCAGCTACTG (Sense)

61 -----+-----+-----+-----+-----+

10 CGGACCGCCGTCGGACTCTGACTCGACACGGCGGTGCGCCAAGTGG

AGTCGTCGATGAC (AS)

_P_G_G_S_L_R_L_S_C_A_A_S_G_F_T_F_S_S_Y_

W (AA)

BstNI BstNI BclI

15 GATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGT

CCGTGATCAGCAG (Sense)

121 -----+-----+-----+-----+-----+

CTACTCGACCCACTCCGTCCGGGGACCGTTCCCGGACCTCACCCACAG

GCACTAGTCGTC (AS)

20 _M_S_W_V_R_Q_A_P_G_K_G_L_E_W_V_S_V_I_S

S (AA)

CGATAGCAGCAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCAC

CATCAGCCGGGA (Sense)

25 181 -----+-----+-----+-----+-----+

GCTATCGTCGTCGTGGATGATGCGGCTATCGCACTTCCCGGCCAAGTG

GTAGTCGGCCCT (AS)

_D_S_S_S_T_Y_Y_A_D_S_V_K_G_R_F_T_I_S_R_

D (AA)

30 *PstI*

BspMI

CAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGA

GGACACCGCCGT (Sense)

241 -----+-----+-----+-----+-----+

GTTGTCGTTCTTGTGGGACATGGACGTCTACTTGTCTGGACTCTCGGCTC
CTGTGGCGGCA (AS)

5 _N_S_K_N_T_L_Y_L_Q_M_N_S_L_R_A_E_D_T_A
 __V_ (AA)

BstNI

BstNI

BstNI BstEII

GTACTACTGTGCCAGGCACGGCATCGACTTCGACCACTGGGGCCAGG
10 GCACCCTGGTCAC (Sense)

301 -----+-----+-----+-----+-----+

CATGATGACACGGTCCGTGCCGTAGCTGAAGCTGGTGACCCCGGTCCC
GTGGGACCAGTG (AS)

15 _Y_Y_C_A_R_H_G_I_D_F_D_H_W_G_Q_G_T_L_V
 __T_

C (Sense) (SEQ ID NO: 121)

361 -

G (AS)

20 _ (AA) (SEQ ID NO: 119)

25 Quadros de pré e pós-otimização podem fornecer as porcentagens de códons de sequência para cada uma das seqüências parentais e genes otimizados respectivamente, e analisar a classe de qualidade das respectivas seqüências de nucleotídeo que codificam as cadeias de V_H e V_L. Valor de qualidade como aqui usado significa que o códon mais freqüente usado para um aminoácido dado no sistema de expressão desejado são fixos como 100, e os códons restantes são escalados conseqüentemente para freqüência de uso. (Sharp, P. M., Li, W. H., Nucleic Acids Res. 15 (3), 1987).

30 Também, o índice de adaptação de códon (CAI) é um número que descreve quão bem os códons da seqüência de nucleotídeo emparelham com a preferência de uso dos códons do organismo alvo. O valor má-

ximo de CAI é ajustado em 1,0, desse modo um CAI de $> 0,9$ é considerado como permitindo expressão alta. O CAI para a cadeia de V_L antes da otimização é observado ser 0,73, e após otimização, o CAI é determinado ser 0,95. Similarmente, o CAI para a cadeia de V_H antes da otimização é observado ser 0,74, e após otimização, é determinado ser 0,98 em construções otimizadas, o conteúdo de GC é aumentado na cadeia de V_L de 51% para a sequência de origem de MOR04945 para 62% para a sequência otimizada derivada de MOR04945. Como mostrado nas FIGS. 9A e 9B, o conteúdo de GC na cadeia de V_H é aumentado de 54% para a sequência de origem de MOR04945 para 64% para o derivado otimizado de MOR04945.

OTIMIZAÇÃO PARA EXPRESSÃO DE CADEIAS LEVES E CADEIAS PESADAS DE COMPRIMENTO TOTAL DE MOR04910, MOR04945, MOR04946, E MOR05145

O processo de otimização é aplicado a cada uma das sequências de nucleotídeo de comprimento total parenterais das cadeias leves de MOR04910 (SEQ ID NO: 97), MOR04945 (SEQ ID NO: 98), MOR04946 (SEQ ID NO: 99), e MOR05145 (SEQ ID NO: 100) e as sequências de nucleotídeo de comprimento total de origem das cadeias pesadas de MOR04910 (SEQ ID NO: 101), MOR04945 (SEQ ID NO: 102), MOR04946 (SEQ ID NO: 103), e MOR05145 (SEQ ID NO: 103).

O processo de otimização é usado para a construção de cada uma das sequências de nucleotídeo de cadeia leve a seguir associadas aos números de clone de origem: para o clone MOR04910 a sequência de nucleotídeo otimizada é SEQ ID NO: 104; para o clone MOR04945 a sequência de nucleotídeo otimizada é SEQ ID NO: 105; para o clone MOR04946 a sequência de nucleotídeo otimizada é SEQ ID NO: 106, e para o clone MOR05145 a sequência de nucleotídeo otimizada é SEQ ID NO: 107. Também, o processo de otimização é usado para a construção de cada uma das sequências de nucleotídeo de cadeia pesada a seguir associadas aos números de clone de origem: para o clone MOR04910 a sequência de nucleotídeo otimizada é SEQ ID NO: 108; para o clone MOR04945 a sequência de nucleotídeo otimizada é SEQ ID NO: 109; para o clone MOR04946 a sequência

de nucleotídeo otimizada é SEQ ID NO: 110; e para o clone MOR05145 a sequência de nucleotídeo otimizada é SEQ ID NO: 110.

As seqüências de nucleotídeo de cadeia leve otimizadas são associadas às seqüências de aminoácido de cadeia leve otimizadas a seguir: para o clone MOR04910 a sequência de aminoácido otimizada é SEQ ID NO: 111; para o clone MOR04945 a sequência de aminoácido otimizada é SEQ ID NO: 112; para o clone MOR04946 a sequência de aminoácido otimizada é SEQ ID NO: 113; e para o clone MOR05145 a sequência de aminoácido otimizada é SEQ ID NO: 114. As seqüências de nucleotídeo de cadeia pesada otimizadas são associadas às seqüências de aminoácido de cadeia pesada otimizadas a seguir: para o clone MOR04910 a sequência de aminoácido otimizada é SEQ ID NO: 115; para o clone MOR04945 a sequência de aminoácido otimizada é SEQ ID NO: 116; para o clone MOR04946 a sequência de aminoácido otimizada é SEQ ID NO: 117; e para o clone MOR05145 a sequência de aminoácido otimizada é SEQ ID NO: 117.

Uma listagem de seqüências de nucleotídeo e polipeptídeo de seqüências de cadeia leve e pesada de comprimento total contempladas é fornecida na Tabela 13A e Tabela 13B. Tabela 13A fornece seqüências de nucleotídeo otimizadas e os polipeptídeos codificados por elas. Estas seqüências de nucleotídeo são otimizadas para remover os sítios de corte latentes que são reconhecidos nos sistemas de expressão mamíferos. Tabela 13B fornece as seqüências de nucleotídeo parentais para os clones listados na Tabela 13A.

Tabela 13A: Seqüências de cadeia leve (LC) e de cadeia pesada (HC) – otimizadas

nucleotídeo de LC (opt) 4910	SEQ ID NO: 97
GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACCATCTCG TGTACGGGTACTAGCAGCGATGTTGGTGGTTTTAATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGCATCCCG GGAAGGCGCCGAAACTTATGATTTCATGATGGTTCTAATCGTCCCTCAGGCGTGAGCAACCGTTT TAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACG AAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATGTTTCTCTATTACTGCTGTGTTTGGCGGCGGCAC GAAGCTTACCGTCTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTC TGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC CGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACAACCACAC CCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAAAAGACA GTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATAG	
polipeptídeo de LC4910 (BHQ880)	SEQ ID NO: 111
DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYVSWYQQHPGKAPKLMHHDGSNRPSGVSNRFSG	

SKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSWDVSPITAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQAN NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ QVTHEGSTVEKTVAPTECS
nucleotídeo de LC (opt) 4945 SEQ ID NO: 98
GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACCATCTCG TGTACGGGTACTAGCAGCGATCTTGGTGGTTATAATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGCATCCCCG GGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGATGTTAATAATCGTCCCTCAGGCGTGAGCAACCGTTT TAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCTGCAAGCGGAAGACG AAGCGGATTATTATTGCCAGACTTATGATCAGATTAAGTTGTCTGCTGTGTTTGGCGGCGGCAC GAAGCTTACCGTCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTC TGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGC CGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACAACCACAC CCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAAGACA GTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATAG
polipeptídeo de LC4945 (BHQ892) SEQ ID NO: 112
DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFSG SKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQTYDQIKLSAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQAN KATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
nucleotídeo de LC (opt) 4946 SEQ ID NO: 99
GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACCCCT GAGCTGCAGAGCGAGCCAGAATCTTTTTCTCCTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGT CAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTAATCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTA GCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTG CGGTGTATTATTGCCAGCAGTATCTTACTCTTCTTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTCGA GATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTAG
polipeptídeo de LC4946 (BHQ898) SEQ ID NO: 113
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGS GSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQYQLTLPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
nucleotídeo de LC (opt) 5145 SEQ ID NO: 100
GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAACGTGCGACCCCT GAGCTGCAGAGCGAGCCAGAATCTTTTTCTCCTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGT CAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGTGCTTCTAATCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTA GCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTG CGGTGTATTATTGCCAGCAGTATATGACTCTTCTTCTTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTCGA GATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTAG
polipeptídeo de LC5145 (BHQ901) SEQ ID NO: 114
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGS GSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQYMTLPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
nucleotídeo de HC (opt) 4910 SEQ ID NO: 101
CAGGCACAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGC GTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTCTTCTTATTGGATGTCTTGGGTGCGCCAAGC CCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTTATTCTGGTAGCAATACCCATTATGC GGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACCGTGATAATTGAAAAACACCCTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCGGTGATTATTGCGCGCGTATGGGTATTGATCTT GATTATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTG TTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCTGCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCG

TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
 CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC
 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
 TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
 GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACT
 GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCC
 GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
 GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCC
 CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
 GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

polipeptideo de HC4910 (BHQ880) SEQ ID NO: 115

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHYADSV
 KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

nucleotideo de HC (opt) 4945 SEQ ID NO: 102

CAGGCACAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGC
 GTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTACCTTTTCTTCTTATTGGATGTCTTGGGTGCGCCAAGC
 CCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCTCTTCTGATTCTAGCTCTACCTATTATGCG
 GATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACAGTGATAATTGAAAAACACCCTGTATCTGCAAAT
 GAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCATGGTATTGATTTGAT
 CATTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC
 CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA
 GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGGCCCTGACCAGCGGCGTGC
 ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGC
 CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
 AGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG
 CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCA
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA
 GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG
 GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCGGAC
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGT
 GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
 GAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

polipeptideo de HC4945 (BHQ892) SEQ ID NO: 116

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSV
 KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

nucleotideo de HC (opt) 4946=5145 SEQ ID NO: 103

CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGACGCTGGCGGCAGCCTGAGACTGA
 GCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAACAACTACGGCATGACCTGGGTGAGGCAGGCCCT
 GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAGCGGCAGCGGCAGCTACACCTACTACGCCGA
 CAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT
 GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGACCATCTACATGGACTA
 CTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA
 GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
 CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGC
 CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA
 GGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC
 ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCAT

GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCGAGTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA
polipeptídeo de HC4946=5145 (BHQ898/901) SEQ ID NO: 117
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMTWVRQAPGKLEWVSGISGSGSYTYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Tabela 13B: Sequências de cadeia leve (LC) e cadeia pesada (HC) - parentais

nucleotídeo de LC (parental) 4910 SEQ ID NO: 104
GATATCGCCCTGACCCAGCCCCGCCAGCGTGTCCGGCAGCCCTGGCCAGAGCATCACCATCAG CTGTACCGGCACCCAGCAGCGATGTGGGCGGCTCAACTACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACC CGGCAAGGCCCCCAAGCTGATGATCCACGACGGCAGCAATAGACCCAGCGGCGTGTCCAATA GATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGCGTGCAGGCTGAG GACGAGGCGGACTACTACTGCCAGAGCTGGGATGTGAGCCCCATCACCGCCGTGTTTGGCGG CGGAACAAAGCTTACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACAA CCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTG AGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCCTGGAA AAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATAG
LC (parental) 4945 SEQ ID NO: 105
GATATCGCCCTGACCCAGCCCCGCCAGCGTGTCCGGCAGCCCTGGCCAGAGCATCACCATCAG CTGTACCGGCACCCAGCAGCGACCTGGGCGGCTACAACACTACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACC CCGGCAAGGCCCCCAAGCTGATGATCTACGACGTGAACAACAGACCTAGCGGCGTGTCCAACA GATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCTCTGGCCTGCAGGCTGAG GACGAGGCGGACTACTACTGCCAGACCTACGACCAGATCAAGCTGTCCGCCGTGTTTGGCGG CGGAACAAAGCTTACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACAA CCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTG AGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCCTGGAA AAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATAG
nucleotídeo de LC (parental) 4946 SEQ ID NO: 106
GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCT GTCTTGTAGGGCCAGCCAGAACCTGTTCAGCCCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGG CCAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGAGCCACCGGCGTGCCCGCCAGAT TCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAGGAT TTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACCTGACCTGCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAG GTCGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
nucleotídeo de LC (parental) 5145 SEQ ID NO: 107
GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCT GTCTTGTAGGGCCAGCCAGAACCTGTTCAGCCCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGG CCAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGAGCCACCGGCGTGCCCGCCAGAT TCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAGGAT TTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACCTGACCTGCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAG GTCGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

TTGCGCGTGTACTACTGCCAGCAGTACATGACCCTGCCTCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAG
 GTCGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
 TGAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
 ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG
 ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
 AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGC
 TTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

nucleotídeo de HC (parental) 4910 SEQ ID NO: 108

CAGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA
 GACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACTGGATGAGCTGGGTGAGGCAG
 GCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAGCTACAGCGGCAGCAATACCCACTA
 CGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACC
 TGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCGGATGGGCATC
 GACCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC
 ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGT
 GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACC
 AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTC
 GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
 AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCCA
 CCGTGCCGACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAG
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
 GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAGCGTCTGCACC
 AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA
 TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
 CATCCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

nucleotídeo de HC (parental) 4945 SEQ ID NO: 109

CAGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA
 GACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACTGGATGAGCTGGGTGAGGCAG
 GCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCAGCAGCGATAGCAGCAGCACCTACTA
 CGCCGATAGCGTGAAGGGCCGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACC
 TGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGGCACGGCATC
 GACTTCGACCACTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC
 ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGT
 GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACC
 AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTC
 GTGAAACCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGCCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
 AGCAACAGCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCCA
 CCGTGCCGACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAG
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
 GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAGCGTCTGCACC
 AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA
 TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
 CATCCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

nucleotídeo de HC (parental) 4946=5145 SEQ ID NO: 110

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGA
 GCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAATAATTATGGTATGACTTGGGTGCGCCAAGCCCCG
 GGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTGGTCTGGTAGCTATACCTATTATGCGGATA
 GCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAATTGAAAAACACCCTGTATCTGCAATGAA
 CAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCGTACTATTATATGGATTATTGG
 GGCCAAGGCACCCTGGTACCGTCTCCTCAGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT
 GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACT
 ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
 TTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCC
 AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTG
 GACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCGACACCT

```

GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTGCTGACCCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

```

Exemplo 9: Ensaios de Bioatividade

A atividade biológica de um anticorpo de anti-DKK1/4 de neutralização é medida em um ensaio de gene repórter, usando a linhagem celular geneticamente modificada HEK293 T/17 STF_70IRES_Krm_(17) chamada

5 SuperTopflash Krm17. Esta linhagem celular é derivada da célula renal embrionária humana HEK293 e é estavelmente transfeccionada com i) uma construção de repórter em que o promotor TCF está a montante fundido do gene de luciferase de vaga-lume e ii) uma construção que conduz à sobre-expressão de Krm na superfície desta célula. Nesta linhagem celular, expo-

10 sição à proteína de Wnt estimula a expressão de luciferase de uma maneira dose-dependente. Adição de quantidades classificadas de anticorpo de anti-DKK1/4 a uma dose fixa, sub-máxima de DKK1 na presença de Wnt causa um aumento na expressão de luciferase durante um período de incubação de dezesseis horas. Ao término deste período, a quantidade de luciferase é

15 quantificada com base em sua atividade enzimática no lisado de célula. Luciferase catalisa a conversão do substrato luciferina para oxiluciferina, um produto quimiluminescente. A quimiluminescência do tipo brilho resultante é depois determinada com um luminômetro apropriado.

A potência biológica de uma amostra de teste de anticorpo de anti-

20 DKK1/4 de neutralização é determinada comparando sua habilidade para aumentar a expressão de luciferase à de um padrão de referência. As amostras e padrão são normalizados em base de conteúdo de proteína. Potência relativa é depois calculada usando um ensaio de linha paralela de acordo com a Farmacopéia européia. O resultado final é expressado como potência relativa (em

25 porcentagem) de uma amostra comparada ao padrão de referência.

Exemplo 10: Atividade *in vitro* em alvos biológicos relevantes

FABs de chumbo são selecionados que tem afinidades na faixa

nanomolar baixa e atividade potente no ensaio celular. Os pares de ligação fisiológica para DKK1 são LRP5/6 ($K_d \sim 340$ pM) e Kremen 1 e 2 ($K_d \sim 280$ pM) [Mao 2001][Mao 2002]. Dadas estas interações de afinidade alta, é desejável também melhorar a afinidade para melhorar a competição com as

5 interações de DKK1 fisiológicas. Para aumentar afinidade e atividade biológica dos FAbs selecionados, regiões de CDR-L3 e CDR-H2 são otimizadas em paralelo através de mutagênese de cassete usando mutagênese direcionada de trinucleotídeo [Virnekas 1994][Knappik 2000][Nagy 2002].

Seguindo maturação de afinidade, um Fab é selecionado tendo

10 baixa afinidade picomolar, reativa sinalização de wnt inibida por DKK1 com um EC_{50} abaixo de 1 nM, e reage cruzado com DKK1 de macaco cinomolgo, camundongo, e rato. As regiões variáveis deste Fab são depois criadas em duas estruturas de IgG1 humana diferentes.

Anticorpo de anti-DKK1/4 tem afinidade alta por DKK1 humano

15 (2 pM) com cinética de ligação típica para um anticorpo desta afinidade. Vide Figura 6.

Figura 6. MÉTODOS: A afinidade e cinética de ligação dos candidatos de chumbo e rhDKK1 (DKK1 humano recombinante) (Batelada BTP7757) são medidas usando ressonância de plasmon de superfície com

20 um instrumento Biacore T100 (Biacore, Uppsala, Suécia) contendo uma fatia de CM5 (S) de sensor (Cat#BR-1006-68). Fc de IgG1 anti-humano (Jackson Immuno Research, Cat#109-006-098) é imobilizado sobre cada célula de fluxo, seguido por captura de um candidato de chumbo a uma captura esperada de cerca de 100 RU. Por fim, seis concentrações de DKK1 (faixa 0,195

25 - 6,25 nM), com uma concentração repetida, são passadas na fatia. As células de fluxo são ativadas para ligação de DKK1 durante 240 segundos, e desassociação é seguida durante 30 minutos. Os dados normalizados (base subtraída) são ajustados em uma ligação 1:1 com modelo de transporte de massa usando análise de Cinética em software de avaliação BIA 1.0. Este

30 experimento é realizado em triplicata, e os dados apresentados são a média destes três experimentos com desvio-padrão.

Exemplo 11: Mapeamento de epítopo

DKK1 maduro é uma proteína de 266 aminoácidos com duas regiões ricas de cisteína (Cys-1 e Cys-2). O domínio de Cys-2 é responsável para ligar LRPs e proteínas de Kremen e é necessário e suficiente para inibição da sinalização de Wnt [Li 2002][Brott 2002]. Experimentos de imunoprecipitação (Figura 7A, 7B) demonstram que anticorpo de anti-DKK1/4 especificamente liga ao domínio de Cys-2, mas não ao domínio de Cys-1. Anticorpo de anti-DKK1/4 é apenas fragilmente ativo em western blot com DKK1 desnaturado e em um peptídeo experimento de mapeamento não é observado especificamente ligar qualquer um dos peptídeos de sobreposição de 15 aminoácidos que cobrem o comprimento da proteína (JTP), sugerindo que o anticorpo de anti-DKK1/4 provavelmente reconhece um epítipo não-linear dentro de Cys-2.

Figura 7(A) mostra uma representação esquemática de DKK1 de comprimento total e truncado. De comprimento total (FL, contendo resíduos 1-266), carboxila terminal truncada (ΔC , resíduos contendo 1-185), e amino terminal truncada (ΔN , contendo resíduos 1-60 mais resíduos 157-266), é fundida com um epítipo de HA em seus terminos C, e clonada em um vetor de expressão mamífero sob o controle do promotor de citomegalovírus (CMV). Figura 7(B) descreve ligação de um anticorpo de anti-DKK1/4 de neutralização e proteínas de DKK1. Meio condicionado de células Hek293 transientemente transfeccionadas expressando contendo comprimento total, proteínas de DKK1 carboxil terminal truncadas, amino truncadas, são incubadas com controle antilisozima IgG1 ou os anticorpos de anti-DKK1/4 por 2 h em temperatura ambiente, e imunocomplexos são colhidos em contas de proteína G, solucionadas por SDS-PAGE, transferidas, e manchadas com um anticorpo de anti-HA. 1/10 de entrada total é carregado como controle.

EXEMPLO 11: MAPEAMENTO DE EPÍTOPO - N-GLICOSILAÇÃO

Várias proteínas dentro da via de sinalização de Wnt são covalentemente modificadas por enzimas pós-translacionais que regulam sua atividade celular. Membros da família de DKK, incluindo DKK1, são modificados através de N-glicosilação [Krupnik 1999]. DKK1 tem um sítio de glicosilação N-ligado teórico no aminoácido 256 dentro do domínio de Cys-2. Da-

da a natureza altamente conservada do domínio de Cys-2, e o sítio de ligação potencial tanto de DKK1 para LRP6 como de anticorpo de anti-DKK1/4 para DKK1, buscamos determinar se o anticorpo de anti-DKK1/4 reconheceu a forma N-glicosilada de DKK1. Um ELISA demonstra que anticorpo de anti-DKK1/4 reconhece a forma N-glicosilada de rhDKK1 muito melhor que a forma desglicosilada especificamente N-ligada de rhDKK1 TABELA 14A. Embora as mesmas proteínas sejam igualmente bem reconhecidas com um segundo anticorpo (anti-His), direcionadas para a região de marcador de epítipo fundida da proteína recombinante. Esta diferença em afinidade é quantificada usando ressonância de plasmon de superfície e anticorpo de anti-DKK1/4 Met para ter K_D de 100 vezes mais alto para rhDKK1 glicosilado, depois para a proteína desglicosilada, vide TABELA 14B.

Tabela 14A Por cento de ligação - Glicosilação dependente de anticorpo de anti-DKK1/4 que liga a DKK1

Anticorpo	DKK1 de WT	DKK1 (diglicosilado)
marcador anti-His	100%	100%
anti-DKK1/4	100%	12-18%

Tabela 14B ressonância de plasmon de superfície

Proteína	C (1/Ms)	Kd (1/s)	Kd (M)
DKK1 de WT	7,449E+6	2,319E-5	3,113E-12
DKK1 (N-degli)	1,424E+6	3,071E-4	2,157E-10

A ligação de anticorpo de anti-DKK1/4 a rhDKK1 do tipo selvagem (WT) (batelada marcada com epítipo His HEK, #BTP7757) e rhDKK1 N-ligado desglicosilado (N-DEGLI, desglicosilado N-ligado com a enzima PNGase F (Sigma, cat #E-DEGLI) é medido por ELISA. Brevemente, uma placa de ELISA de ligação alta (Nunc#442404) é revestida com 1 µg/ml DKK1 de WT ou N-DEGLI. A razão de anticorpo de anti-DKK1/4 e anticorpo de anti-His ligando a DKK1 de WT quando comparado a seu respectivo ligando de N-DEGLI é mostrada. Este experimento é realizado com três concentrações diferentes (dados para uma concentração representativa são mostrados), todas as concentrações tiveram resultados similares. B. A afinidade de ligação e cinética de anticorpo de anti-DKK1/4 para WT e DKK1 de

N-DEGLI (Batelada de HEK293 #BTP7757) é medida usando um Biacore T100. Anticorpo de anti-DKK1/4 teve uma afinidade consistentemente inferior de 100 vezes por DKK1 de N-DEGLI que para DKK1 de WT.

EXEMPLO 12: POR CENTO DE IDENTIDADE DE MEMBROS DA FAMÍLIA

5 DE DKK

A família de Dickkopf humana consiste em quatro parálogos (vide Tabela 15) três destes (DKK1, 2, & 4) ligam às proteínas LRP6 e de Kremen, induzem internalização de LRP5/6 e inibem sinalização de Wnt canônica [Mao 2001][Mao 2003]. DKK2 também sinergiza-se com sobre-expressão de LRP6 para intensificar sinalização de Wnt, mas co-expressão de LRP6 e Kremen2 restabelece inibição de DKK2 da via [Mao 2003]. Desse modo DKK2 pode agir como um agonista e um antagonista dependendo do contexto celular. DKK3 é menos conservado dos membros de família, incluindo dentro do domínio de Cys-2 responsável pelas interações de LRP5/6 e de Kremen e é distinto dos outros membros da família de DKK como não liga a LRP6 ou Kremens e não bloqueia sinalização de Wnt [Mao 2001][Mao 2003].

Tabela 15 - Por cento de identidade dos membros da família de DKK ao longo da proteína inteira e dentro dos domínios de Cys-2.

	DKK2		DKK3	DKK4
Proteína integral	DKK1	38,7	15,5	32,5
	DKK2	-	13,4	34,6
	DKK3	-	-	15,1
		DKK2	DKK3	DKK4
domínio de Cys-2	DKK1	69,3	23,0	56,6
	DKK2	-	24,1	54,7
	DKK3	-	-	20,8

20 Homologia entre os membros da família de DKK é avaliada (Vector NTI Advanced 9.1.0) usando algoritmo de AlignX para alinhamentos de sequência em pares comparando as razões de identidades de aminoácido. Abertura de intervalo e penalidades de extensão de intervalo de 10 e 0,1 são respectivamente aplicadas. Esta avaliação incluiu comparações de proteínas integrais, como também comparações de domínios de Cys-2 apenas.

25 Como indicado acima na tabela, DKKs 1, 2 e 4 compartilham 30-40% de homologia de sequência de aminoácido ao longo da proteína inteira. Comparação dos domínios de Cys-2 sozinhos mostra que DKKs 1 e 2 compartilham

69% de homologia dentro desta região, enquanto DKK4 rudemente compartilha 57% com o mesmo domínio de DKKs 1 e 2. DKK3 mostra o nível de homologia mais baixo em outros membros da família. Entre todos os membros, a homologia de do domínio de Cys-2 é maior.

5 EXEMPLO 13: AFINIDADE DE ANTICORPO DE ANTI-DKK1/4 PARA MEMBROS DA FAMÍLIA DE DKK HUMANO

Além de ligar a DKK1, anticorpo de anti-DKK1/4 também liga a DKK4, vide Tabela 16. Embora a afinidade para DKK4 seja aproximadamente 100 vezes menor que para DKK1, é ainda subnanomolar e portanto provável biológica e clinicamente relevante. De nota, nem DKK2 nem DKK4 conservam o resíduo de Asparagina que é prognosticado ser alvejado para glicosilação no domínio de Cys-2 de DKK1. Experimentos de imunoprecipitação preliminares sugerem que anticorpo de anti-DKK1/4 especificamente não liga a DKK2. A afinidade de ligação de anticorpo de anti-DKK1/4 que liga a DKK2 será determinada seguindo purificação com sucesso de DKK2. Consistente com a função distinta e propriedades de ligação de DKK3, anticorpo de anti-DKK1/4 não liga a DKK3.

Tabela 16 Afinidade de anticorpo de anti-DKK1/4 aos membros da família de DKK humano

membro da família de DKK	K_D
DKK1	$2,0 \times 10^{-12}$ ($\pm 0,7$)
DKK2	ND
DKK3	NSB
DKK4	$2,97 \times 10^{-10}$ M ($\pm 1,5$)

A afinidade e cinéticas de ligação do anticorpo de anti-DKK1/4 a outros membros da família de DKK humano das proteínas são medidas usando um Biacore T100. Como antes, experimentos são realizados em triplicata para proteínas com ligação significativa para anticorpo de anti-DKK1/4 e é relatada como a média de três experimentos com desvio-padrão. DKK3 que é o membro de família menos homólogo, não tem ligação que seja detectável acima dos níveis de base e assim é considerado NSB (Nenhuma ligação Significativa). Igualmente, recentes dados sugerem que um anticorpo de anti-DKK1/4 da invenção também não tem nenhuma ligação significativa a DKK2.

EXEMPLO 14: ANTICORPO DE ANTI-DKK1/4 BLOQUEIA LIGAÇÃO DE DKK1 A LRP6

DKK1 medeia sua atividade de antagonista de Wnt através de interações com LRP5/6 e Kremen, induzindo internalização e bloqueio de interação induzida por Wnt de LRP5/6 com receptores Frizzled. Anticorpo de anti-DKK1/4 competitivamente inibe ligação de DKK1 a LRP6 em um ensaio de ELISA de competição na Figura 8.

Células de HEK293T não expressam níveis suficientes de LRP5 endógeno ou 6 para permitir visualização de ligação de DKK1. Porém, sob co-transfecção de LRP6 com uma proteína chaperona de tráfego de superfície, MESD, DKK1 marcado GFP pode ser detectado na superfície celular, ilustrando a natureza específica da interação de DKK1/LRP6. MOR04910 que compartilha as mesmas regiões variáveis que o anticorpo de anti-DKK1/4 especificamente bloqueia esta interação.

A habilidade de anticorpo de anti-DKK1/4 para inibir ligação de DKK1 diretamente a LRP6 é medida por ELISA. Brevemente, placas não-tratadas (Fisher, Cat #12565501) são revestidas com 1 µg/ml de LRP6 recombinante (R&D Systems Cat#1505-LR), depois 500 ng/ml de rhDKK1 e uma curva de concentração de anticorpo de anti-DKK1/4 ou hlgG1 (antiliso- zima MOR3207, ACE10915) é pré-incubada em gelo durante 30 minutos após os quais eles são colocados sobre placas revestidas com LRP6 durante 2 horas. As placas são lavadas e o nível de ligação de DKK1 é detectado com anticorpo de anti-DKK1 (R&D Systems AF1096). Mostrados são os valores de OD brutos (base subtraída). Concentrações crescentes de anticorpo de anti-DKK1/4 inibem a ligação de DKK1 diretamente a LRP6 em uma maneira dose-dependente, enquanto concentrações crescentes de hlgG1 não bloqueiam a ligação de DKK1 a LRP6.

A habilidade de MOR04910 para inibir ligação de DKK1/LRP6 em superfície celular é medida através de microscopia de fluorescência. Células de HEK293T ou são falso transfeccionadas e transientemente transfeccionadas com plasmídeos que codificam LRP6 e MESD. Células são incubadas com meio condicionado com DKK1-GFP juntamente com Fab de anti-

lisozima ou Fab de anti-DKK1 MOR04910 durante 1 hora a 37°C, e examinadas através de microscopia de fluorescência. Fluorescência de GFP reflete ligação de DKK1-GFP a LRP6 sobre-expressa na membrana plasmática. O anticorpo de anti-DKK1/4 bloqueia interações de DKK1 com LRP6 nas superfícies das células.

EXEMPLO 14: ENSAIOS DE REPÓRTER - REATIVAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO DE GENE DE TCF/LEF INIBIDA POR DKK1

Sinalização de Wnt canônica culmina em translocação de beta-catenina para o núcleo onde se associa com fatores de transcrição da família de TCF/LEF que resulta em transcrição intensificada de genes responsivos a Wnt. Um ensaio de repórter é estabelecido usando um promotor responsivo a TCF/LEF direcionando transcrição de gene de luciferase, facilitando a detecção da modulação da via de Wnt. DKK1 eficazmente bloqueia atividade de luciferase induzida por meios condicionados de Wnt3A (CM) neste ensaio. Anticorpo de Anti-DKK1/4 reativa sinalização suprimida por DKK1 de Wnt com um EC_{50} evidente de 0,16 nM Figura 9. Uma vez que o ensaio requer aproximadamente 1 nM de DKK1 para supressão completa e a afinidade do anticorpo é 2 pM, é provável que este EC_{50} reflita a sensibilidade do ensaio e quantidades relativas de cada proteína ao invés de um limite absoluto de competição de anticorpo de anti-DKK1/4.

Células 293T estavelmente transfeccionadas com o repórter de SuperTopflash e Kremen são tratadas com 10 ng/ml de rhDKK1, 50% de meio condicionado de Wnt3a, e várias quantidades de anticorpo de anti-DKK1/4. Dezoito horas depois, a atividade de luciferase é medida pelo kit de ensaio de luciferase Bright-Glo (Promega).

EXEMPLO 15: ENSAIOS DE REPÓRTER - REVERSÃO DE SECREÇÃO INIBIDA POR DKK1 DE FOSFATASE ALCALINA EM CÉLULAS SEMELHANTES A PRÉ-OSTEOBLASTO

Para determinar se anticorpo de anti-DKK1/4 bloqueia as funções de DKK1 em um cenário relevante mais fisiológico, um ensaio *in vitro* é estabelecido para medir a diferenciação de osteoblasto mediada por Wnt da linhagem celular de camundongo pluripotente C3H10T1/2 (10T1/2), vide Fi-

gura 10. Sob diferenciação de osteoblasto as células 10T1/2 segregam fosfatase alcalina (AP), um fenômeno que pode ser inibido por DKK1. Anticorpo de anti-DKK1/4, mas não controle de IgG, bloqueia a supressão de DKK1 de diferenciação de 10T1/2 na presença de meio condicionado de Wnt3A.

5 Wnt foi relatado induzir proliferação e inibir apoptose em vários contextos de célula e a ativação da via de Wnt, como indicado por estabilização ou localização nuclear de beta-catenina, é freqüentemente associada à progressão de tumor. Além disso, sub-regulação de DKK1 em alguns cânceres (por exemplo carcinoma de cólon e melanoma) [González-Sancho 2005] [Kuphal 2006], tem levado alguns investigadores a sugerir que DKK1 possa ser um supressor de tumor para alguns cânceres. Para testar se DKK1 tem efeito na proliferação ou sobrevivência de tumor, linhagens de células tumorais são tratadas com anticorpo de anti-DKK1/4 e analisadas para alterações no crescimento. Nenhuma linhagem de célula tumoral testada é observada ser afetada
10 significativamente pela adição de anticorpo de anti-DKK1/4.

O efeito de anticorpo de anti-DKK1/4 na sobrevivência e proliferação de várias linhagens celulares de câncer são avaliadas *in vitro*. Neste ensaio, anticorpo de anti-DKK1/4 (100 µg/ml) é incubado com uma linhagem de célula tumoral, após três dias, o número de células é avaliado por quantificação de ATP (Promega, Cell Titer Glo Assay®), como uma medida de células metabolicamente ativas com uma relação linear para o número de célula. Este ensaio é realizado em três concentrações de soro diferentes (crescimento livre de soro, mínimo, e crescimento completo). Nenhuma alteração significativa, quando comparadas as células de hlgG1 sem tratar e tratadas
20 é encontrada. Sobrenadantes de linhagem celular são analisados para expressão de DKK1 por ELISA.

EXEMPLO 16: REATIVIDADE CRUZADA DE ESPÉCIES E NEUTRALIZAÇÃO DE DKK1

Um anticorpo de anti-DKK1/4 de neutralização não é selecionado para sua afinidade alta contra DKK1 humano e habilidade de neutralização, mas também com base em sua reatividade cruzada com outras espécies que poderiam ser usadas para estudos de eficácia e de segurança. Re-
30

- ações cruzadas de anticorpo de anti-DKK1/4 com DKK1 de camundongo, rato, e macaco cinomolgo (cino, *Macaca fascicularis*) com afinidade similar como para DKK1 humano, vide Tabela 17. Além disso, anticorpo de anti-DKK1/4 neutraliza atividade supressiva de Wnt mediada por DKK1 de todas as quatro espécies (Tabela 17), sugerindo que estas espécies deveriam ser relevantes para modelos de segurança e eficácia.

Tabela 17 Reatividade cruzada de espécies e neutralização de DKK1

proteína de DKK1	K _D [pM]	reativação de sinalização de wnt3a (TOPFlash) EC50 (pM)
Humano	17	80,6
Cinomolgo	7	54,2
Camundongo	10	60,5
Rato	16	255

- Determinação de afinidade para DKK1 Humano, Cinomolgo, Camundongo, e Rato é ensaiada através de Titulação de Equilíbrio de Solução (SET) usando o analisador de M-384 SERIES® (BioVeris, Europa). Para determinação de KD através de Titulação de Equilíbrio de Solução (SET), frações de monômero (pelo menos 90% de conteúdo de monômero, analisado antes de SEC analítico; Superdex75, Amersham Pharmacia) de proteína de IgG são usadas. Determinação de afinidade com base em eletroquimiluminescência (ECL) na solução e avaliação dos dados é executada basicamente como descrito por [Haenel et al., 2005], o modelo de ajuste de ligação é aplicado como modificado de acordo com [Piehler et al., 1997]). Uma quantidade constante de IgG de MOR4910 é equilibrada com concentrações diferentes (diluções 3n seriais) de DKK1 humano (4 nM de concentração de partida) na solução. DKK1 humano biotinilado acoplado às contas paramagnéticas (M-280 Streptavidin, Dynal) e anticorpo policlonal de (Fab)'2 anti-humano de cabra marcado com BV-tag™ (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) é adicionado e incubado para 30 min. Subseqüentemente, a concentração de IgG não-ligada é quantificada por meio de detecção de ECL usando o analisador de M-384 SERIES® (BioVeris, Europe). Determinação de afinidade para DKK1 de rato, camundongo, e cinomolgo é executada essencialmente como descrita acima usando DKK1 de camundongo, rato, e cinomolgo como analito em solução em vez de DKK1 humano. Para detecção das moléculas de IgG livres, DKK1 humano biotinilado aco-

plado às contas paramagnéticas é usado. MOR4910 e anticorpo de anti-DKK1/4 neutralizam DKK1 humano (Novartis) com EC_{50} equivalente, anticorpo de anti-DKK1/4 também neutraliza DKK1 de macaco (Novartis), de camundongo (R&D Systems 1765-DK-010) e de rato (Novartis). O ensaio de repórter TOPFLASH para DKK1 humano, de rato, camundongo, e cinomolgo é executado essencialmente como descrito acima (Figura 9) usando cada espécie de DKK1 recombinante como o inibidor de meios condicionados de Wnt, em vez de DKK1 humano. DKK1 recombinante de rato requereu concentrações mais altas de proteína para alcançar inibição significativa do ensaio de TOPFLASH.

10 EXEMPLO 17: EFEITO DE ANTICORPO DE ANTI-DKK1/4 EM CRESCIMENTO INTRATIBIAL DE XENOENXERTOS DE PC3M2AC6

Metástases de tumor de próstata são únicos entre metástases de osso em que eles são opressivamente osteoblásticos ao invés de osteolíticos [Keller 2001]. Porém, metástases de osso mesmo predominantemente

15 osteoblásticos têm regiões subjacentes de osteólise e freqüentemente têm baixas densidades de massa de osso (BMD) especialmente quando os pacientes estão em terapia de separação andrógena [Saad 2006]. Recentemente, é demonstrado que DKK1 pode atuar como um permutador, por meio do qual a expressão de DKK1 intensifica as propriedades osteolíticas de uma

20 linhagem tumoral de célula de próstata osteoblástica/osteolítica misturada (C4-2B). Além disso, supressão de shRNA de DKK1 inibiu atividade osteolítica de uma linhagem tumoral de célula de próstata predominantemente osteolítica (PC3) [Hall 2005] [Hall 2006]. Choque de DKK1 também inibiu crescimento intratibial do xenoenxerto de tumor, levando os autores a especular

25 que atividade osteolítica possa ser importante para estabelecer um nicho metastático, mas perda subsequente de DKK1 em metástases prostáticas converta o tumor em um fenótipo osteoblástico.

Um modelo de tumor de próstata osteolítico é adaptado de um método por [Kim 2003]. Uma variante da linhagem tumoral de célula de próstata osteolítica (PC3M) que estavelmente expressa luciferase (PC3M2AC6)

30 é injetada na tibia de camundongos. O crescimento do tumor é monitorado através de luciferase enquanto alterações em osso são monitoradas através

de tomografia micro-computadorizada (micro-CT) e histologia. Ao invés de intensificar o crescimento de tumor, o anticorpo de anti-DKK1/4 tendeu para inibição do crescimento de tumor. Embora a inibição não fosse significativa em qualquer um estudo, ocorreu consistentemente em 5/5 estudos conduzidos até agora, um estudo representativo mostrando os efeitos de 3 doses de anticorpo de anti-DKK1/4 em crescimento de tumor é mostrado na Figura 11. Uma tendência não-significativa similar para inibição ocorreu com camundongos tratados com anticorpo de anti-DKK1/4 com xenoenxertos subcutâneos de PC3M2AC6.

10 Tratamentos são iniciados no dia 5 pós implantação (0,2 milhões de células/animal). Anticorpo de anti-DKK1/4 é administrado i.v., em doses de 20, 60, e 200 µg/camundongo/dia, q.d., 3 vezes por semana durante 2 semanas. IgG de controle é administrada i.v., a 200 µg /camundongo/dia, q.d., 3 vezes por semana durante 2 semanas. Controle de veículo (PBS) é
15 administrado i.v., q.d., 3 vezes por semana durante 2 semanas. Dados de eficácia final e alteração de peso do corpo são calculados após tratamento.

 Usando este modelo, descobrimos que um anticorpo de anti-DKK1/4 inibe dano de osso cortical induzido por tumor. Efeitos em osso trabecular são confusos neste modelo pela observação ambos implantes de
20 tumor e pseudo implantes causam dano mecânico ao osso que resulta em um aumento inicial no osso tecido que é remodelado causando uma diminuição depois no volume evidente de osso. Efeitos relativos de osso tecido recentemente formado e trabéculas em razões de volume de osso/volume trabecular geral (BV/TV) são portanto obscuros. Porém, está claro que anticorpo de anti-DKK1/4 aumenta a produção de osso em tumor e tíbias pseudo-
25 implantadas e inibe ou tarda a diminuição de volume de osso acompanhando remodelagem. Usando o mesmo modelo osteolítico induzido por tumor, anticorpo de anti-DKK1/4 demonstra atividade antiosteolítica equivalente como Zometa, vide Figura 12. Os efeitos metabólicos de osso do anticorpo
30 de anti-DKK1/4 são responsivos à dose na faixa de 20-200 µg/camundongo, com uma dose minimamente eficaz entre 20 e 60 µg/camundongo, vide Figura 13. Juntos estes dados sugerem que anticorpo de anti-DKK1/4 pudesse

ter um impacto na doença osteolítica induzida por tumor, mas pudesse também ser eficaz em doenças de osso não-tumorais tais como osteoporose ou intensificando o reparo de fraturas de osso.

EXEMPLO 18: ANTICORPO DE ANTI-DKK1/4 MANTÉM DENSIDADE ÓS-

5 SEA ELEVADA EM TUMOR E TÍBIAS PSEUDO IMPLANTADAS

Em um esforço para avaliar os marcadores farmacodinâmicos de eficácia nos camundongos três marcadores de soro de metabolismo de osso são analisados: osteocalcina (OC), osteoprotegerina (OPG), e ativador de receptor segregado de ligando de fator κ B nuclear (sRANKL). Estes marcadores de osteoblasto são usados ao invés dos marcadores de osteoclasto mais típicos devido ao mecanismo esperado de ação do anticorpo. Porém, nenhuma alteração consistente é detectada em animais com tumor versus animais ileso. Nenhuma correlação de perda de osso, conforme medida por micro-CT ou IHC, com qualquer destes marcadores é consistentemente observada.

15 Exemplos representativos de reconstruções de MicroCT das tíbias de camundongos tratados são mostrados na Figura 12A. Dano cortical é classificado de 0=nenhum dano a 3=dano severo. Figura 12B. Dano cortical em tíbias implantadas com tumor é registrado manualmente por análise de microCT que é cega com respeito aos grupos de estudo. Nenhum dano cortical é observado em qualquer das pernas pseudo implantadas.

Métodos: Camundongos desprotegidos fêmeas na idade de 12 semanas são implantados intatibialmente com 2×10^5 células de PC-3M2AC6 na tíbia esquerda e pseudo-injeção na tíbia direita. Tratamentos iniciaram no dia 5 pós implantação. NVP-anticorpo anti-DKK1/4-NX (anticorpo de anti-DKK1/4) e controle de IgG são administrados i.v., em doses de 200 μ g/camundongo/dia, q.d., 3 vezes por semana durante 2 semanas. Controle de veículo (PBS) é também administrado i.v., q.d., 3 vezes por semana durante 2 semanas. Os animais são varridos no dia 7, 14, e 18 pós implantação do tumor usando o μ -CT VivaCT40 Scanner (SCANCO, Suíça). Densidade de osso trabecular (BV/TV) é analisada como descrito nos métodos. Um asterisco (*) indica diferença significativa estatística tanto dos controles de veículo como de IgG (n=12) no mesmo ponto de tempo em $p < 0,05$.

Na Figura 13, para determinar a massa de osso, a espongi-
 secundária da tíbia é imageada com o software Zeiss Imager Z.1 e Axiovisi-
 on com base na coloração de Giemsa. O estágio de leitura é com base na
 porcentagem de osso calcificado no campo inteiro. Toda coluna representa a
 5 média e desvio-padrão do número declarado de animais. Nos grupos trata-
 dos com anticorpo de PBS, IgG, e anti-DKK1/4, apenas os animais com tu-
 mor são analisados. Pernas direitas não tiveram pseudo injeções e as per-
 nas de esquerda tiveram tumor. Estatística: Dimmett Multiple Comparisons
 Test One-Way ANOVA. Pernas esquerdas ou pernas direitas comparadas à
 10 respectiva perna no grupo de PBS $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p > 0,05$ n.s.

Figura 14 mostra a eficácia de osso anabólica de um anticorpo
 de anti-DKK1/4 é dose-dependente com dose eficaz mínima entre 20 e 60
 µg/camundongo 3x/semana. Camundongos desprotegidos fêmeas na idade
 de 12 semanas são implantados intratibialmente com 2×10^5 células de PC-
 15 3M2AC6 na tíbia esquerda e pseudo-injeção na tíbia direita. Tratamentos
 iniciaram no dia 6 pós implantação. NVP-anticorpo de anti-DKK1/4-NX (anti-
 corpo de anti-DKK1/4) é administrado i.v., em doses de 20, 60, e 200
 µg/camundongo/dia, q.d., 3 vezes por semana durante 2 semanas. Controle
 IgG é administrado i.v., a 200 µg/camundongo/dia, q.d., 3 vezes por semana
 20 durante 2 semanas. Controle de veículo (PBS) é administrado i.v., q.d., 3
 vezes por semana durante 2 semanas. Os animais são varridos no dia 7 e
 20 pós implantação de tumor usando o µ-CT VivaCT40 Scanner (SCANCO,
 Suíça). Densidade óssea trabecular (BV/TV) é analisada como descrito nos
 métodos. * indica diferença significativa estatística de todos os controles in-
 25 cluindo, veículo, IgG, perfuração apenas, e animais ilesos no mesmo ponto
 de tempo a $p < 0,05$.

EXEMPLO 18: ESTADO DO BIOMARCADOR

BIOMARCADORES DE DKK1

O padrão de expressão de RNA de DKK1 foi descrito. Krupnik
 30 (1999) mostrou expressão em placenta por análise de Northern blot, sem
 expressão detectada em coração, cérebro, pulmão, fígado, músculo do es-
 queleto ou pâncreas. Wirths (2003) mostrou falta de expressão de RNA em

fígado, rim, e mama, embora a expressão de RNA seja vista em um subconjunto de hepatoblastomas e tumores de Wilms. Colaboradores examinando a expressão no trato gastrointestinal de DKK1 por hibridação de RNA *in situ* não mostrou nenhuma expressão no estômago e cólon, quer normal quer maligna (Byun 2006).

Análise de expressão de RNA em camundongos revelou níveis altos de expressão de DKK1 em osso, expressão média em feto e placenta, e expressão fraca em tecido adiposo marrom, timo e duodeno [Li 2006].

Expressão de proteína de DKK1 é avaliada em espécimes de mieloma usando o mesmo anticorpo de cabra empregado no estudo atual (Tian, 2003). Neste papel, expressão é vista em células de mieloma de pacientes com morfologia de tipo baixo; expressão de proteína de DKK1 não é detectada nos espécimes de biópsia de medula óssea de cinco sujeitos de controle.

Distribuição de tecido e reatividade cruzada de espécies do anticorpo terapêutico de anticorpo de anti-DKK1/4 são estudadas triando-as junto a uma série de tecidos humanos normais e de macaco. As seções de tecido inteiras e microarranjo de tecido são avaliados. Controles positivos incluíram um anticorpo comercial para DKK1 que é avaliado no mesmo conjunto de tecido.

DKK1_15 (anticorpo de anti-DKK1/4 conjugado com FITC) e DKK1_8 (anti-DKK1 de Cabra Conjugado com FITC, R&D Systems, #AF1096, lotes GBL013101 e GBL14111).

OUTRO BIOMARCADORES

Considerando que pouco é conhecido acerca do papel fisiológico de DKK1, uma quantidade significativa de esforço é e foi focalizada na formação da base de conhecimento acerca dos efeitos *in vivo* de anticorpo de anti-DKK1/4 através de estudos de biomarcador e como este poderia ser explorado para mais desenvolvimento. Áreas fundamentais de foco incluíram

1) Entendendo o efeito de anticorpo de anti-DKK1/4 em metabolismo normal e de osso metastático pela medição de marcadores circulantes osteoclastóticos e atividade osteoblástica.

2) Níveis de expressão comparativos de DKK1 em mieloma múltiplo

tiplo e outros tumores para confirmar e expandir indicações alvos.

3) Efeitos em um nível de expressão de gene em tecidos fundamentais como cólon, medula óssea, pulmão, pele e mama para avaliar ativação de beta-catenina.

- 5 Estudos de epidemiologia molecular preliminares confirmaram níveis aumentados de DKK1 no soro em pacientes com mieloma múltiplo e suportaram um POC nesta indicação.

Com base em conhecimento existente, a Tabela 18 fornece os Biomarcadores potenciais propostos para um anticorpo de anti-DKK1/4.

10 Tabela 18 Biomarcadores para alvos DKK1 e DKK4

Categorias	Tumor	Sangue	Tecido substituto
Farmacodinâmica (PD) - Alvo - A jusante Mecanismo de Ação	N/A	Níveis de DKK-1 livre e ligados a Ab de anti-DKK1/4 Ativação de beta-catenina NTx, CTx, PINP, Osteocalcina, RANKL, OPG, PTH, Vitamina D3, calcitonina	Adiposo/pele
Eficácia	Proteína M de soro, proteína M de Urina total, microglobina b2, LDH	NTx, CTx, PINP, Osteocalcina, RANKL, OPG, PTH, calcitonina Osso - ALP, CICP, CTx, NTx, etc	
Marcadores preditivos Estratificação Pré-seleção	Expressão de DKK1	DKK-1, CTx, PINP, Osteocalcin, RANKL, OPG, PTH, Vit D3, calcitonina,, DKK1 soro níveis	
Segurança		Imunogenicidade	
Farmacocinética		anti-DKK1/4 Ab	

EXEMPLO 19: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDO DE REGIÕES VARIÁVEIS DE CADEIA PESADA E LEVE DE ANTICORPOS DE ANTI-DKK1

- 15 As sequências de aminoácido das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas de anticorpos de anti-DKK1 cujas regiões de CDR são mostradas nas Tabelas 5, 6, 11A e 11B, são fornecidas por completo na Tabela 19.

TABELA 19. Sequências de Aminoácido de Regiões Variáveis de Cadeia Pesada e Leve de Anticorpos de Anti-DKK1 (SEQ ID NOS: 2-39)

MOR04454	V _H :	(SEQ	ID	NO:	2)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGLHWVRQAPGKGLEWVSSISYYGSSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSHMDKPPGYVFAFWGQGLTVTS S					
MOR04454	V _L :	(SEQ	ID	NO:	21)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINKYLNWYQQKPGKAPKLLIGAASSLQSGVPSRFS					

GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQYYGMPPTFGQGTKVEIKRT				
MOR04455	V _H :	(SEQ	ID	NO: 3)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYMDHWGQGT LTVSS				
MOR04455	V _L :	(SEQ	ID	NO: 22)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLHWYQQKPGKAPKLLIYGASNLSGVP SRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYDSIPMTFGQGTKVEIKRT				
MOR04456	V _H :	(SEQ	ID	NO: 4)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGT LTVSS				
MOR04456	V _L :	(SEQ	ID	NO: 23)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYGDEPITFGQGTKVEIKRT				
MOR04461	V _H :	(SEQ	ID	NO: 5)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDL DYWGQGT LTVSS				
MOR04461	V _L :	(SEQ	ID	NO: 24)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIH DGSNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSTWDMTVDFVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04470	V _H :	(SEQ	ID	NO: 6)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGT LTVSS				
MOR04470	V _L :	(SEQ	ID	NO: 25)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVNNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYASGNTKVVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04516	V _H :	(SEQ	ID	NO: 7)
QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPTDSYTNYS SFQQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGIPFRMRGFDYWGQGT LTVSS				
MOR04516	V _L :	(SEQ	ID	NO: 26)
DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSSFVNWYQQLPGTAPKLLIGNNSNRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCASFDMGSPNVVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04907	V _H :	(SEQ	ID	NO: 8)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGT LTVSS				
MOR04907	V _L :	(SEQ	ID	NO: 27)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYLSLPTTFGQGTKVEIKRT				
MOR04913	V _H :	(SEQ	ID	NO: 9)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGT LTVSS				
MOR04913	V _L :	(SEQ	ID	NO: 28)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYMTLPLTFGQGTKVEINRT				
MOR04946	V _H :	(SEQ	ID	NO: 10)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGT LTVSS				
MOR04946	V _L :	(SEQ	ID	NO: 29)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYLTPLTFGQGTKVEIKRT				
MOR04910	V _H :	(SEQ	ID	NO: 11)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDL DYWGQGT LTVSS				
MOR04910	V _L :	(SEQ	ID	NO: 30)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLM IH DGSNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSWDVSPITAVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04921	V _H :	(SEQ	ID	NO: 12)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHY				

ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDL DYWGQGLTVTVSS				
MOR04921	V _L :	(SEQ	ID	NO: 31)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIH DGSNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQTWATSPLSSVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04948	V _H :	(SEQ	ID	NO: 13)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM SWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDL DYWGQGLTVTVSS				
MOR04948	V _L :	(SEQ	ID	NO: 32)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIH DGSNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQTWDSL SFFVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04914	V _H :	(SEQ	ID	NO: 14)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM SWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARH GIDFDHWGQGLTVTVSS				
MOR04914	V _L :	(SEQ	ID	NO: 33)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVNNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYTYTPISP VFGGGTKLTVLGQ				
MOR04920	V _H :	(SEQ	ID	NO: 15)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM SWVRQAPGKGLEWVSSIEHKDAGYTT WYAAGVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARH GIDFDHWGQGLTVTVSS				
MOR04920	V _L :	(SEQ	ID	NO: 34)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVNNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYASGNTK VVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04945	V _H :	(SEQ	ID	NO: 16)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM SWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARH GIDFDHWGQGLTVTVSS				
MOR04945	V _L :	(SEQ	ID	NO: 35)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVNNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQTYDQIKLS AVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04952	V _H :	(SEQ	ID	NO: 17)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM SWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARH GIDFDHWGQGLTVTVSS				
MOR04952	V _L :	(SEQ	ID	NO: 36)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVNNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYDSPTD SVVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04954	V _H :	(SEQ	ID	NO: 18)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM SWVRQAPGKGLEWVSVIEHKDKGGTTY YAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARH GIDFDHWGQGLTVTVSS				
MOR04954	V _L :	(SEQ	ID	NO: 37)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVNNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSYASGNTK VVFGGGTKLTVLGQ				
MOR04947	V _H :	(SEQ	ID	NO: 19)
QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYI GWVRQMPGKGLEWVGIIVPGTSYTIYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARGIPFRMRGFDYWGQGLTVTVSS				
MOR04947	V _L :	(SEQ	ID	NO: 38)
DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSSFV NNYQQLPGTAPKLLIGNNSNRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCASFDMG SPNVVFGGGTKLTVLGQ				
MOR05145	V _H :	(SEQ	ID	NO: 20)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN NYGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGLTVTVSS				
MOR05145	V _L :	(SEQ	ID	NO: 39)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFS PYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARF SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYMTLPLTF GGQGTKVEIKRT				

As seções de CDR e FR das regiões variáveis na Tabela 19 estão alinhadas na Tabela 20A para cadeias pesadas (SEQ ID NOS:2-20; VH3

[illegible]

TABELA 20B. Alinhamento das Seqüências de Aminoácido de Regiões Variáveis de Cadeia Leve Capa de Anticorpos de Anti-DKK1 (SEQ ID NOS: 24-25, 30-37, 129-130)

[illegible]

Tabela 20C. Alinhamento das Seqüências de Aminoácido de Regiões Variáveis de Cadeia Leve Lambda de Anticorpos de Anti-DKK1 (SEQ ID NOs:)

VL

VL lambda sequences DKK1 binders

SeqID	Posição	VL	VL lambda sequences DKK1 binders																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
			Framework 1	CDR1	Framework 2	CDR2	Framework 3	CDR3	Framework 4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
SEQ ID NO 31	VL2	D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471

Listagem de Sequência

<110> Novartis AG
 <120> COMPOSITIONS AND METHODS OF USE FOR ANTIBODIES OF DICKKOPF-1
 <130> ON4-34783
 <150> USPN 60/759216
 <151> 2006-01-13
 <160> 136
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Arg Val Phe Val Ala Met
 1 5 10 15
 Val Ala Ala Ala Leu Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Val Ser Ala Thr
 20 25 30
 Leu Asn Ser Val Leu Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro Pro
 35 40 45
 Leu Gly Gly Ala Ala Gly His Pro Gly Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro
 50 55 60
 Gly Ile Leu Tyr Pro Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Ile Asp Asn Tyr
 65 70 75 80
 Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu
 100 105 110
 Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys
 115 120 125
 Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn
 130 135 140
 His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn
 145 150 155 160

Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser
165 170 175

Lys Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser
180 185 190

Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys
195 200 205

Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg
210 215 220

Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg, Cys Tyr Cys Gly
225 230 235 240

Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn
245 250 255

Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
260 265

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Tyr Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Ser His Met Asp Lys Pro Pro Gly Tyr Val Phe Ala
100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg His Tyr Met Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 4
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Thr Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65		70				75				80					
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				95					90					95	
Ala	Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Arg	Met	Arg	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100						105					110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210> 8
<211> 115
<212> FRT
<213> Homo sapiens

<400> B

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Phe Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

```
<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

<210> 10
 <211> 115
 <212> PR2
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

Ser Ser Ile Glu His Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Thr Trp Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

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

Ser Val Ile Glu His Lys Asp Lys Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Val Pro Gly Thr Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ile Pro Phe Arg Met Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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 Gly Ile Lys Asn Tyr
20 25 30

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

Gly 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 Leu Gln Tyr Tyr Gly Met Pro Pro
85 90 95

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

<210> 22
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

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 Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ile Pro Met
 85 90 95

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

<210> 23
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asp Glu Pro
85 90 95

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

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Trp Asp Met Thr
85 90 95

Val Asp Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 25
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Phe Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Gly Asn Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Met Gly Ser
85 90 95

Pro Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 27
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ser Leu Pro
85 90 95

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

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Asn Arg Thr

100

105

110

<210> 29
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Thr Leu Pro
 85 90 95

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

<210> 30
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65	70	75	80
Gln Ala Glu Asp	Glu Ala Asp Tyr Tyr	Cys Gln Ser Trp Asp	Val Ser
	85	90	95

Pro Ile Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 31
<211> 113
<212> PR7
<213> Homo sapiens

<400> 31

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
39 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

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

G1a

<210> 32
<211> 112
<212> FRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Asp Ser Leu
85 90 95

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

<210> 33
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Pro Ile Ser Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 34
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
 85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 35
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Gln Ile
85 90 95

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

Gln

<210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 36

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Pro
85 90 95

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

Gln

<210> 37
<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
 85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

Phe Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Gly Asn Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Met Gly Ser
85 90 95

Pro Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 39
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro
85 90 95

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

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

Phe

<210> 41
<211> 17

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

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

Phe

<210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

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

Phe

<210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Thr
 1 5 10

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr Gly Met Thr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Thr
 1 5 10

<210> 46

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Thr
 1 5 10

<210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Thr
 1 5 10

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly Met Thr
 1 5 10

<210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Ser
1				5					10

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Ser
1				5					10

<210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Ser
1				5					10

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Ser
1				5					10

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Ser
1				5					10

<210> 57
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Trp Val Ser Gly Ile Ser Glu Arg Gly Val Tyr Ile Phe Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
 20

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Trp Val Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
 20

<210> 59

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Trp Val Ser Asp Ile Glu His Lys Arg Arg Ala Gly Gly Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly
 20

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Trp Val Ser Met Ile Glu His Lys Thr Arg Gly Gly Thr Thr Asp Tyr
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Val Lys Gly
 20

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Trp Val Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
 20

<210> 62
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Trp Val Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
 20

<210> 63
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Trp Val Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
 20

<210> 64
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

Trp Val Ser Val Ile Glu His Lys Ser Phe Gly Ser Ala Thr Phe Tyr
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Val Lys Gly
 20

<210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65

His Tyr Met Asp His

1 5

<210> 66
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66

Thr Ile Tyr Met Asp Tyr
 1 5

<210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 69

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 70

His Gly Ile Asp Phe Asp His
 1 5

<210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

His Gly Ile Asp Phe Asp His
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

His Gly Ile Asp Phe Asp His
1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 77
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 78
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 79
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 80
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81

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

<210> 82
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5 10

<210> 83
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83

Leu Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 84
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

Leu Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 85
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85

Leu Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 86
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 88
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gln Gln Tyr Asp Ser Ile Pro Met
1 5

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Gln Gln Tyr Leu Phe Pro Leu
1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Ser Thr Trp Asp Met Thr Val Asp Phe
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ser Thr Trp Asp Met Thr Val Asp Phe
1 5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gln Ser Trp Gly Val Gly Pro Gly Gly Phe
1 5 10

<210> 94
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

Gln Ser Tyr Asp Pro Phe Leu Asp Val Val
 1 5 10

<210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95

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

<210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96

Gln Ser Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Lys Val
 1 5 10

<210> 97
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 97

gatatcgac tgaccagcc agcttcagt agcggctac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagag cgaatgttgg ggttttaatt atgtgtcttg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgcgaa acttatgatt catgatggtt ctaatcgcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttacgggac caaagcggc aacaccgga gctgacct tagcggcctg 240
 caagcggag agagcggg ttattattgc cagtcttgg atgtttctcc tattactgct 300
 gtgtttggcg gcggcacga gcttaccgtc ctaggtcagc caagggtgc cccctcggtc 360
 aactctgttc cgcctctctc tgaggagctt caagccaaca aggcacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgg aggcagatag cagcccgtc 480
 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gctgacgcc tgagcagtgg aagtcacaca gaagctacg ctgccaggtc 600

acgcacgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggcccta cagaatgttc atag 654

<210> 98
<211> 654
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 98
gataatcgac tgaccagac agcttcagt agcggctac caggtcagag cattaccata 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatcttggg ggttataatt atgtgtcttg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatgatgta ataactgtcc ctccggcgtg 180
agcaaccgtt ttacgggac caaagcggc aacaccggc gcctgacct tagcggcgtg 240
caagcgggaa acgaagcga ttattattgc cagacttatg atcagattaa gttgtctgtc 300
gtgtttggcg gcggcagaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggcacact ggtgtgtctc 420
ataagtact tctaccggg agcctgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccgctc 480
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cggggccagc 540
agctatctga gcctgacgc tgagcagtgg aagtcacca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcacgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggcccta cagaatgttc atag 654

<210> 99
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 99
gataatctgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggga acgtgcgacc 60
ctgagctgca gagcagcga gaatcttttt tctccttate tggcttgga ccagcagaaa 120
ccaggctcag caccgcgtct attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tggggctccg 180
gctgctttta ggggtcttg atccggcag gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
cctgaagact ttgctgtgta ttattgccag cagtatctta ctcttctct tacctctggc 300
cagggtatga aagtcagat caacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatccacag aggcacaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcact acagcctcag cagcaccctg 540
acgtgagca aagcagacta cgaagaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcctgcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 100

<211> 648
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 100
 gatctcgtgc tgacccagag ccgggggacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60
 ctgagctgca gagcgagcca gaattttttt tctctttatc tggcttggtc ccagcagasa 120
 ccaggtcaag caccgcgtct attaatttat ggtgcttcta atcgtgcaac tgggggcccg 180
 ggcggtttta ggcgctctgg atccggcacc gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240
 cctgaagact ttgcgggtga ttattgccag cagtatatga ctctctctct tacctttggc 300
 cagggtacga aagtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
 ccctctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatccagag aggccaaagt acagtggaa gtggataacg cctccaac ccgtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcact acagcctcag cagcacccg 540
 acgttgagca aagcagacta cgagaaacac aaggtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggctctgagc cgcccgctac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 101
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 caggcacagg tgcaatttgt ggaagcgggc gggggctgg tgcaaccggg cggcagcctg 60
 cgtctgagct gcgcggcctc cggatttacc tttctctctt attggatgct ttgggtgcgc 120
 caagcccttg ggaagggtct cagtggtgtg agcgttatct cttattctgg tagcaatacc 180
 cattatgcgg atagcgtgaa aggcggtttt accatttcac gtgataatc gaaaacacc 240
 ctgtatctgc aantgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg cgtgtatta ttgcgcgct 300
 atgggtattg atcttgatta ttggggcaca ggcaccctgg tcaccgtctc ctacagctcc 360
 accaagggcc catcggctct cccctggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 ggggccttg gctgcctggc caaggactac ttcccgaac cgtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctacggactc 540
 tactcctca gcagcgtctg gacgtgccc tcacgcagct tgggcaccca gacctacac 600
 tgcaacgtga atcaacaagg cagcaacacc aaggtggaca agaggttga gcccaaatct 660
 tgtgacaaa ctcacncatg cccaccgtgc ccagcacctg aactctctgg gggaccgtca 720
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggaa accctcatga tctccggac cctgaggtc 780
 acatgcgtgg tgggtggcgt gagccacgaa gacctgagc tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtect caccgtctcg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
 aagtgcaggg tctccaacaa agccctccca gcccccctcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgac aaaggtttct atccagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tcgacggct cttcttctct ctatagcaag ctcaaccgtg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaaagtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cagcagaag 1320
 agcctctccc tgtcccggg taaatga 1347

<210> 102
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 102
 caggcacagg tgaattggt ggaagcggc ggcggcctgg tgaaccggg cggcagcctg 60
 cgtctgagct gcgcggcctc cggatttacc ttttttttt attggtgtc ttgggtggc 120
 caagccctcg ggaaggtct caggtgggtg agcgttatct cttctgattc tagctctacc 180
 tattatggg atagcgtgaa aggcgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaaaccc 240
 ctgtatctgc aatgaacag cctgctgtcg gaagatacgg cgtgtatta ttgogcggt 300
 catggtattg attttgatca ttggggccaa ggcacccctg tcacgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcggtctt cccctggaa cctctctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgctggt caaggactac ttcccgaac cgtgacgggt gtctgggac 480
 tcaggcgccc tgaccaggg cgtgcacacc ttcccgctg tctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtctg gacgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacatcac 600
 tgcaacgtga atcacagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaatct 660
 .tgtgacaaa ctccacatg cccacgtgc ccagcacctg aactcctggg gggacgtca 720
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac cctgaggtc 780
 acatgctgg tgggtgagct gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtect caccgtctcg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
 aagtgcaggg tctccaacaa agccctccca gcccccctcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgac aaaggtttct atccagcga catcgccgtg 1140

gagtgaggaga gcaatgggca gccgggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctacccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta caccgagaag 1320
 agcctctccc tgccccggg taatatga 1347

<210> 103
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 cagggtgcagc tgggtggagag cggcgaggga ctggtgcago ctggcggcag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caoctcaac aactacggca tgacctgggt gaggcagccc 120
 cctggcaagg gectggagtg ggtgtccggc atcagcggca gccgcagcta cacctactac 180
 gccgacagcg tgaaggcag gttcaccate agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc ccggaccate 300
 tacatggact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccagggc 360
 ccacgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcact ctgggggcat agcggccctg 420
 ggtgccttg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctccgggccc 480
 ctgaccagcg gcgtgcscac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtcg tgacctgpc ctcacagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaatc ttgtgacaa 660
 actcacat gccacccgtg cccagcactt gaactcctgg ggggacogtc agtcttctc 720
 tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt caatggctg 780
 gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtcca actggtacgt ggaaggcgtg 840
 gaggtgcata atgccagac aaagccggcg gaggagcagt acaacagcac gtaaccgtg 900
 gtcagcgtcc tcacctctt gccaccggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag 960
 gtctccaca aagccctccc agccccctc gagaaaaa tctccabagc caaaggcag 1020
 ccccgagaa caccagtgta caccctgcc ccacccggg aggagatgac caagacccag 1080
 gtcagcctga cctgctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatggg agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tcttctctc tctatagca gtcaccgtg gacaagagcc ggtggcagca ggggacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgagaa gagcctctc 1320
 ctgtccccgg gtaatatga 1338

<210> 104
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 gatatacggc tgaaccagcc cggcagcgtg tccggcagcc ctggccagag catcaccatc 60
 agctgtaccg gcaccagcag cgaatgtggc ggcttcaact acgtgtcctg gtatcagcag 120
 caccocggca agggcccca gctgatgac cagcagcga gcaatagacc cagcggcgtg 180
 tccaatagat tcagcggcag caagagcggc aacacggcca gcctgacct cagcggcctg 240
 caggctgagg acgagggcga ctactactgc cagagctggg atgtgagccc catcacggcc 300
 gtgttttggc gcggaacaaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
 actctgttcc cggcctcttc tgaggagctt caagccaaca aggcacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgaat tctaccggg agcgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccgctc 480
 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gctgacgcc tgagcagtgg aagtcaccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
 acgcctgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggcccta cagaatgttc atag 654

<210> 105
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 gatatacggc tgaaccagcc cggcagcgtg tccggcagcc ctggccagag catcaccatc 60
 agctgtaccg gcaccagcag cgaactgggc ggctacaact acgtgtcctg gtatcagcag 120
 caccocggca agggcccca gctgatgac tacgacgtga acaacagacc tagcggcgtg 180
 tccaacagat tcagcggcag caagagcggc aacacggcca gcctgacct ctctggcctg 240
 caggctgagg acgagggcga ctactactgc cagacctacg accagatcaa gctgtccgcc 300
 gtgttttggc gcggaacaaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
 actctgttcc cggcctcttc tgaggagctt caagccaaca aggcacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgaat tctaccggg agcgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccgctc 480
 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gctgacgcc tgagcagtgg aagtcaccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
 acgcctgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggcccta cagaatgttc atag 654

<210> 106
 <211> 648
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 106
gacatcgtgc tgaccacagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgtcttcta gggccagcca gaacctgttc agcccttacc tggcctggta tcagcagaag 120
cccgccaggy ccccagact gctgatctac ggcgccagca acagagccac cggcgtgccc 180
gccagattca gggcagcgg ctccggcacc gacttcacc tgaccatcag cagcctggag 240
cctgaggatt tcgccgtgta ctactgccag cagtcacctga cctgcccct gaccttcggc 300
cagggcacca aggtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gccctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagccact acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cggagaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 107
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 107
gacatcgtgc tgaccacagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgtcttcta gggccagcca gaacctgttc agcccttacc tggcctggta tcagcagaag 120
cccgccaggy ccccagact gctgatctac ggcgccagca acagagccac cggcgtgccc 180
gccagattca gggcagcgg ctccggcacc gacttcacc tgaccatcag cagcctggag 240
cctgaggatt tcgccgtgta ctactgccag cagtcacctga cctgcccct gaccttcggc 300
cagggcacca aggtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gccctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagccact acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cggagaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 108
<211> 1347
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 108

caggccccagg tgcagctggt ggagagcggc ggaggactgg tgcagcctgg cggcagcctg 60
 agactgagct gtgcgcagcagg cggcttcacc ttcagcagct actggatgag ctgggtgagg 120
 caggccccctg gcaagggcct ggagtgggtg tccggcatca gctacagcgg cagcgaatcc 180
 cactacgcgg acagcgtgaa gggcagggtc accatcagcc gggacaacag caagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccc ccgtgtacta ctgtgcccg 300
 atgggcctcg acctggatta ctggggccag ggcaccctgg tcaacgtctc ctacgcctcc 360
 accaaggggc catcggtctt ccccttgga cctctctcca agagcaacct tgggggcaca 420
 gcggccccctg gctgctggt caaggaactac ttccccgac ccgtgacggg gtctgtgac 480
 tcaggcgccc tgacagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcttacagtc ctgaggactc 540
 tactccctca gcagcgtcgt gacgtgccc tccagcagct tgggcaacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga atcaaacgc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaatct 660
 tctgacaaa ctcacacatg ccaacccgtg ccagcaccctg aactcctggg gggaccgtca 720
 gtcttctct tccccccaa acccaaggac aacctcatga tctccccgac cctgaggtc 780
 acatgcgtg tgggtgagct gaggcagaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccagaca aagccggggg agggagcagta caacagcag 900
 taccgtgtg tcagcgtctt caccgtctg caccaggact ggtgtaatg caaggagtac 960
 aagtgcagg tctccacaa agccctccca gccccatcg agaaaacct ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc cccagagacc acaggtgtac acctgcccc catccggga ggaatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atccagcga cctgcctgtg 1140
 gagtgggaga gcaatggga gcggaggaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgtggac 1200
 tcagacggct ccttctctct ctatagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaaagtct tctcatgctc cgtgatgat gaggctctgc acaaccacta cagcagag 1320
 agcctctccc tctccccggg taatga 1347

<210> 109
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 caggccccagg tgcagctggt ggagagcggc ggaggactgg tgcagcctgg cggcagcctg 60
 agactgagct gtgcgcagcagg cggcttcacc ttcagcagct actggatgag ctgggtgagg 120
 caggccccctg gcaagggcct ggagtgggtg tccgtgatca gcagcagatg cagcagcaac 180
 tactacgcgg atagcgtgaa gggcagggtc accatcagcc gggacaacag caagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccc ccgtgtacta ctgtgccagg 300

caaggcatcg acttcgacaa ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcggtctt cccctggca cctctctca agagcactc tgggggcaca 420
 gggccctgg gctgcttgg caaggactac ttcccggaac cgttgacggg gtctgtgaac 480
 tcaggccccc tgaccagcg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc 540
 tactcctca gacgctctg gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacac 600
 tgcaacgtg atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttga gcccaaatct 660
 tgtgacaaa ctacacatg cccacgtgc ccagcactg aactcctggg gggaccgtca 720
 gtctctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc 780
 acatgcgtg tgggtggact gagccacga gacctgagg tcaagtcca ctggtacgtg 840
 gacggcgtg aggtgcataa tgccaagaca aagccggggg aggagcagta caacagcacg 900
 taccgtgtg tcagcgtcct caccgtctg caccaggact ggtgcaatg caagagatc 960
 aagtgcagg tctccacaa agccctccca gccccctcg agaaacat ctccaaagcc 1020
 aaaggcagc cccagaaacc acaggtgtac accctgccc catccggga gtagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgc aaaggctct atccagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggag gcaatggga gccggagaa aactacaaga caagccctc cgtgctggac 1200
 tcggagcgt cctctctct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggacgtct tctatgctc cgtgatgat gaggtcttg acaaaccta cagcagaag 1320
 agcctctcc tgtcccggt taatga 1347

<210> 110
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 caggtgcaat tgggtggaag cggcggggc ctggtgcaac cggcgggcag cctgctctg 60
 agctgcggg cctccggatt tacctttaat aattatgga tgacttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcagtg ggtgagcgt atctctggt ctggtagcta tacctattat 180
 ggggatagc tgaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcy tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactatt 300
 tatatggatt attggggcca aggcacctg gtcaccgtct cctcagctc caccagggc 360
 ccacgggtct tcccctggc accctctcc aagagcaant ctgggggca agcgccctg 420
 ggtgccttg tcaaggacta ctcccccga cgggtgacg gtctgtgaa ctcaggccgc 480
 ctgaccagc ggtgcacac ctcccggtg gtctacagt cctcaggact ctactccctc 540

```

agcagcgtcg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaaac caaggtggac aagagagttg agcccaaate ttgtgacaaa 660
actcacacat gccacccgtg cccagcacct gaactccttg ggggacogtc agtcttcttc 720
ttccccccaa aatccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggagc tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaaagc aaagcccgcg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgttc tcaccgtccf gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag 960
gtctccaaac aagccctccc agcccccate gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaa cagaggtgtg caccctgccc ccacccggg ggggatgac caagaacag 1080
gtcagcgtga cctgctggt caaaggcttc tatccagcg acatgcctgt ggaagtggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tctctcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtccccgg gtaaatga 1338

```

```

<210> 111
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 111

```

```

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

```

```

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

```

```

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

```

```

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

```

```

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

```

```

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

```

```

Pro Ile Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

```

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 112
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Gln Ile
85 90 95

Lys Leu Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 113
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Thr Leu Pro
 85 90 95

Leu Thr 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 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> 114
<211> 215
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro
85 90 95

Leu Thr 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 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> 115
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 116
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355

360

365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 117
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 117

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 118
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser
1 5 10 15

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

Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 119
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

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

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

Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45

Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr
 115

<210> 120
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 120
 acgcgttgcg atatcgccct gaccagagcc gccagcgtgt ccggcagccc tggccagagc 60
 attaccatca gctgtaccgg caccagcagc gaectggggc gctacaacta cgtgtcctgg 120
 tatcagcagc acccgggcaa ggcgcccaag ctgatgatct acgacgtgaa caacagacct 180
 agcggcgtgt ccaacagatt cagcggcagc aagagcggca acaccggcag cctgaccatc 240
 tctggcctgc aggcctgagga cgaaggcagc tactactgcc agacctacga ccagatcaag 300
 ctgtccgcgc tgtttggcgg cggaaacaaag ctt 333

<210> 121
 <211> 361
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 121
 gactccattg ggagtgacag cccaggtgca gctggtggag agcggcggag gactggtgca 60
 gcctggcggc agcctgagac tgaactgtgc cggcagcggc ttacacctca gcagctactg 120
 gatgagctgg gtgagggcag cccctggcaa gggcctggag tgggtgtcgg tgatcagcag 180
 ccatagcagc agcacctact scgcagatag cgtgaagggc cgtttcaaca tcagccggga 240

caacagcaag aacacccctgt acctgcagat gaacagcctg agagccgagg acaccgccgt 300
gtactactgt gccagggcag gcatcgactt cgaccactgg ggcagggca cctgggtcac 360
c 361

<210> 122
<211> 259
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Met Ala Ala Leu Met Arg Ser Lys Asp Ser Ser Cys Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Val Leu Met Val Glu Ser Ser Gln Ile Gly Ser Ser Arg
20 25 30

Ala Lys Leu Asn Ser Ile Lys Ser Ser Leu Gly Gly Glu Thr Pro Gly
35 40 45

Gln Ala Ala Asn Arg Ser Ala Gly Met Tyr Gln Gly Leu Ala Phe Gly
50 55 60

Gly Ser Lys Lys Gly Lys Asn Leu Gly Gln Ala Tyr Pro Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Lys Glu Cys Glu Val Gly Arg Tyr Cys His Ser Pro His Gln Gly
85 90 95

Ser Ser Ala Cys Met Val Cys Arg Arg Lys Lys Lys Arg Cys His Arg
100 105 110

Asp Gly Met Cys Cys Pro Ser Thr Arg Cys Asn Asn Gly Ile Cys Ile
115 120 125

Pro Val Thr Glu Ser Ile Leu Thr Pro His Ile Pro Ala Leu Asp Gly
130 135 140

Thr Arg His Arg Asp Arg Asn His Gly His Tyr Ser Asn His Asp Leu
145 150 155 160

Gly Trp Gln Asn Leu Gly Arg Pro His Thr Lys Met Ser His Ile Lys
165 170 175

Gly His Glu Gly Asp Pro Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ile Glu Gly
180 185 190

Phe Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu
195 200 205

His Gln Gly Glu Val Cys Thr Lys Gln Arg Lys Lys Gly Ser His Gly
210 215 220

Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Asp Cys Ala Lys Gly Leu Ser Cys Lys
225 230 235 240

Val Trp Lys Asp Ala Thr Tyr Ser Ser Lys Ala Arg Leu His Val Cys
245 250 255

Gln Lys Ile

<210> 123

<211> 350

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
20 25 30

Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
35 40 45

Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys
50 55 60

Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys
65 70 75 80

Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
85 90 95

Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
100 105 110

Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
115 120 125

Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
130 135 140

His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
145 150 155 160

Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
165 170 175

Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
180 185 190

Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
195 200 205

Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
210 215 220

Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
225 230 235 240

Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
245 250 255

Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
260 265 270

Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
275 280 285

Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
290 295 300

Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
305 310 315 320

Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Gly Glu
325 330 335

Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
340 345 350

<210> 124
<211> 224
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

Met Val Ala Ala Val Leu Leu Gly Leu Ser Trp Leu Cys Ser Pro Leu
1 5 10 15

Gly Ala Leu Val Leu Asp Phe Asn Asn Ile Arg Ser Ser Ala Asp Leu
20 25 30

His Gly Ala Arg Lys Gly Ser Gln Cys Leu Ser Asp Thr Asp Cys Asn
35 40 45

Thr Arg Lys Phe Cys Leu Gln Pro Arg Asp Glu Lys Pro Phe Cys Ala
50 55 60

Thr Cys Arg Gly Leu Arg Arg Arg Cys Gln Arg Asp Ala Met Cys Cys
65 70 75 80

Pro Gly Thr Leu Cys Val Asn Asp Val Cys Thr Thr Met Glu Asp Ala
85 90 95

Thr Pro Ile Leu Glu Arg Gln Leu Asp Glu Gln Asp Gly Thr His Ala
100 105 110

Glu Gly Thr Thr Gly His Pro Val Gln Glu Asn Gln Pro Lys Arg Lys
115 120 125

Pro Ser Ile Lys Lys Ser Gln Gly Arg Lys Gly Gln Glu Gly Glu Ser
130 135 140

Cys Leu Arg Thr Phe Asp Cys Gly Pro Gly Leu Cys Cys Ala Arg His
145 150 155 160

Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Leu Glu Gly Gln Val Cys
165 170 175

Ser Arg Arg Gly His Lys Asp Thr Ala Gln Ala Pro Glu Ile Phe Gln
180 185 190

Arg Cys Asp Cys Gly Pro Gly Leu Leu Cys Arg Ser Gln Leu Thr Ser
195 200 205

Asn Arg Gln His Ala Arg Leu Arg Val Cys Gln Lys Ile Glu Lys Leu
210 215 220

<210> 125
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(116)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 125

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 126
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(116)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 126

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 127
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (90)..(97)
<223> wherein X may be any amino acid

<400> 127

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 Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala 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 Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

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

<210> 128
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(98)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 128

Asp 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 Ser
 20 25 30

Tyr 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 Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

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

<210> 129
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(100)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 129

Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 130
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (90)..(99)
<223> wherein X may be any amino acid

<400> 130

Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 131
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(11)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 131

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa
 1 5 10

<210> 132
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(11)

<400> 132

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 133
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(8)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 133

Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
 1 5

<210> 134
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 134

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(7)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 135

Leu Met Ile Xaa Asp Xaa Xaa Asn Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 136

Xaa Xaa Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo uma região de ligação de antígeno que especificamente liga um epítipo em um polipeptídeo de DKK1 (SEQ ID NO: 1) e/ou em um polipeptídeo de DKK4 (SEQ ID NO: 122), em
5 que o anticorpo ou fragmento funcional do mesmo liga a pelo menos um epítipo em DKK1 ou DKK4, ou ambos.

2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que ligação a DKK1 ou DKK4 é determinada em pelo menos um ensaio selecionado de: antagonismo de transcrição sinalizada por Wnt; análise de ligação com base
10 em eletroquimiluminescência; ligação de ensaio imunoabsorvente ligado a enzima; FMAT; SET; SPR; concentração no soro de osteocalcina (OCN); concentração no soro de osteoprotegrina (OPG); concentração no soro de propetídeo azotado do tipo 1 de procolágeno (P1NP), produção de ALP; TopFlash ou melhorando osteólise.

3. Seqüência de aminoácido isolada selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 2-20 e SEQ ID NOs: 40-72 e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") das mesmas.
15

4. Seqüências de aminoácido isoladas de acordo com a reivindicação 3, em que as seqüências de aminoácido são selecionadas de:
20

a) o grupo de SEQ ID NOs: 2-20, 65-72, cada compreendendo uma região de ligação de antígeno que compreende uma região de H-CDR3;

b) o grupo de SEQ ID NOs: 2-20, 57-64 cada compreendendo uma região de H-CDR2;

c) o grupo de SEQ ID NO: 40 compreendendo a seqüência GISGSGSYTTYADSVKF, SEQ ID NO: 41 compreendendo a seqüência GISYYGGNTYYADSVKF, e SEQ ID NO: 42 compreendendo a seqüência GISYYGGSTYYADSVKF, cada compreendendo uma região de H-CDR2 de consenso;
25

d) o grupo de SEQ ID NOs: 2-5, 8-11, 20, 49-56 cada compreendendo uma região de H-CDR1; e,
30

e) o grupo de SEQ ID NO: 43 tendo a seqüência de aminoácido

GFTFSSYGMT, SEQ ID NO: 44 tendo a sequência de aminoácido
 GFTFNSYGMT, SEQ ID NO: 45 tendo a sequência de aminoácido
 GFTFSNYGMT, SEQ ID NO: 46 tendo a sequência de aminoácido
 GFTFSSYWMT, SEQ ID NO: 47 tendo a sequência de aminoácido
 5 GFTFSSYAMTF, e SEQ ID NO: 48 tendo a sequência de aminoácido
 GFTFSSYGMS de cada compreendendo uma região de H-CDR1 de con-
 senso; ou

f) SEQ ID NOs: 21-39 e 73-88; e
 variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheira-
 10 das ("humaneered") das mesmas.

5. Região de ligação de antígeno isolada de acordo com a rei-
 vindicação 4, em que as sequências de aminoácido selecionadas do grupo
 de SEQ ID NOs: 21-39 cada uma compreende uma região de L-CDR3, as
 sequências de aminoácido selecionadas do grupo de SEQ ID NOs: 21-39,
 15 73-80 cada uma compreende uma região de L-CDR1, as sequências de a-
 minoácido selecionadas do grupo de SEQ ID NOs: 21-39, 81-88 cada uma
 compreende uma região de L-CDR2, as sequências de aminoácido selecio-
 nadas do grupo de SEQ ID NOs: 21-39 cada uma compreende uma região
 variável de uma cadeia leve.

20 6. Sequência de nucleotídeo isolada selecionada do grupo de
 SEQ ID NOs: 97-103.

7. Sequência de aminoácido isolada codificada por uma seqüên-
 cia de nucleotídeo de acordo com a reivindicação 6, e variantes conservado-
 ras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") da
 25 seqüência de aminoácido, em que

a) cada uma de SEQ ID NOs: 97-100 codifica uma cadeia leve
 de ligação de antígeno; e

b) cada uma de SEQ ID NOs: 101-103 codifica uma cadeia pe-
 sada de ligação de antígeno.

30 8. Sequência de nucleotídeo isolada de acordo com a reivindica-
 ção 6, em que a sequência de nucleotídeo é também otimizada para expres-
 são e/ou para uso clínico.

9. Seqüência de nucleotídeo isolada selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 104-110.

10. Seqüência de aminoácido isolada codificada por uma seqüência de nucleotídeo de acordo com a reivindicação 9, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("human-engineered") da seqüência de aminoácido, em que:

a) cada uma de SEQ ID NOs: 104-107 codifica uma cadeia leve de ligação de antígeno, e

10 b) cada uma de SEQ ID NOs: 108-110 codifica uma cadeia pesada de ligação de antígeno.

11. Seqüência de nucleotídeo isolada de acordo com a reivindicação 9, em que a seqüência de nucleotídeo é otimizada para expressão e/ou para uso clínico.

12. Seqüência de aminoácido isolada selecionada do grupo de 15 111-117 e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("human-engineered") das mesmas, em que

a) cada uma de SEQ ID NOs: 111-114 codifica uma cadeia leve de ligação de antígeno, e

20 b) cada uma de SEQ ID NOs: 115-117 codifica uma cadeia pesada de ligação de antígeno.

13. Seqüência de aminoácido isolada de acordo com a reivindicação 12, em que a seqüência de aminoácido é otimizada para expressão e/ou para uso clínico.

25 14. Seqüência de nucleotídeo isolada selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 120-121.

15. Seqüência de aminoácido isolada codificada por uma seqüência de nucleotídeo de acordo com a reivindicação 14, e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("human-engineered") da seqüência de aminoácido, em que

30 a) SEQ ID NO: 120 codifica uma região variável de ligação de antígeno de uma cadeia leve, e

b) SEQ ID NO: 121 codifica uma região variável de ligação de

antígeno de uma cadeia pesada.

16. Seqüência de nucleotídeo isolada de acordo com a reivindicação 14, em que a seqüência de nucleotídeo é otimizada para expressão e/ou para uso clínico.

5 17. Região de ligação de antígeno isolada que compreende uma região variável de uma cadeia leve codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NO: 120, e uma região variável de uma cadeia pesada codificada por uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo de SEQ ID NO: 121.

10 18. Seqüência de aminoácido isolada selecionada do grupo de 118-119 e variantes conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("humaneered") das mesmas.

15 19. Seqüência de aminoácido isolada de acordo com a reivindicação 18, em que a SEQ ID NO: 118 descreve uma região variável de ligação de antígeno de uma cadeia leve.

20 20. Seqüência de aminoácido isolada de acordo com a reivindicação 18, em que a SEQ ID NO: 119 descreve uma região variável de ligação de antígeno de uma cadeia pesada.

25 21. Seqüência de aminoácido isolada de acordo com a reivindicação 18, em que a seqüência de aminoácido é otimizada para expressão e/ou para uso clínico.

22. Seqüência de aminoácido isolada tendo pelo menos 95 por cento de identidade com pelo menos uma região de CDR selecionada das regiões descritas em SEQ ID NOs: 2-121.

25 23. Seqüência de aminoácido isolada tendo uma seqüência de consenso das regiões de CDR como mostradas nas Tabelas 11A e 11B.

24. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1 que compreende um andaime selecionado de uma IgM e uma IgG, em que a IgG é selecionada de uma IgG1, uma IgG2, e IgG3 ou uma IgG4.

30 25. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 24, em que a IgM ou a IgG são selecionadas de uma policlonal ou monoclonal.

26. Anticorpo isolado ou fragmento funcional do mesmo, com-

preendendo uma região de ligação de antígeno que é específica para um epítipo de DKK1, em que o anticorpo ou fragmento funcional liga a DKK1 ou DKK4, e impede ou melhora o desenvolvimento de uma doença associada a DKK1 ou uma doença associada a DKK4.

5 27. Região de ligação de antígeno isolada de um anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 26.

 28. Anticorpo isolado ou fragmento funcional do mesmo compreendendo uma região de ligação de antígeno que é específica para um epítipo de DKK1 ou DKK4 alvo ou ambos, em que o epítipo compreende pelo
10 menos seis ou mais resíduos de aminoácido de um domínio de CYS2 de DKK1 ou DKK4 alvo.

 29. Anticorpo isolado ou fragmento funcional de acordo com quaisquer das reivindicações precedentes 1-28, que é selecionado de uma imunoglobulina inteira ou fragmento de Fab ou fragmento de anticorpo de
15 scFv desta, um anticorpo de cadeia pesada, e uma região de ligação de antígeno desta em um andaime de não-imunoglobulina.

 30. Anticorpo isolado ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 29 em que o epítipo é um epítipo conformacional.

 31. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos um
20 anticorpo ou fragmento funcional de acordo com a reivindicação 29 e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável para este.

 32. Animal transgênico que carrega um gene que codifica um anticorpo ou fragmento funcional do mesmo de acordo com a reivindicação 29.

 33. Método para tratar um distúrbio ou condição associada à
25 presença de DKK1 ou DKK4, compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 31.

 34. Método de acordo com a reivindicação 33, em que o distúrbio ou condição é selecionada de lesões osteolíticas --especialmente lesões
30 osteolíticas associadas a um mieloma, especialmente um mieloma múltiplo, ou a cânceres de osso, mama, cólon, melanócitos, hepatócitos, epitélio, esôfago, cérebro, pulmão, próstata ou pâncreas ou metástase dos mesmos;

perda óssea associada à transplantação; ou é um osteossarcoma, câncer de próstata, carcinoma hepatocelular (HCC), mieloma incluindo mieloma múltiplo, diabetes, obesidade, definhamento muscular, doença de Alzheimer, osteoporose, osteopenia, reumatismo, colite e/ou perda de cabelo indesejada.

5 35. Método de acordo com a reivindicação 33, em que o método também compreende administrar um segundo agente terapêutico.

 36. Método de acordo com a reivindicação 35, em que o agente quimioterapêutico é Zometa.

 37. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 35,
10 em que o agente terapêutico adicional é selecionado do grupo que consiste em um agente anticâncer; um agente antimetabólico, um agente antidiabético, um agente antiosteoporótico; um antibiótico; um agente anti-inflamatório; um fator de crescimento; e uma citocina.

 38. Anticorpo isolado compreendendo uma primeira seqüência
15 de aminoácido que é uma cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-20, e uma seqüência tendo pelo menos 95 por cento de identidade de seqüência nas regiões de CDR com as regiões de CDR descritas em SEQ ID NOs: 2-20; e uma segunda seqüência de aminoácido que é uma cadeia leve selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21-
20 39, e uma seqüência tendo pelo menos 95 por cento de identidade de seqüência nas regiões de CDR com as regiões de CDR descritas em SEQ ID NOs: 21-39.

 39. Imunoconjugado compreendendo um primeiro componente que é um anticorpo ou fragmento do mesmo de acordo com quaisquer das
25 reivindicações precedentes.

 40. Kit que compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo de acordo com quaisquer das reivindicações precedentes.

 41. Kit de acordo com a reivindicação 40, portanto também compreendendo um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

30 42. Kit de acordo com a reivindicação 40, em que o anticorpo está presente em uma dose de unidade.

 43. Kit de acordo com a reivindicação 40, também compreen-

dendo instruções para uso na administração a um sujeito.

44. Composição compreendendo um anticorpo de anti-DKK1/4 de neutralização.

45. Anticorpo da reivindicação 0, em que o anticorpo liga a DKK1 com um K_{on} de menos que 100 nM, 50 nM, 10nM, 1,0 nM, 500 pM ou 100 pM; e tem uma taxa fora para DKK1 de menos que 10^{-2} por seg, 10^{-3} por seg, 10^{-4} por seg, ou 10^{-5} por seg.

46. Anticorpo da reivindicação 0, em que o anticorpo tem afinidade mais alta de 10^2 - 10^6 para DKK1 ou DKK4 comparado a DKK2 ou DKK3.

47. Anticorpo da reivindicação 0, em que o anticorpo compete com um anti-DKK1/4 de neutralização para ligar a DKK1 ou DKK4.

48. Método de tratar doenças com uma composição compreendendo pelo menos uma seqüência de polipeptídeo de SEQ ID NO: 118 e uma seqüência de polipeptídeo de SEQ ID NO: 119, ou alterações conservadoras ou convertidas em variantes humanas engenheiradas ("human-engineered") das mesmas; em que a composição é um anticorpo de anti-DKK1/DKK4 de neutralização.

49. Método de impedir ou tratar doenças proliferativas ou doenças, tais como um câncer, em um mamífero, particularmente um humano, com uma combinação de agentes farmacêuticos que compreende

(a) uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização; e

(b) um ou mais agentes farmacêuticamente ativos.

A invenção também refere-se às composições farmacêuticas compreendendo:

(a) uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização;

(b) um agente farmacêuticamente ativo; e

(c) um veículo farmacêuticamente aceitável.

A presente invenção também refere-se a um pacote ou produto comercial compreendendo:

(a) uma formulação farmacêutica de uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização; e

(b) uma formulação farmacêutica de um agente farmacêuticamente ativo para uso simultâneo, concorrente, separado ou seqüencial.

50. Método da reivindicação 49, em que o agente farmacêuticamente ativo é significado especialmente qualquer agente farmacêuticamente ativo diferente de uma composição de anti-DKK1/4 de neutralização ou um derivado da mesma, cujo agente é selecionado de:

- i. um inibidor de aromatase;
- ii. um antiestrogênio, um antiandrógeno ou um agonista de gonadorrelina;
- 10 iii. um inibidor de topoisomerase I ou um inibidor de topoisomerase II;
- iv. um agente ativo de microtúbulo, um agente de alquilação, um antimetabólito antineoplástico ou um composto de platina;
- v. um composto de alvejamento/diminuição de uma atividade de proteína ou lipídio cinase ou uma atividade de proteína ou lipídio fosfatase, um composto antiangiogênico também ou um composto que induz processos de diferenciação de célula;
- 15 vi. anticorpos monoclonais;
- vii. um inibidor de ciclooxigenase, um bisfosfonato, um inibidor de heparanase, um modificador de resposta biológica;
- 20 viii. um inibidor de isoformas oncogênicas de Ras;
- ix. um inibidor de telomerase;
- x. um inibidor de protease, um inibidor de metaloproteinase de matriz, um inibidor de metionina aminopeptidase, ou um inibidor de proteassoma;
- 25 xi. agentes usados no tratamento de malignidades hematológicas ou compostos que alvejam, diminuem ou inibem a atividade de Flt-3;
- xii. um inibidor de HSP90;
- xiii. anticorpos antiproliferativos;
- 30 xiv. um inibidor de histona desacetilase (HDAC);
- xv. um composto que alveja, diminui ou inibe a atividade/função de serina/treonina mTOR cinase;

- xvi. antagonista de receptor de somatostatina;
- xvii. um composto antileucêmico;
- xviii. método de dano de células tumorais;
- xix. um aglutinante de EDG;
- 5 xx. um inibidor de ribonucleotídeo reductase;
- xxi. um inibidor de S-adenosilametionina descarboxilase;
- xxii. um anticorpo monoclonal de VEGF ou VEGFR;
- xxiii. terapia fotodinâmica;
- xxiv. um esteróide angiostático;
- 10 xxv. um implante contendo corticosteróides;
- xxvi. antagonista de receptor de AT1; e
- xxvii. um inibidor de ACE.

51. Anticorpo que liga a DKK-1 com uma afinidade (K_D) de 10^{-8} ou menos e compete com quaisquer dos anticorpos da reivindicação 1.

- 15 52. Anticorpo de acordo com a reivindicação 51 que não detectavelmente liga a DKK2 ou DKK3.

53. Anticorpo da reivindicação 52, em que o anticorpo liga a DKK1 ou DKK4 com uma (K_D) de 10^{-3} ou mais alta.

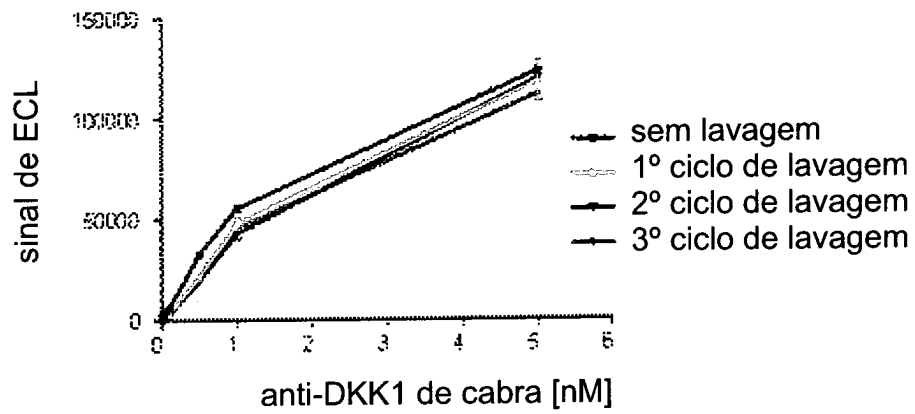


FIG 1

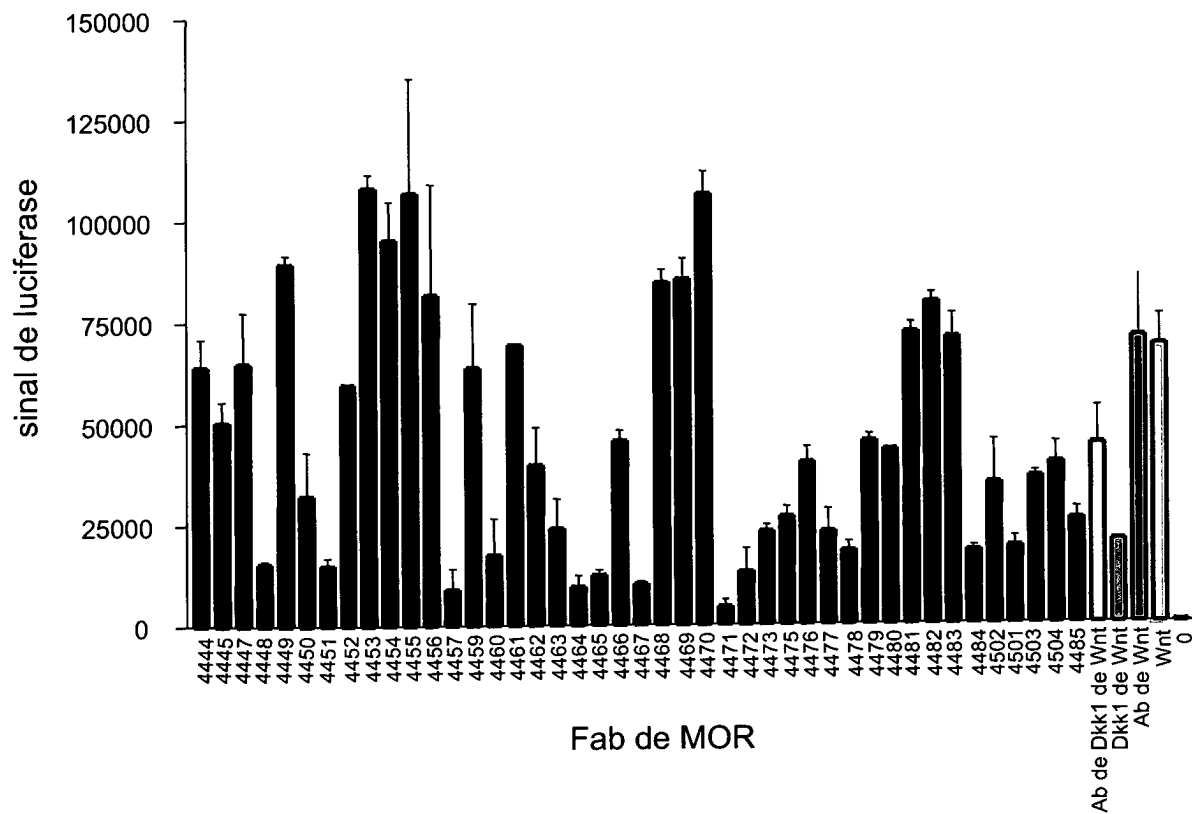


FIG 2

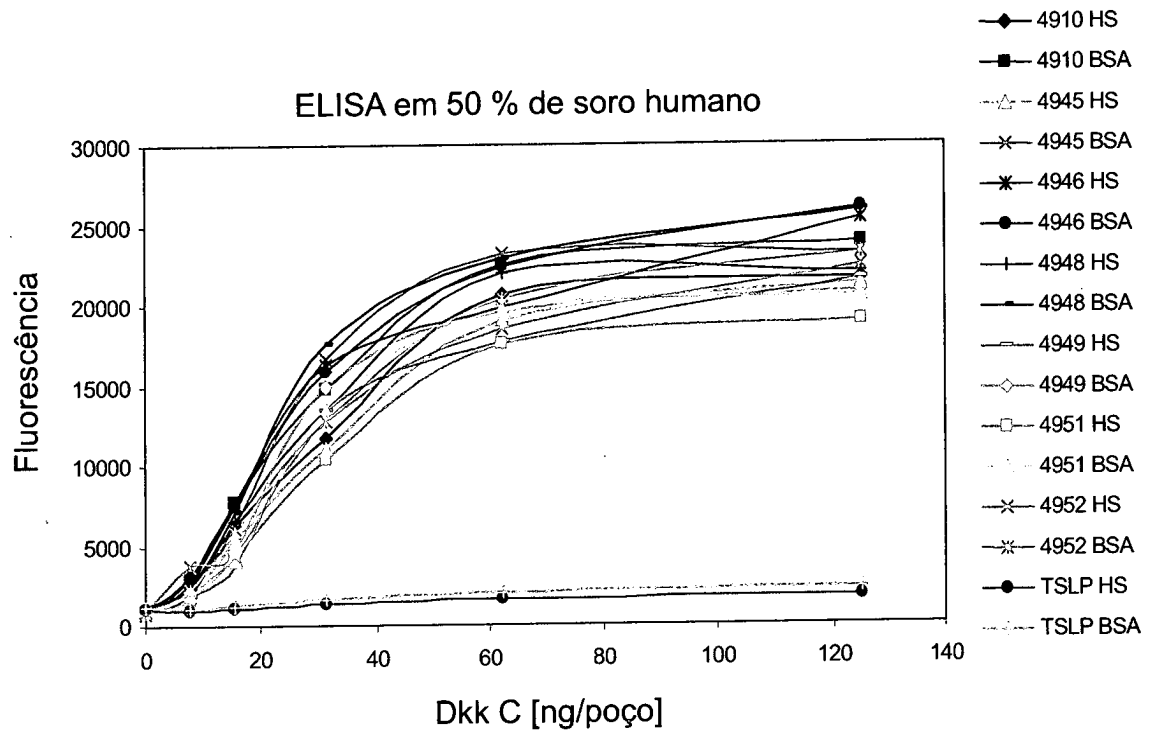


FIG 3

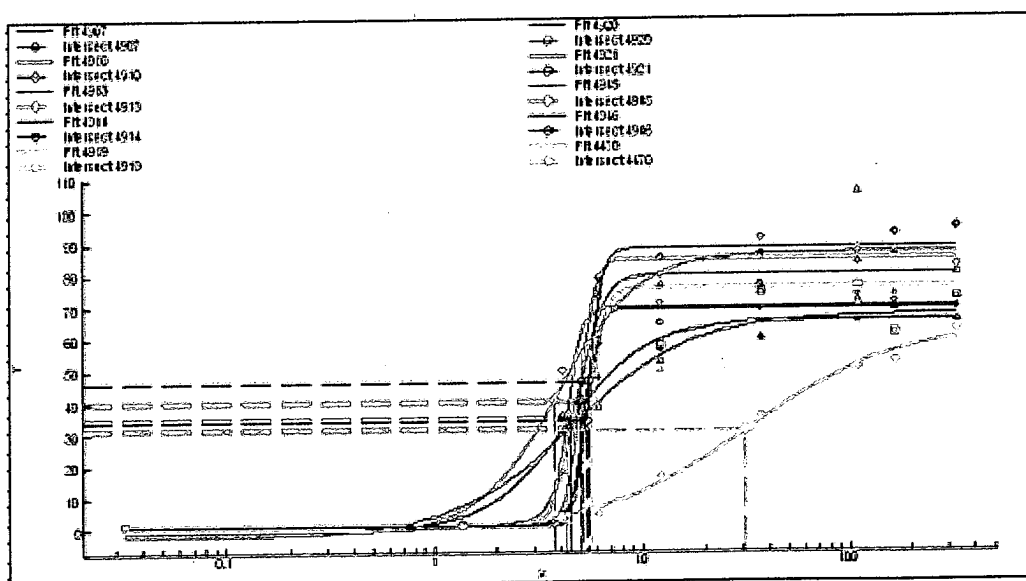


FIG 4

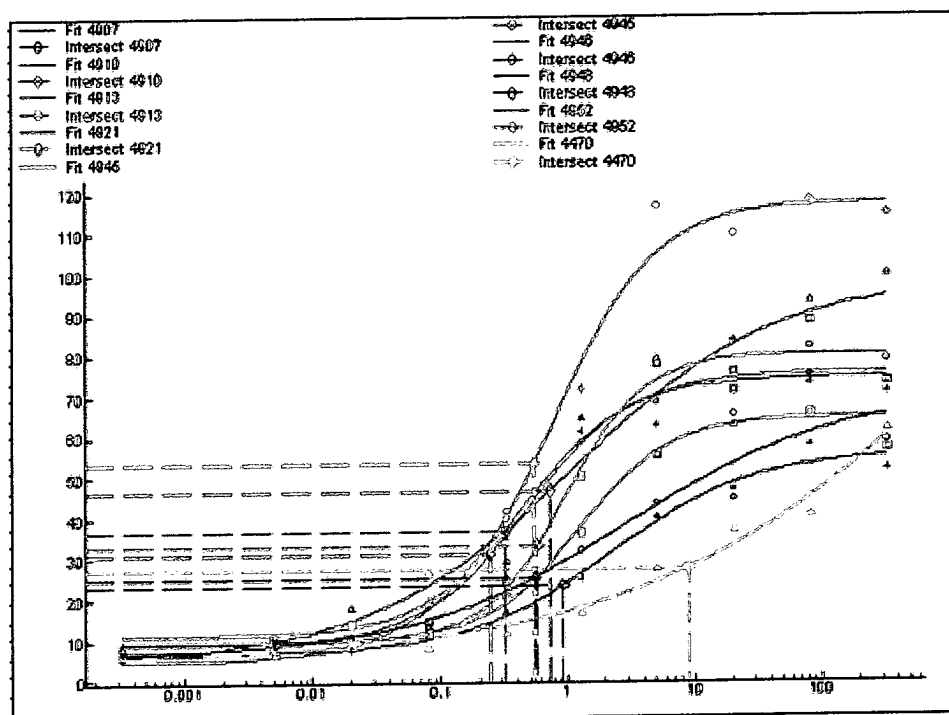


FIG 5

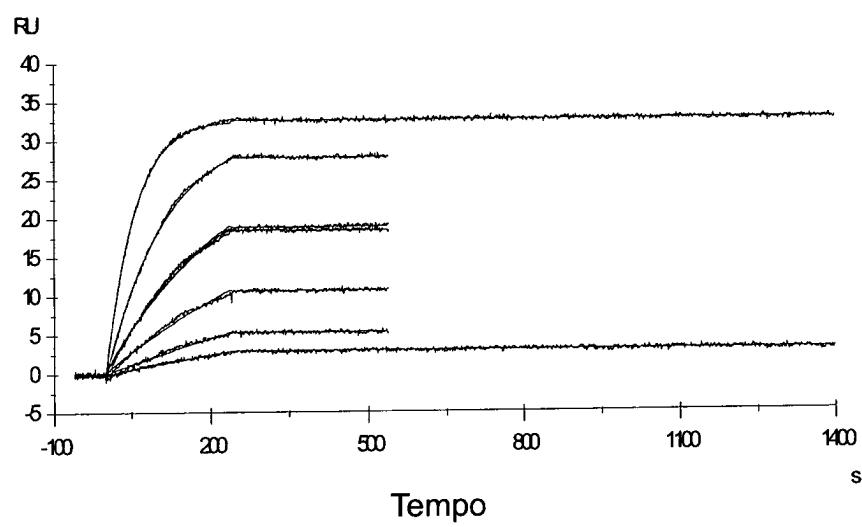


FIG 6A, 6B

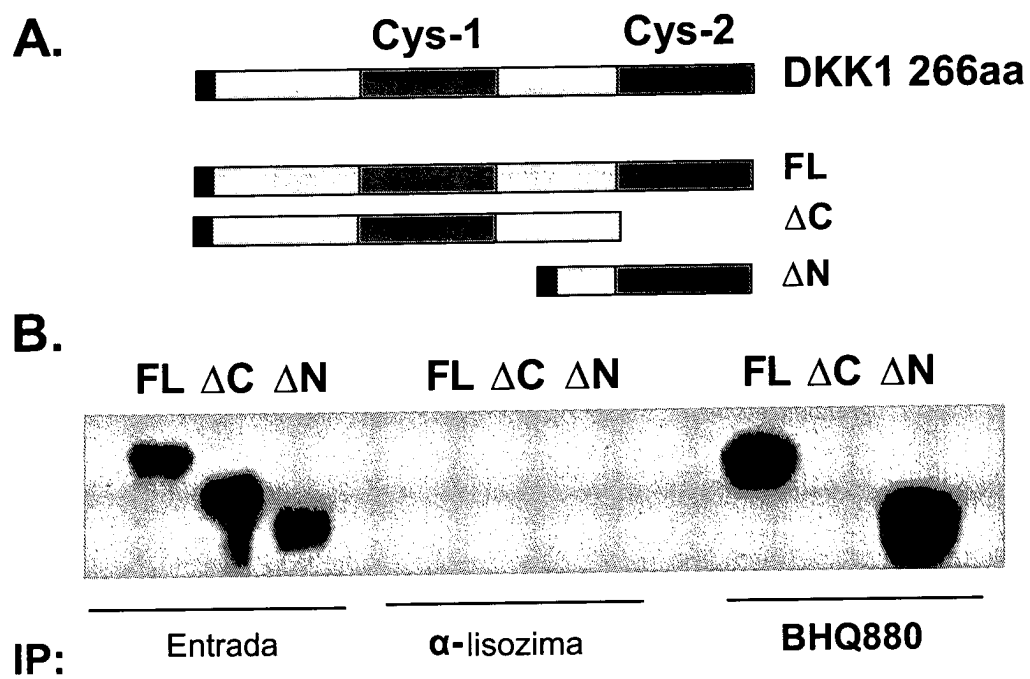


FIG 7

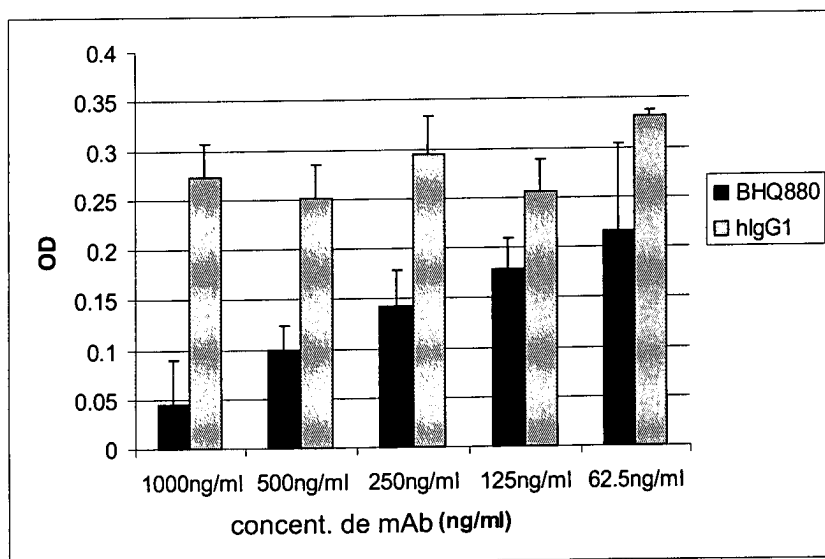


FIG 8

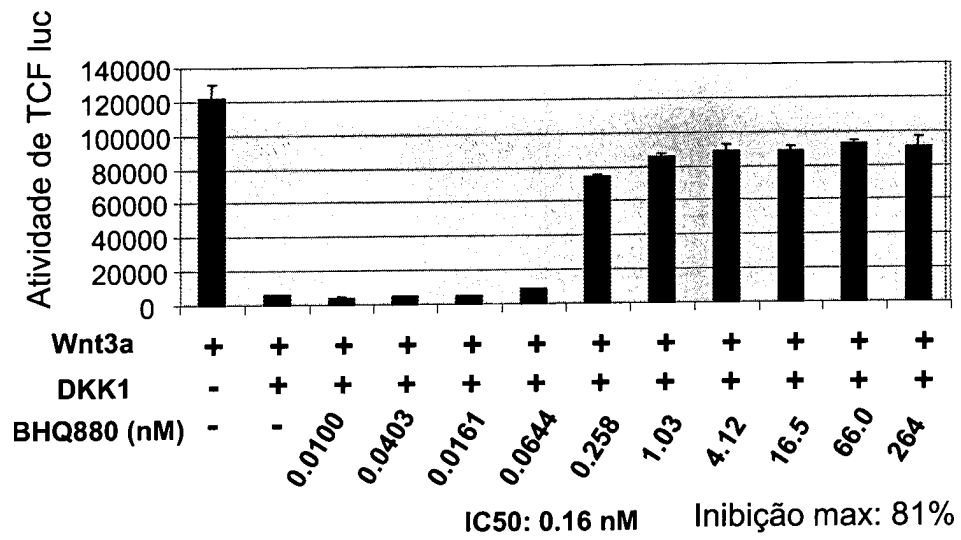


FIG 9

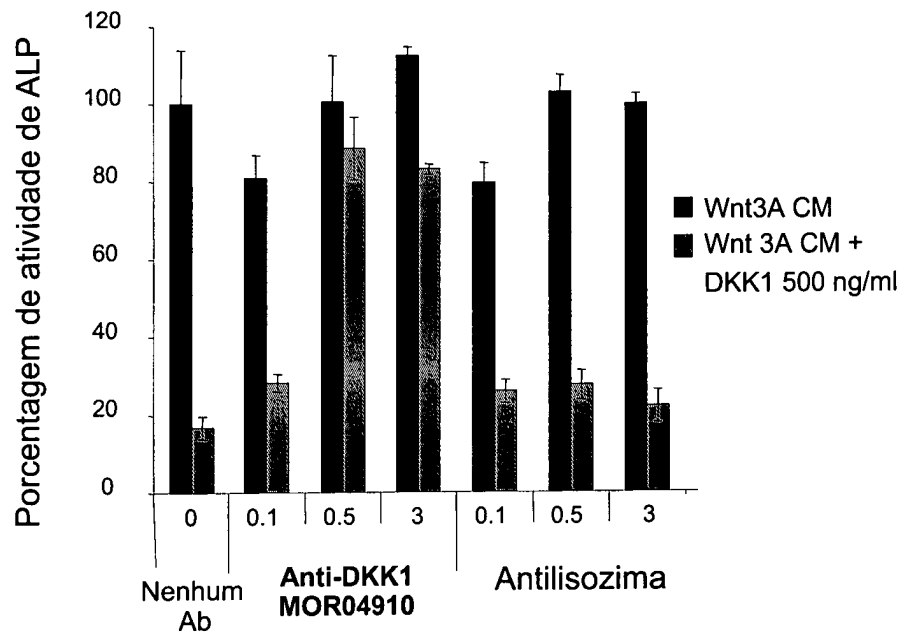


FIG 10

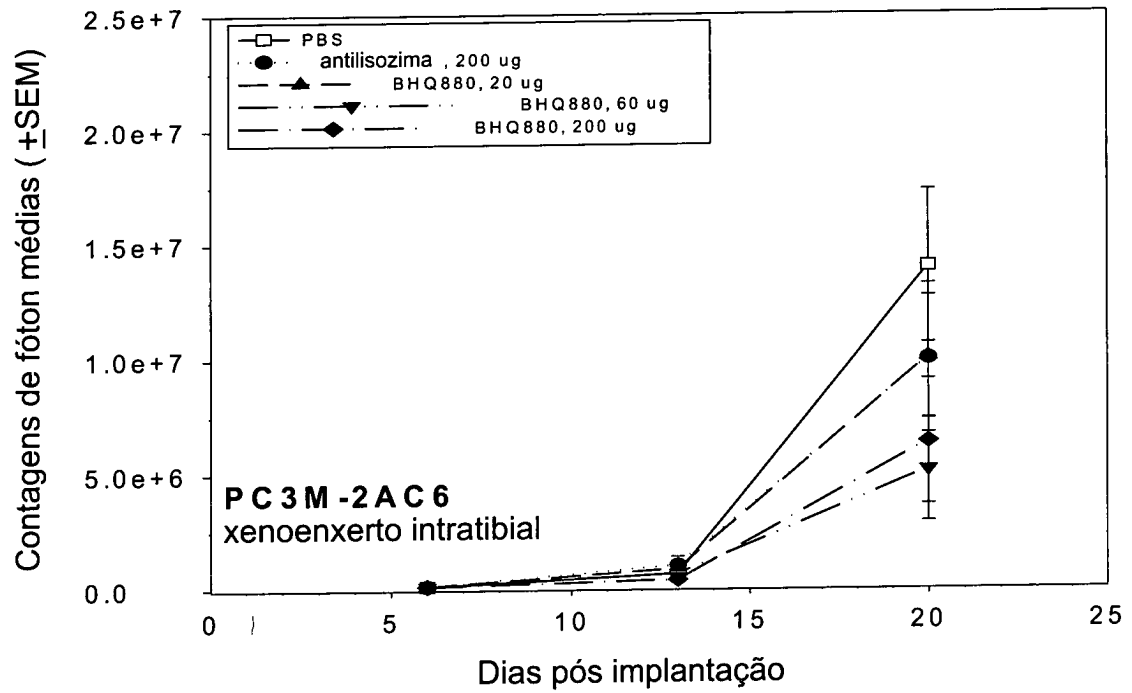


FIG 11

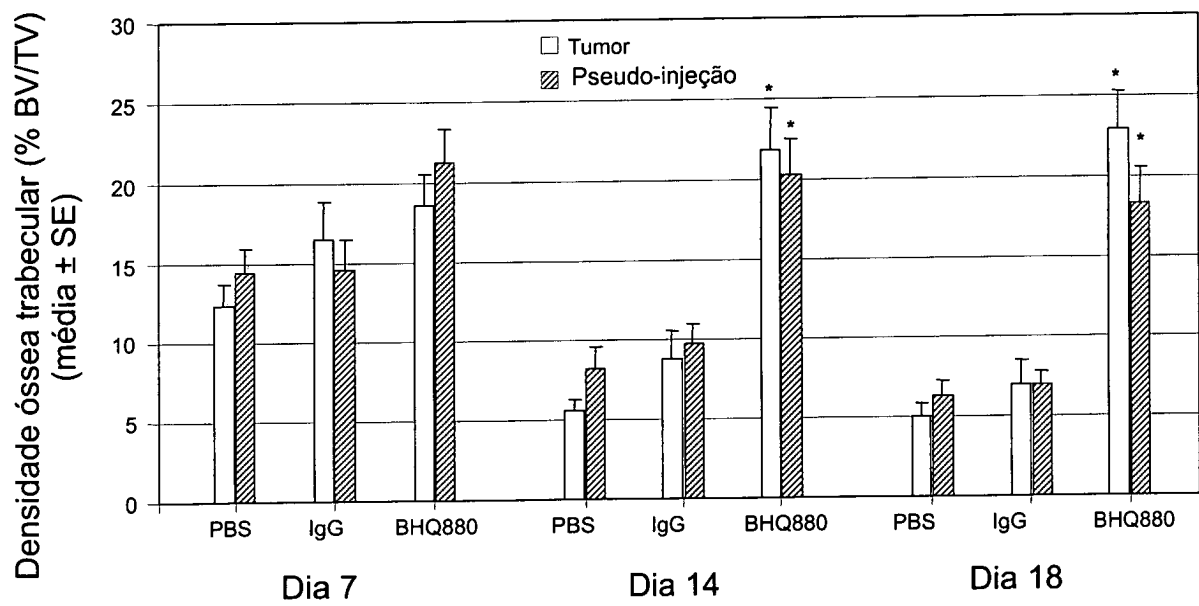


FIG 12

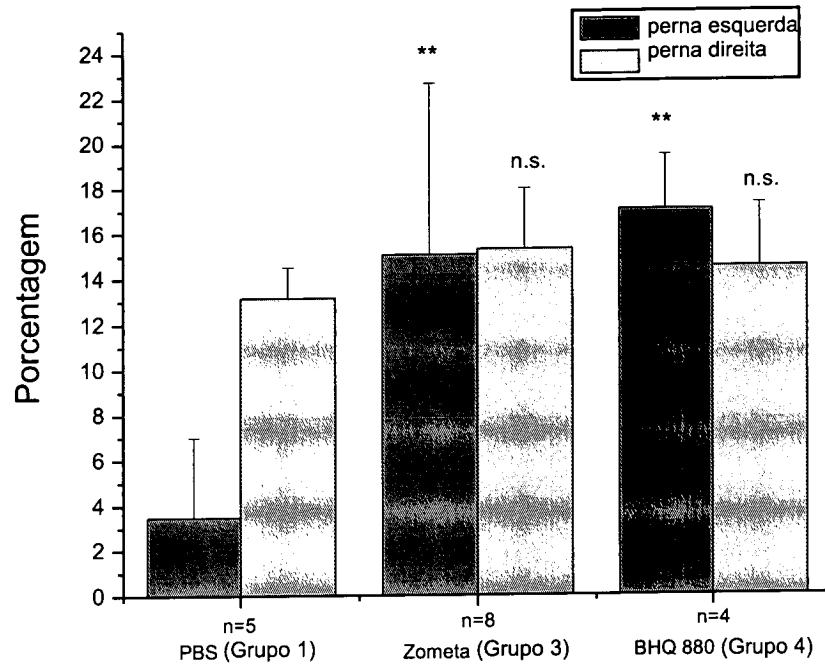


FIG 13

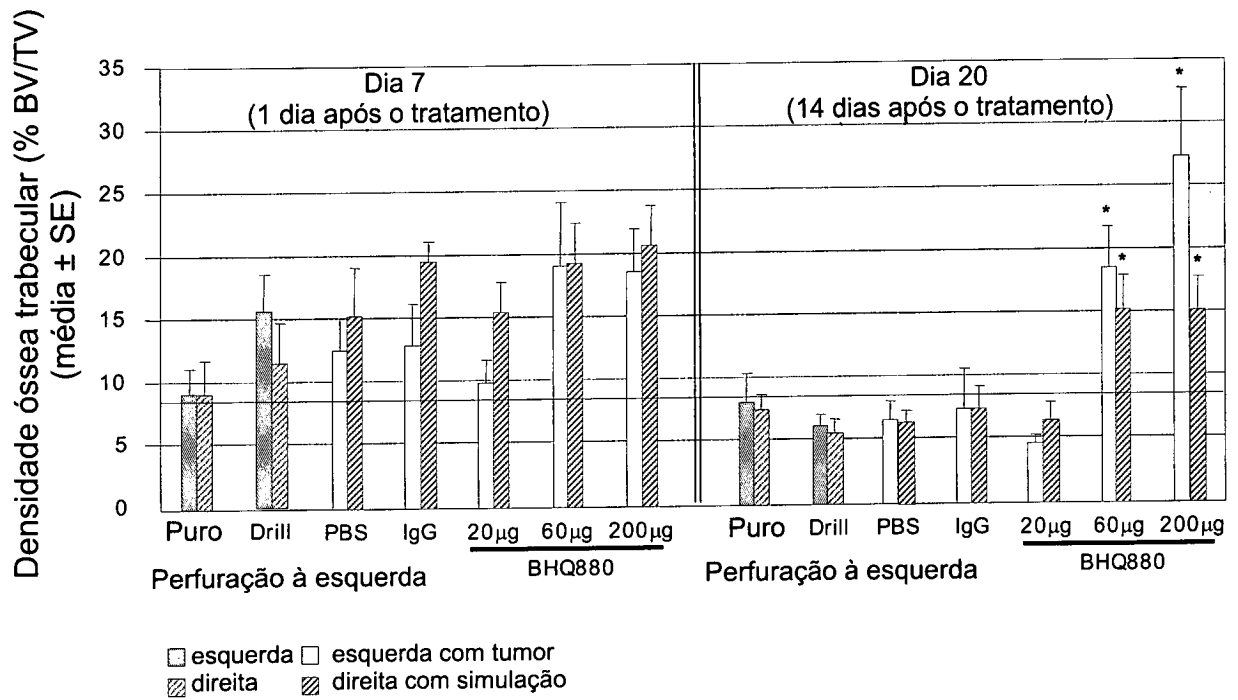


FIG 14

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO PARA ANTICORPOS DE DICKKOPF-1**".

5 A presente invenção refere-se a anticorpos e fragmentos que ligam ao alvo de proteína Dickkopf (DKK1) são fornecidos, como os métodos de uso e kits, para tratar uma célula alvo, em particular, uma célula associada a uma condição osteolítica.