

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 975 587**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01)	A61P 5/00	(2006.01)	A61P 31/08	(2006.01)
A61P 19/08	(2006.01)	A61P 7/06	(2006.01)		
C07K 16/18	(2006.01)	A61P 15/00	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)	A61P 19/00	(2006.01)		
A61P 1/02	(2006.01)	A61P 19/02	(2006.01)		
A61P 1/04	(2006.01)	A61P 19/10	(2006.01)		
A61P 1/16	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)		
A61P 3/00	(2006.01)	A61P 25/08	(2006.01)		
A61P 3/04	(2006.01)	A61P 25/32	(2006.01)		
A61P 3/10	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2008 E 20174310 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2024 EP 3725329**

(54) Título: **Método para inhibir la reabsorción ósea**

(30) Prioridad:

17.09.2007 US 97302407 P

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

09.07.2024

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**PADHI, IAN DESMOND y
JANG, GRAHAM RICHARD**

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 975 587 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para inhibir la reabsorción ósea

- 5 La invención se refiere en general a agentes de unión a esclerostina para la modulación de la densidad ósea.

Antecedentes de la invención

10 La pérdida de contenido mineral del hueso puede estar provocada por una amplia diversidad de afecciones y puede dar como resultado problemas médicos significativos. Por ejemplo, la osteoporosis es una enfermedad debilitante en seres humanos y se caracteriza por reducciones notables de la masa ósea esquelética y la densidad mineral, deterioro estructural del hueso, incluyendo degradación de la microarquitectura del hueso y aumentos correspondientes de la fragilidad ósea (es decir, reducciones de la fuerza ósea), y susceptibilidad a fractura en individuos aquejados. La osteoporosis en seres humanos generalmente está precedida por osteopenia clínica, una
 15 afección hallada en aproximadamente 25 millones de personas en los Estados Unidos. Se ha diagnosticado a otros 7-8 millones de pacientes en los Estados Unidos con osteoporosis clínica. La frecuencia de la osteoporosis en la población humana aumenta con la edad. Entre los caucásicos, la osteoporosis es predominante en mujeres que, en los Estados Unidos, comprenden el 80 % del grupo de pacientes con osteoporosis. La mayor fragilidad y susceptibilidad a fractura del hueso esquelético en las personas mayores se agrava por el mayor riesgo de caídas
 20 accidentales en esta población. Las caderas, muñecas y vértebras fracturadas están entre las lesiones más comunes asociadas con la osteoporosis. Las fracturas de cadera en particular son extremadamente incómodas y caras para el paciente, y para mujeres se correlacionan con altas tasas de mortalidad y morbilidad.

25 Se reconocen los siguientes documentos:

- 25 • un comunicado de prensa de Amgen del 19 de septiembre de 2006 que se refiere a la presentación de "Datos de Denosumab y de Anticuerpos de Esclerostina en la Reunión Anual de la Sociedad Americana para la Investigación Mineral y del Hueso";
- 30 • Li *et al* (2007) J Bone Mineral Research, 22, Suplemento 1: S36, que se refiere al tratamiento con un anticuerpo antiesclerostina que aumenta la masa ósea estimulando directamente la formación del hueso con aumento de la reabsorción del hueso en ratas macho adultas;
- 35 • Padhi *et al* (2007) J Bone Mineral Research, 22: Suplemento: S37, que se refiere a que el anticuerpo antiesclerostina aumenta los marcadores de formación ósea en mujeres postmenopáusicas sanas; y
- Padhi *et al* (2007) Oasis Abstract, que se refiere a que el anticuerpo antiesclerostina aumenta los marcadores de formación ósea en mujeres postmenopáusicas sanas.

40 **Sumario**

La divulgación se refiere a un inhibidor de la esclerostina para su uso en un método para inhibir la reabsorción ósea en seres humanos. El método comprende administrar a un ser humano una cantidad de inhibidor de esclerostina que es eficaz para reducir el nivel de un marcador de reabsorción del hueso y opcionalmente aumentar el nivel de un marcador de formación del hueso. En algunos aspectos, la reabsorción del hueso se inhibe y la formación del hueso se aumenta durante al menos aproximadamente 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 2 meses, 3 meses o más. En aspectos relacionados, la divulgación proporciona un método para el aumento de la densidad mineral del hueso o el tratamiento de un trastorno relacionado con el hueso. La divulgación proporciona además un método para aliviar los efectos de un trastorno relacionado con los osteoclastos. El método comprende administrar a un ser humano un inhibidor de esclerostina que reduce el nivel de un marcador de la reabsorción del hueso en comparación con los niveles del marcador del hueso sin tratamiento. El inhibidor de esclerostina también aumenta el nivel de un marcador de la formación del hueso en al menos aproximadamente 10 % en comparación con niveles del marcador del hueso sin tratamiento. El inhibidor de esclerostina puede administrarse mediante una única dosis o en dosis múltiples. Por ejemplo, el inhibidor de esclerostina puede administrarse en un régimen de terapia a corto plazo, por ejemplo, para aumentar la formación del hueso y/o puede administrarse a largo plazo para prevenir la pérdida de densidad mineral ósea en un régimen terapéutico de mantenimiento.

60 La invención proporciona un anticuerpo antiesclerostina o un fragmento del mismo para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con el hueso mediante el aumento de la densidad mineral ósea en un ser humano, comprendiendo el método administrar al ser humano el anticuerpo antiesclerostina o un fragmento del mismo en una cantidad de 1 mg/kg a 20 mg/kg, donde el anticuerpo antiesclerostina o fragmento del mismo bloquea de forma cruzada la unión a la esclerostina del anticuerpo Ab-4, que tiene una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 137 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 133, o del anticuerpo Ab-13 que tiene una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 209 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 205.

En cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, el nivel de uno o más marcadores de la reabsorción del hueso se reducen al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 30 días, 1 mes, 6 semanas, 2 meses o más, en comparación con los niveles pretratamiento o niveles normales para esa población de pacientes. Como ejemplo no limitante, el nivel del

5 marcador de reabsorción del hueso a las 3 semanas después del tratamiento se reduce en, por ejemplo, al menos
aproximadamente 20 % en comparación con los niveles pretratamiento o niveles normales para esa población de
pacientes. En cualquiera de los métodos precedentes, el nivel del marcador de formación del hueso aumenta en al
menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %,
10 aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %,
aproximadamente 90 %, aproximadamente 100 % o más durante al menos aproximadamente 2 semanas, 3
semanas, 30 días, 1 mes, 6 semanas, 2 meses o más, en comparación con los niveles pretratamiento o los niveles
normales para esa población de pacientes. Como ejemplo no limitante, el nivel del marcador de formación del hueso
15 a las 3 semanas después del tratamiento aumenta, por ejemplo, en al menos aproximadamente 20 % en
comparación con los niveles pretratamiento o los niveles normales para esa población de pacientes. En un aspecto
ejemplar, el marcador de la reabsorción del hueso es el nivel en suero del telopéptido C de colágeno de tipo I (CTX).
En otros aspectos ejemplares, el marcador de la formación de hueso es fosfatasa alcalina específica de hueso
(BSAP), osteocalcina (OstCa) y/o extensión N terminal de procolágeno de tipo 1 (P1NP).

La divulgación también proporciona un método para tratar un trastorno relacionado con el hueso, donde el método
20 comprende administrar a un ser humano una o más cantidades de un inhibidor de esclerostina eficaces para
aumentar la densidad mineral del hueso para el cuerpo total (por ejemplo, cabeza, tronco, brazos y piernas) o en la
cadera (por ejemplo, cadera total y/o cuello femoral), columna (por ejemplo, columna lumbar), muñeca, dedo, tibia
y/o talón en aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %,
25 aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente
12 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 % o 30 % o
más. En algunos aspectos, la densidad mineral del hueso del ser humano antes del tratamiento es característica de
la osteoporosis u osteopenia, y una o más dosis del inhibidor de esclerostina se administran en una cantidad y
30 durante un tiempo eficaz para mejorar la densidad mineral del hueso de modo que la densidad mineral del hueso ya
no sea característica de la osteoporosis y/u osteopenia. Por ejemplo, puede administrarse una o más dosis durante
un periodo de tiempo inicial para aumentar la densidad mineral del hueso en 2,5, o una, desviaciones típicas de la
densidad normal para un adulto joven (es decir, una puntuación $T \geq -2,5$ o una puntuación $T \geq -1$, como se definen
posteriormente). En aspectos ejemplares, el periodo de tiempo inicial es de aproximadamente 3 meses o menos, 6
meses o menos, 9 meses o menos, 1 año o menos, 18 meses o menos, o más. El método puede comprender
35 además administrar posteriormente una o más cantidades de un inhibidor de esclerostina eficaz para mantener la
densidad mineral del hueso, opcionalmente durante un periodo de tiempo de mantenimiento de al menos
aproximadamente 6 meses, 1 año, 2 años o más (por ejemplo, durante el tiempo de vida del sujeto).

La divulgación proporciona además un método para tratar un trastorno relacionado con el hueso en un ser humano
mediante la administración de una o más dosis de entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg o de
40 aproximadamente 0,1 a aproximadamente 12 mg/kg o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 12 mg/kg o de
aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 mg/kg o de
aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg/kg o de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 mg/kg. En algunos
45 aspectos, pueden administrarse dosis a un intervalo de aproximadamente una vez cada 2 semanas o más, una vez
cada mes o más, una vez cada 2 meses o más, una vez cada 3 meses o más, una vez cada 4 meses o más, una
vez cada 5 meses o más, una vez cada 6 meses o más, una vez cada 9 meses o más o una vez cada año o más. El
inhibidor de esclerostina puede usarse en la preparación de un medicamento para administración usando cualquiera
50 de los regímenes de dosificación y temporización descritos en el presente documento. Opcionalmente, el inhibidor
de esclerostina se presenta en un recipiente, tal como un frasco de dosis única o multidosis, que contiene una dosis
del inhibidor de esclerostina para administración (por ejemplo, de aproximadamente 70 a aproximadamente 450 mg
de inhibidor de esclerostina). En un aspecto ejemplar, un frasco puede contener aproximadamente 70 mg o 75 mg
55 de inhibidor de esclerostina, por ejemplo, anticuerpo antiesclerostina, y sería adecuado para administrar una única
dosis de aproximadamente 1 mg/kg. En otros aspectos, un frasco puede contener aproximadamente 140 mg o
150 mg; aproximadamente 210 mg, 220 mg o 250 mg; aproximadamente 280 mg, 290 mg o 300 mg;
aproximadamente 350 mg o 360 mg; o aproximadamente 420 mg, 430 mg, 440 mg o 450 mg de inhibidor de
esclerostina.

Adicionalmente, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno relacionado con el hueso en un ser
humano que padece o está en riesgo de hipocalcemia o hipercalcemia, un ser humano en el que el tratamiento con
una hormona paratiroidea o análogo de la misma está contraindicado, o un ser humano en el que el tratamiento con
60 un bifosfonato está contraindicado. El método comprende administrar al ser humano una cantidad de inhibidor de
esclerostina eficaz para aumentar el nivel de un marcador de la formación del hueso y/o reducir el nivel de un
marcador de la reabsorción del hueso, sin dar como resultado hipocalcemia o hipercalcemia (por ejemplo,
hipocalcemia o hipercalcemia clínicamente significativa).

65 La divulgación también proporciona un método para controlar la terapia antiesclerostina, es decir, la respuesta
fisiológica a un inhibidor de esclerostina. El método comprende las etapas de administrar una o más dosis de un

- inhibidor de esclerostina, y detectar el nivel de uno o más marcadores de la reabsorción del hueso, donde una reducción de al menos aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 % o más en el nivel de un marcador de la reabsorción del hueso, en comparación con niveles pretratamiento o niveles normales para esa población de pacientes, es indicativa de tratamiento eficaz. El método comprende además opcionalmente la etapa de detectar el nivel de uno o más marcadores de la formación del hueso, donde un aumento de al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 % en el nivel de un marcador de la formación del hueso, en comparación con niveles pretratamiento o niveles normales para esa población de pacientes, es indicativo de tratamiento eficaz. En determinados aspectos, el aumento en los niveles de marcador de formación del hueso es de aproximadamente 20 %. El método puede comprender además la etapa de ajustar la dosis de un inhibidor de esclerostina a una cantidad diferente, por ejemplo, mayor si el cambio en la reabsorción del hueso y/o formación del hueso es menor que el deseado, o menor si el cambio en la reabsorción del hueso y/o formación del hueso es mayor que el deseado.
- En un aspecto diferente, la divulgación proporciona inhibidores de esclerostina seleccionados que reducen el nivel de un marcador de la reabsorción del hueso en al menos aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 % o más y aumentar el nivel de un marcador de la formación del hueso en al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 100 %, o más, durante al menos aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 10 semanas o aproximadamente 3 meses. En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un método para seleccionar dichos inhibidores de esclerostina administrando un inhibidor de esclerostina candidato a un animal y seleccionando un inhibidor de esclerostina candidato que cambie el nivel de un marcador de la reabsorción del hueso y/o formación en el grado deseado.
- En cualquiera de los métodos o aspectos anteriores de la divulgación, el inhibidor de esclerostina puede ser un agente de unión a esclerostina. Se contempla específicamente el uso de agentes de unión a esclerostina desvelados en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747, por ejemplo, en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento o para la preparación de medicamentos para su administración de acuerdo con cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento. A este respecto, la divulgación incluye el uso de un agente de unión a esclerostina en la preparación de un medicamento para inhibir la reabsorción del hueso en una cantidad de 1 mg/kg a 5 mg/kg, donde la cantidad es eficaz para producir el nivel en suero de telopeptido C de colágeno de tipo I (CTX) en al menos 20 %, en comparación con los niveles pretratamiento o normales, en 3 semanas después de comenzar el tratamiento. La divulgación también incluye el uso de un agente de unión a esclerostina en la preparación de un medicamento para aumentar la densidad mineral del hueso en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, donde la cantidad es eficaz para (a) reducir el nivel en suero de CTX en al menos 20 % en comparación con niveles pretratamiento o normales, en 3 semanas después de comenzar el tratamiento, y (b) aumentar el nivel en suero de un marcador de la formación del hueso seleccionado del grupo que consiste en el nivel en suero de la fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP), nivel en suero de la extensión amino terminal del péptido de procolágeno de tipo 1 (PINP) y el nivel en suero de osteocalcina (OstCa), en al menos 20 %, en comparación con los niveles pretratamiento o normales, en 3 semanas después de comenzar el tratamiento.
- La divulgación incluye además el uso de un agente de unión a esclerostina en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con el hueso en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg durante un primer periodo de tiempo, donde la cantidad es eficaz para aumentar la densidad mineral del hueso en la cadera, columna, muñeca, dedo, tibia y/o talón en al menos aproximadamente 3 %, seguido de una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg durante un segundo periodo de tiempo eficaz para mantener la densidad mineral del hueso. También se contempla el uso de un agente de unión a esclerostina en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con el hueso en un ser humano que padece o está en riesgo de hipocalcemia o hipercalcemia en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, así como el uso de un agente de unión a esclerostina en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con el hueso en (a) un ser humano en el que el tratamiento con una hormona paratiroidea o análogo de la misma está contraindicado o (b) un ser humano en el que el tratamiento con bifosfonato está contraindicado.
- La divulgación también incluye recipientes que comprenden anticuerpo antiesclerostina o fragmento del mismo. En un aspecto, el recipiente comprende anticuerpo antiesclerostina o fragmento del mismo e instrucciones para administrar el anticuerpo o fragmento del mismo en una cantidad eficaz para (a) reducir el nivel en suero del telopeptido C de colágeno de tipo I (CTX) en al menos 20 %, en comparación con los niveles pretratamiento o normales, a las 3 semanas después de comenzar el tratamiento, y (b) aumentar el nivel en suero de fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP), el nivel en suero de la extensión amino terminal del péptido de procolágeno de tipo 1 (PINP), o el nivel en suero de osteocalcina (OstCa), en al menos 20 %, en comparación con los niveles

5 pretratamiento o normales, a las 3 semanas después de comenzar el tratamiento. Como alternativa o además, el recipiente comprende una cantidad de anticuerpo antiesclerostina de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 450 mg. La divulgación proporciona además un recipiente que comprende anticuerpo antiesclerostina o fragmento del mismo e instrucciones para administrar el anticuerpo o fragmento del mismo para tratar un trastorno relacionado con el hueso en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg cada dos o cuatro semanas. Además, la divulgación proporciona un recipiente que comprende anticuerpo antiesclerostina o fragmento del mismo e instrucciones para administrar el anticuerpo o fragmento del mismo para tratar un trastorno relacionado con el hueso en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg durante un periodo de 10 aproximadamente 3 meses.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 es una gráfica del porcentaje de cambio de los niveles de la extensión N terminal de procolágeno de tipo 1 (P1NP) en comparación con los niveles de P1NP de línea basal y placebo frente al tiempo (día) después de la administración de diversas dosis individuales de un agente de unión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas, sanas.

20 La Figura 2 es una gráfica del porcentaje de cambio de los niveles de fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP) en comparación con los niveles de BSAP de línea basal y placebo frente al tiempo (día) después de la administración en diversas dosis individuales de un agente de unión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas, sanas.

25 La Figura 3 es una gráfica del porcentaje de cambio de los niveles de osteocalcina en comparación con los niveles de osteocalcina de línea basal y placebo frente al tiempo (día) después de la administración de diversas dosis individuales de un agente de unión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas sanas.

30 La Figura 4 es una gráfica del porcentaje de cambio de los niveles del telopeptido C terminal de colágeno de tipo 1 (CTX) en suero en comparación con los niveles de CTX en suero de línea basal y placebo frente al tiempo (día) después de la administración de diversas dosis individuales de un agente de unión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas sanas.

35 La Figura 5 son gráficas del porcentaje de cambio de los niveles de osteocalcina, BSAP, P1NP y CTX en comparación con los niveles de línea basal y placebo frente al tiempo (día) después de la administración de una única dosis de 5 mg/kg o 10 mg/kg del agente de unión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas, sanas.

40 La Figura 6 es una gráfica del porcentaje de cambio de los niveles de calcio en suero en comparación con los niveles de calcio en suero de línea basal y placebo frente al tiempo (día) después de la administración de diversas dosis individuales de un agente de unión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas sanas.

45 La Figura 7 son gráficas del porcentaje de cambio de la densidad mineral ósea en comparación con línea basal y placebo frente al tiempo (día) después de la administración de diversas dosis individuales de agente de unión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas, sanas.

Descripción detallada de la invención

50 La invención está basada, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que el bloqueo o la inhibición de la actividad biológica de la esclerostina humana desencadena múltiples respuestas fisiológicas ligadas al aumento de la densidad mineral del hueso (BMD), incluyendo inhibición significativa de la reabsorción del hueso. La mayoría de las terapias disponibles actualmente inhiben solamente la reabsorción del hueso sin aumentar la formación del hueso. Algunas terapias disponibles en la actualidad para trastornos asociados con BMD reducida solamente aumentan la formación del hueso sin reducir significativamente la reabsorción del hueso. Por ejemplo, cuando se desencadena formación del hueso por algunos fármacos actuales, también puede aumentar la reabsorción del hueso (aunque potencialmente a una tasa menor que antes de la terapia). Por el contrario, los agentes que interfieren con la actividad de esclerostina potencian la formación del hueso y reducen la reabsorción del hueso. En otras palabras, los inhibidores de esclerostina "desacoplan" la formación del hueso y la reabsorción del hueso para construir hueso más eficazmente. La invención es superior a las terapias existentes cuya eficacia terapéutica es limitada y que van acompañadas por efectos secundarios adversos potencialmente graves.

55 A este respecto, la divulgación proporciona la inhibición de la reabsorción del hueso, por ejemplo, reabsorción del hueso mediada por osteoclastos, células óseas que disuelven matrices minerales óseas. La divulgación proporciona además un método para aliviar los efectos de un trastorno relacionado con osteoclastos, es decir, un trastorno provocado por actividad de osteoclastos aumentada de forma anómala que, en algunos aspectos, se manifiesta como reabsorción del hueso anormalmente alta. El método comprende administrar a un ser humano una cantidad de agente de unión a esclerostina que reduce el nivel de un marcador de reabsorción ósea y opcionalmente aumenta el 60 nivel de un marcador de formación de hueso.

- La actividad de un inhibidor de esclerostina, por ejemplo, un agente de unión a esclerostina (descrito adicionalmente posteriormente) puede medirse de diversas maneras. Los aumentos del contenido mineral del hueso o la densidad ósea mediados por agente de unión a esclerostina pueden medirse usando absorciometría de rayos X de energía individual y doble, ultrasonidos, tomografía computarizada, radiografía y formación de imágenes por resonancia magnética. La cantidad de masa ósea también puede calcularse a partir de los pesos corporales o usando otros métodos (véase *Guinness-Hey, Metab. Bone Dis. Relat. Res.*, 5: 177-181 (1984)). Se usan animales y modelos animales particulares en la técnica para ensayar el efecto de las composiciones y métodos farmacéuticos en, por ejemplo, parámetros de pérdida de hueso, reabsorción del hueso, formación del hueso, fuerza ósea o mineralización del hueso que imitan condiciones de enfermedad humana tales como osteoporosis y osteopenia. Los ejemplos de dichos modelos incluyen el modelo de rata ovariectomizada (*Kalu, Bone and Mineral*, 15:175-192 (1991); *Frost y Jee, Bone and Mineral*, 18: 227-236 (1992); y *Jee y Yao, J. Musculoskel. Neuron. Interact.*, 1: 193-207 (2001)). Los métodos para medir la actividad del agente de unión a esclerostina descritos en el presente documento también pueden usarse para determinar la eficacia de otros inhibidores de esclerostina.
- En seres humanos, la densidad mineral ósea puede determinarse clínicamente usando absorciometría de rayos x doble (DXA) de, por ejemplo, la cadera y la columna. Otras técnicas incluyen tomografía computarizada cuantitativa (QCT), ultrasonografía, absorciometría de rayos X de energía individual (SXA) y absorciometría radiográfica. Los sitios esqueléticos centrales comunes para medición incluyen la columna y la cadera; los sitios periféricos incluyen el antebrazo, el dedo, la muñeca y el talón. Excepto para ultrasonografía, la Asociación Médica Americana indica que las técnicas de BMD típicamente implican el uso de rayos x y se basan en el principio de que la atenuación de la radiación depende del grosor y composición de los tejidos en la ruta de la radiación. Todas las técnicas implican la comparación de los resultados con una base de datos normativa.
- Como alternativa, puede calibrarse una respuesta fisiológica a uno o más agentes de unión a esclerostina controlando los niveles de marcador de hueso. Los marcadores de hueso son productos creados durante el proceso de remodelación del hueso y se liberan por el hueso, osteoblastos y/u osteoclastos. Las fluctuaciones en los niveles de "marcadores" de reabsorción del hueso y/o formación del hueso implican cambios en la remodelación/modelación del hueso. La Fundación de la Osteoporosis Internacional (IOF) recomienda usar marcadores del hueso para controlar las terapias de densidad del hueso (véase, por ejemplo, *Delmas et al., Osteoporos Int., Supl. 6: S2-17 (2000)*). Los marcadores indicativos de la reabsorción del hueso (o actividad de osteoclastos) incluyen, por ejemplo, telopéptido C (por ejemplo, telopéptido C terminal de colágeno de tipo 1 (CTX) o telopéptido C reticulado en suero), telopéptido N (telopéptido N terminal de colágeno de tipo 1 (NTX)), desoxipiridinolina (DPD), piridinolina, hidroxiprolina urinaria, galactosil hidroxilisina y fosfatasa ácida resistente a tartrato (por ejemplo isoforma 5b de fosfatasa ácida resistente a tartrato en suero). Los marcadores de formación/mineralización del hueso incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP), péptidos liberados de la extensión N y C terminal del procolágeno de tipo I (P1NP, PICP) y osteocalcina (OstCa). Están disponibles en el mercado varios kits para detectar y cuantificar marcadores en muestras clínicas, tales como orina y sangre.
- Tras su administración, el agente de unión a esclerostina reduce preferentemente el nivel de uno o más marcadores de la reabsorción del hueso, tales como el nivel en suero del telopéptido C de colágeno de tipo I (CTX). Por consiguiente, la divulgación proporciona además un método para controlar la terapia antiesclerostina, es decir, la respuesta fisiológica a un agente de unión a esclerostina u otro inhibidor de esclerostina. El método comprende administrar un agente de unión a esclerostina, después medir el nivel de uno o más marcadores de la reabsorción del hueso. Además, el método puede comprender medir el nivel de uno o más marcadores de la formación del hueso antes de la administración de un agente de unión a esclerostina. El nivel del marcador de reabsorción del hueso durante y/o después del tratamiento con el agente de unión a esclerostina puede compararse con un nivel pretratamiento, o como alternativa puede compararse con un intervalo convencional típico de esa población de pacientes. Un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente un intervalo convencional adecuado ensayando un número representativo de pacientes de edad, sexo, nivel de enfermedad y/u otras características de la población de pacientes similares. El nivel del marcador de reabsorción del hueso puede reducirse en al menos aproximadamente 5 % (por ejemplo, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 % o aproximadamente 30 %) por una única dosis de agente de unión a esclerostina. En algunos aspectos, la dosis del agente de unión a esclerostina reduce el nivel del marcador de reabsorción del hueso al menos aproximadamente 40 % (por ejemplo, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 % o aproximadamente 70 %) en comparación con el nivel del marcador de reabsorción del hueso antes de administrar el agente de unión a esclerostina. Además, el nivel del marcador de reabsorción del hueso puede reducirse durante al menos aproximadamente 3 días (por ejemplo, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas o aproximadamente 3 meses) después de la administración de una única dosis del agente de unión a esclerostina.

Además de reducir el nivel de marcadores de reabsorción del hueso, la cantidad de agente de unión a esclerostina administrada a un paciente también puede aumentar el nivel de uno o más marcadores de la formación del hueso, tales como el nivel en suero de BSAP, el nivel en suero de P1NP, y/o el nivel en suero de OstCa. Una dosis individual de agente de unión a esclerostina puede aumentar el nivel de un marcador de formación del hueso, por ejemplo, en al menos aproximadamente 5 % (por ejemplo, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 % o

aproximadamente 30 %). En algunos aspectos, la dosis de agente de unión a esclerostina eleva el nivel de un marcador de formación del hueso al menos aproximadamente 40 % (por ejemplo, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 % o aproximadamente 70 %). En otros aspectos, la dosis de agente de unión a esclerostina aumenta el nivel de uno o más marcadores de formación del hueso en al menos aproximadamente 75 % (por ejemplo, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 100 % o aproximadamente 110 %). En otros aspectos más, la dosis de agente de unión a esclerostina aumenta el nivel de un marcador de formación del hueso en al menos aproximadamente 120 % (por ejemplo, aproximadamente 130 %, aproximadamente 140 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 160 % o aproximadamente 170 %). En aspectos alternativos, el agente de unión a esclerostina aumenta el nivel de un marcador de formación del hueso en al menos aproximadamente 180 % (por ejemplo, aproximadamente 190 % o aproximadamente 200 %). Los niveles de marcadores de formación del hueso idealmente permanecen elevados (en comparación con los niveles de marcadores de formación del hueso pretratamiento o con un intervalo convencional típica de esa población de pacientes) durante al menos aproximadamente 3 días (por ejemplo, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas o aproximadamente 3 meses) después de la administración de una dosis individual del agente de unión a esclerostina.

La divulgación también proporciona un método para aumentar la densidad mineral del hueso (BMD), donde se administra a un ser humano una cantidad del agente de unión a esclerostina que (a) reduce el nivel de un marcador de la reabsorción del hueso y (b) aumenta el nivel de un marcador de la formación del hueso. La BMD generalmente se correlaciona con fragilidad esquelética y osteoporosis. Típicamente, la BMD puede medirse en "cuerpo total" (por ejemplo, cabeza, tronco, brazos y piernas) o en la cadera (por ejemplo, cadera total y/o cuello femoral), columna (por ejemplo, columna lumbar), muñeca, dedo, tibia y/o talón. En el diagnóstico de osteoporosis, se compara la BMD de un paciente con la densidad pico de un adulto sano de 30 años de edad (es decir, un "adulto joven"), creando la llamada "puntuación T". La BMD de un paciente también puede compararse con una densidad del hueso "de edad coincidente" (véase, por ejemplo, el Grupo Científico de la Organización Mundial de la Salud para la Prevención y el Tratamiento de Osteoporosis, "Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific Group". WHO Technical Report Series; 921, Ginebra, Suiza (2000)). La diferencia entre la BMD de un paciente y la de un adulto joven, sano se indica convencionalmente en términos del múltiplo de una "desviación típica", que típicamente equivale de aproximadamente 10 % a aproximadamente 12 % de reducción de la densidad ósea. La Organización Mundial de la Salud ha propuesto cuatro categorías de diagnóstico basándose en las puntuaciones T de BMD. Un valor de BMD dentro de una desviación típica de la media de referencia de adulto joven (puntuación T ≥ -1) es "normal". La masa ósea baja (osteopenia) se indica por un valor de BMD de más de una desviación típica por debajo de la media de adulto joven, pero menos de 2 desviaciones típicas (puntuación T < -1 y $> -2,5$). Una puntuación T de más de 2,5 desviaciones típicas por debajo de la norma apoya un diagnóstico de osteoporosis. Sin un paciente padece adicionalmente una o más fracturas de fragilidad, el paciente se clasifica como con osteoporosis grave.

El inhibidor de esclerostina, por ejemplo, un agente de unión a esclerostina puede administrarse a un paciente para mejorar la densidad mineral del hueso independientemente de la puntuación T del paciente. El agente de unión a esclerostina puede administrarse a una dosis y durante un periodo de tiempo eficaz para aumentar la BMD en el paciente en al menos aproximadamente 1 % (aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 % o aproximadamente 6 %). En algunos aspectos, la BMD aumenta en al menos aproximadamente 8 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 15 % o aproximadamente 18 %). En otros aspectos, la BMD se aumenta por el agente de unión a esclerostina al menos aproximadamente 20 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 22 %, aproximadamente 25 % o aproximadamente 28 %) en la cadera, columna, muñeca, dedo, tibia y/o talón. En otros aspectos más, la BMD aumenta al menos aproximadamente 30 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 32 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 38 % o aproximadamente 40 %). En otras palabras, la BMD puede aumentarse al intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 desviaciones típicas (preferentemente un intervalo de aproximadamente 0 a aproximadamente 1 desviación típica) por debajo de la BMD normal de un adulto joven sano.

Las alteraciones en la remodelación del hueso pueden conducir a fluctuaciones en las concentraciones minerales en todo el cuerpo. El hueso es uno de los principales reguladores de los niveles de calcio en el torrente sanguíneo. La reabsorción de hueso mediada por osteoblastos libera calcio almacenado a la circulación sistémica, mientras que la formación de hueso mediada por osteoblastos retira calcio de la circulación para incorporarlo en el tejido óseo. En la remodelación de hueso normal, estos procesos ciclan para mantener el hueso sano, fuerte y mantener niveles de calcio libre de aproximadamente 8,5 mg/dl a aproximadamente 10,5 mg/dl (por ejemplo, de aproximadamente 2,2 mmol/l a aproximadamente 2,6 mmol/l). Los trastornos del hueso, otras enfermedades, e incluso ciertas terapias pueden alterar los niveles de calcio sistémico con consecuencias negativas. La hipercalcemia se asocia con altos niveles de calcio en la sangre (por ejemplo, mayores de 12 mg/dl o 3 mmol/l). Niveles de calcio extraordinariamente altos conducen a, por ejemplo, fatiga, confusión, estreñimiento, apetito reducido, frecuencia urinaria, problemas cardíacos y dolor óseo. La hipocalcemia es un desequilibrio de electrolitos indicado por un nivel de calcio anormalmente bajo en la sangre (por ejemplo, menos de aproximadamente 9 mg/dl o 2,2 mmol/l). Los niveles de calcio de < 7,5 mg/dl (< 1,87 mmol/l) o menos se consideran hipocalcemia grave y pueden estar acompañados de síntomas clínicos.

Los síntomas habituales de hipocalcemia incluyen espasmos nerviosos y musculares y calambres, entumecimiento, hormigueo en las extremidades, confusión e irregularidades cardíacas. Las variaciones extremas en el calcio sistémico pueden conducir al coma y la muerte.

- 5 Varias enfermedades y terapias farmacéuticas alteran los niveles de calcio sistémicos. La hipercalcemia e hipocalcemia pueden resultar de, por ejemplo, enfermedad renal crónica, insuficiencia renal, hiperparatiroidismo primario o secundario, seudohiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo, seudohipoparatiroidismo, agotamiento de magnesio, alcoholismo, terapia de bisfosfonato, hipermagnesemia grave, deficiencia de vitamina D, hiperfosfatemia, pancreatitis aguda, síndrome del hueso hambriento, quelación, metástasis osteoblástica, septicemia, cirugía, quimioterapia, síndrome de neoplasia, hipercalcemia hipocalciúrica familiar, sarcoidosis, tuberculosis, beriliosis, histoplasmosis, Candidiasis, Coccidioidomycosis, histiocitosis X, linfoma de Hodgkin o No de Hodgkin, enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener, leucemia, neumonía, granulomas inducidos por silicona, inmovilización o terapia farmacológica, tal como la administración de diuréticos de tiazida, litio, estrógenos, fluoruros, glucosa e insulina. Además, las fluctuaciones de calcio en suero son un efecto secundario de muchas terapias relacionadas con el hueso existentes, tales como terapia de bisfosfonato y hormona paratiroidea. Debido a las consecuencias potencialmente con peligro para la vida del desequilibrio de calcio, los pacientes susceptibles a hipocalcemia o hipercalcemia pueden necesitar renunciar a ciertas opciones de terapia.
- 10 20 Notablemente, se ha mostrado que los inhibidores de esclerostina, por ejemplo, agentes de unión a esclerostina promueven la formación de hueso e inhiben (o ralentizan) la reabsorción del hueso con fluctuaciones mínimas en niveles de calcio sistémico (por ejemplo, los niveles de calcio fluctúan 10 % o menos desde los niveles de calcio en suero de línea basal). En consecuencia, los materiales de la invención son particularmente ventajosos para tratar pacientes que son susceptibles o sensibles a niveles de calcio inestables. La cantidad de agente de unión a esclerostina administrado a un ser humano en el contexto de este aspecto de la divulgación es una cantidad que no da como resultado hipocalcemia o hipercalcemia (por ejemplo, hipocalcemia o hipercalcemia clínicamente significativa). Además, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno relacionado con hueso en un ser humano que padece o está en riesgo de hipocalcemia o hipercalcemia o un ser humano en el que el tratamiento con bisfosfonato, una hormona paratiroidea o análogo de hormona paratiroidea está contraindicado. El método comprende administrar al ser humano una cantidad de un agente de unión a esclerostina eficaz para aumentar el nivel de un marcador de la formación del hueso, tal como niveles en suero de BSAP, P1NP y/u OstCa y/o reducir el nivel de un marcador de reabsorción del hueso, tal como CTX.
- 15 30 35 40 45 50 55 60 65 El método de la invención es útil para tratar o prevenir trastornos relacionados con el hueso, tales como trastornos relacionados con hueso asociados con actividad de osteoblastos u osteoclastos anómala. De hecho, el inhibidor de esclerostina (por ejemplo, agente de unión a esclerostina) puede administrarse a un ser humano que padezca un trastorno relacionado con el hueso seleccionado del grupo que consiste en acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, Enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, síndrome de Marfan, exostosis múltiples hereditarias, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, seudoartrosis, osteomielitis piógena, enfermedad periodontal, pérdida de hueso inducida por fármaco antiepileptico, hiperparatiroidismo primario y secundario, síndromes de hiperparatiroidismo familiar, pérdida de hueso inducida por ingratidez, osteoporosis en hombres, pérdida de hueso postmenopáusica, osteoartritis, osteodistrofia renal, trastornos infiltrantes del hueso, pérdida de hueso oral, osteonecrosis de la mandíbula, enfermedad de Paget juvenil, melorreostosis, enfermedades óseas metabólicas, mastocitosis, enfermedad/anemia falciforme, pérdida de hueso relacionada con el trasplante de órganos, pérdida de hueso relacionada con el trasplante de riñón, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, epilepsia, artritis juvenil, talasemia, mucopolisacaridosis, Enfermedad de Fabry, Síndrome de Turner, Síndrome de Down, Síndrome de Klinefelter, lepra, Enfermedad de Perthe, escoliosis idiopática adolescente, enfermedad inflamatoria multisistémica de aparición infantil, Síndrome de Winchester, Enfermedad de Menkes, Enfermedad de Wilson, enfermedad de hueso isquémico (tal como enfermedad de Legg-Calve-Perthes y osteoporosis migratoria regional), estados anémicos, afecciones provocadas por esteroides, pérdida de hueso inducida por glucocorticoides, pérdida de hueso inducida por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis, osteopenia, alcoholismo, enfermedad hepática crónica, estado posmenopáusico, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, colitis inflamatoria, enfermedad de Crohn, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, trastornos tiroideos, trastornos paratiroides, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional, osteomalacia, pérdida de hueso asociada con el reemplazo de articulaciones, pérdida de hueso asociada con VIH, pérdida de hueso asociada con pérdida de hormona del crecimiento, pérdida de hueso asociada con fibrosis quística, pérdida de hueso asociada con quimioterapia, pérdida de hueso inducida por tumor, pérdida de hueso relacionada con cáncer, pérdida de hueso ablativa hormonal, mieloma múltiple, pérdida de hueso inducida por fármaco, anorexia nerviosa, pérdida de hueso facial asociada con enfermedad, pérdida de hueso craneal asociada con enfermedad, pérdida de hueso de la mandíbula asociada con enfermedad, pérdida de hueso del cráneo asociada con enfermedad, pérdida de hueso asociada con el envejecimiento, pérdida de hueso craneal asociada con el envejecimiento, pérdida de hueso de la mandíbula asociada con el envejecimiento, pérdida de hueso del cráneo asociada con el envejecimiento y pérdida de hueso asociada con viaje espacial.

No es necesario que el método de la invención cure al paciente del trastorno o proteja completamente contra la aparición de un trastorno relacionado con el hueso para conseguir una respuesta biológica beneficiosa. El método puede usarse de forma profiláctica, lo que significa proteger, en parte o de forma completa, contra un trastorno relacionado con el hueso o síntoma del mismo. El método también puede usarse de forma terapéutica para aliviar, en parte o completamente, un trastorno relacionado con el hueso o síntoma del mismo, o para proteger, en parte o completamente, contra la progresión posterior de un trastorno relacionado con el hueso o síntoma del mismo. De hecho, los materiales de la invención son particularmente útiles para aumentar la densidad mineral del hueso y mantener la BMD aumentada durante un periodo de tiempo. A este respecto, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno relacionado con el hueso, comprendiendo dicho método (a) administrar una o más cantidades del agente de unión a esclerostina eficaz para aumentar la BMD medida para el cuerpo total (por ejemplo, cabeza, tronco, brazos y piernas) o en la cadera (por ejemplo, cadera total y/o cuello femoral), columna (columna lumbar), muñeca, dedo, tibia y/o talón en aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, o 30 % o más. Una o más administraciones de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo pueden llevarse a cabo durante un periodo terapéutico de, por ejemplo, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 12 meses (por ejemplo, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses o aproximadamente 11 meses). El método incluye además (b) administrar posteriormente una o más cantidades del agente de unión a esclerostina eficaces para mantener la densidad mineral del hueso. Por "mantener la densidad mineral del hueso" se entiende que la BMD aumentada resultante de la etapa (a) no cae más de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 % durante el transcurso de la etapa (b) (por ejemplo, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 2 años, o durante el transcurso de la vida del paciente). Se apreciará que un paciente puede requerir fases de tratamiento alternativas para aumentar la densidad del hueso y mantener la densidad del hueso.

El agente de unión a esclerostina se administra preferentemente a un paciente en una composición fisiológicamente aceptable (por ejemplo, farmacéutica), que puede incluir vehículos, excipientes o diluyentes. Se apreciará que el agente de unión a esclerostina descrito en el presente documento puede usarse en la preparación de un medicamento para administración usando cualquiera de los regímenes de dosificación y temporización desvelados en el presente documento. Se desvelan composiciones y métodos farmacéuticos de tratamiento en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20050106683. "Fisiológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o desafortunada similar cuando se administran a un ser humano. Además, la composición administrada a un sujeto puede contener más de un inhibidor de esclerostina, (por ejemplo, un agente de unión a esclerostina y un inhibidor de esclerostina químico sintético) o un inhibidor de esclerostina en combinación con uno o más productos terapéuticos que tienen diferentes mecanismos de acción.

Se conoce bien en la técnica el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en una diversidad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración subcutánea, oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular y su formulación, y se analiza en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747. Por ejemplo, en ciertas circunstancias, será deseable suministrar una composición farmacéutica que comprenda agente de unión a esclerostina por vía subcutánea, por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular o incluso por vía intraperitoneal. Dichos enfoques se conocen bien por el experto en la materia, algunos de los cuales se describen adicionalmente, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.543.158; 5.641.515; y 5.399.363. Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (por ejemplo, véase Patente de Estados Unidos N.º 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en que exista fácil inyectabilidad.

En un aspecto, para administración parenteral en una solución acuosa, la solución debería estar tamponada de forma adecuada si es necesario y el diluyente líquido hacerse en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermolisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed., Mack Pub. Co., Easton, PA, pp. 1035-1038 y 1570-1580). Puede producirse cierta variación en la dosificación y frecuencia de administración dependido de la afección del sujeto que se trate; edad, altura, peso y salud global del paciente; y la existencia de cualquier efecto secundario. Además, puede colocarse una composición farmacéutica que comprenda un agente de unión a esclerostina dentro de recipientes (por ejemplo, frascos), junto con material de envasado que proporciona instrucciones con respecto al uso de dichas composiciones farmacéuticas. Generalmente, dichas instrucciones incluirán una expresión tangible que describa la concentración del reactivo, así como dentro de ciertos aspectos, las cantidades relativas de los ingredientes excipientes o diluyentes (por ejemplo, agua, solución salina o PBS) que pueden ser necesarios para reconstituir la composición farmacéutica.

- El agente de unión a esclerostina se administra en una cantidad que reduce el nivel de un marcador de reabsorción del hueso y/o aumenta el nivel de un marcador de formación del hueso y/o aumenta la densidad ósea. La dosis de agente de unión a esclerostina administrada puede variar desde aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg (por ejemplo, 12 mg/kg) de peso corporal. Por ejemplo, la dosis de agente de unión a esclerostina puede variar desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 2 mg/kg o aproximadamente 9 mg/kg), de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg o de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg o 7 mg/kg).
- Además, puede ser ventajoso administrar múltiples dosis del agente de unión a esclerostina o espaciar la administración de la dosis, dependiendo del régimen terapéutico seleccionado para un paciente particular. El agente de unión a esclerostina puede administrarse periódicamente durante un periodo de tiempo de un año o menos (por ejemplo, 9 meses o menos, 6 meses o menos o 3 meses o menos). A este respecto, el agente de unión a esclerostina puede administrarse al ser humano una vez cada aproximadamente 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 2 meses, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 3 meses, 13 semanas, 14 semanas, 15 semanas, 4 meses, 17 semanas, 18 semanas, 19 semanas, 5 meses, 21 semanas, 22 semanas, 23 semanas, 6 meses, o 12 meses.
- El método desvelado comprende administrar una cantidad de un "inhibidor de esclerostina". Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de esclerostina" significa cualquier molécula que inhiba la actividad biológica de esclerostina en el hueso, como se mide por cambios en la mineralización del hueso, densidad ósea, efecto en osteoblastos y/u osteoclastos, marcadores de la formación del hueso, marcadores de la reabsorción del hueso, marcadores de la actividad de osteoblastos y/o marcadores de la actividad de osteoclastos. Dichos inhibidores pueden actuar uniéndose con esclerostina o su receptor o compañero de unión. Los inhibidores de esta categoría incluyen: "agentes de unión a esclerostina", tales como, por ejemplo, anticuerpos o moléculas basadas en péptidos. "Inhibidores de esclerostina" también se refiere a compuestos químicos orgánicos pequeños, opcionalmente de menos de aproximadamente 1000 Dalton de peso molecular que se unen con esclerostina e inhiben su actividad. Los inhibidores pueden actuar como alternativa inhibiendo la expresión de esclerostina. Los inhibidores de esta categoría incluyen polinucleótidos u oligonucleótidos que se unen con ADN o ARNm de esclerostina e inhiben la expresión de esclerostina, incluyendo un oligonucleótido antisentido, ARN inhibidor, enzima de ADN, ribozima, un aptámero o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que inhiben la expresión de esclerostina.
- Un "agente de unión a esclerostina" se une específicamente con esclerostina o partes de la misma para bloquear o alterar la unión de esclerostina humana con uno o más ligandos. La esclerostina, el producto del gen SOST, está ausente en esclerosteosis, una enfermedad esquelética caracterizada por crecimiento excesivo del hueso y huesos densos fuertes (Brunkow *et al.*, Am. J. Hum. Genet., 68: 577-589 (2001); Balemans *et al.*, Hum. Mol. Genet., 10: 537-543 (2001)). La secuencia de aminoácidos de la esclerostina humana se presenta en Brunkow *et al.* y se desvela en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747 como SEQ ID NO: 1. La esclerostina humana recombinante/SOST está disponible en el mercado de R&D Systems (Minneapolis, Minn., Estados Unidos.; 2006 Catalogo N.º 1406-ST-025). Adicionalmente, la esclerostina/SOST de ratón recombinante está disponible en el mercado de R&D Systems (Minneapolis, Minn., Estados Unidos; 2006 Catalogo N.º 1589-ST-025). Los anticuerpos monocionales de unión a esclerostina de uso en investigación están disponibles en el mercado de R&D Systems (Minneapolis, Minn., Estados Unidos; monoclonal de ratón: 2006 Catalogo N.º MAB1406; monoclonal de rata: 2006 Catalogo N.º MAB1589). Las Patentes de Estados Unidos N.º 6.395.511 y 6.803.453 y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N.º 20040009535 y 20050106683 se refieren a anticuerpos antiesclerostina en general. También se describen ejemplos de agentes de unión a esclerostina adecuados para su uso en el contexto de la divulgación en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747 y 20070072797. Puede encontrarse información adicional con respecto a materiales y métodos para generar agentes de unión a esclerostina en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20040158045.
- El agente de unión a esclerostina de la invención es un anticuerpo. El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo. Un anticuerpo puede comprender una molécula de anticuerpo completa (incluyendo versiones policloniales, monoclonales, químicas, humanizadas o humanas que tengan cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa), o comprende un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos F(ab')₂, Fab, Fab', Fv, Fc y Fd, y pueden incorporarse en anticuerpos de dominio sencillo, anticuerpos de cadena sencilla, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology, 23(9): 1126-1136 (2005)). También se desvelan polipéptidos de anticuerpo, incluyendo monocuerpos polipeptídicos de fibronectina en la Patente de Estados Unidos N.º 6.703.199. Se desvelan otros polipéptidos de anticuerpo en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20050238646. Los anticuerpos antiesclerostina pueden unirse a esclerostina de SEQ ID NO: 1, o una variante de origen natural de la misma, con una afinidad de menor de o igual a 1 x 10⁻⁷ M, menor de o igual a 1 x 10⁻⁸ M, menor de o igual a 1 x 10⁻⁹ M, menor de o igual a 1 x 10⁻¹⁰ M, menor de o igual a 1 x 10⁻¹¹ M, o menor de o igual a 1 x 10⁻¹² M. La afinidad puede determinarse por un ensayo de ELISA de afinidad. En ciertos aspectos, la afinidad puede determinarse por un ensayo de BIACore. En ciertos aspectos, la afinidad puede determinarse por un método cinético. En ciertos aspectos, la afinidad puede determinarse por un

método de solución/equilibrio.

- Un fragmento de anticuerpo puede ser cualquier proteína sintética u obtenida por ingeniería genética. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados que consisten en la región variable de cadena ligera, 5 fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinantes en las que las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un enlazador peptídico (proteínas scFv).
- Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que comprende una o más regiones determinantes de 10 complementariedad (CDR) de un anticuerpo. Pueden obtenerse CDR (también denominadas "unidades de reconocimiento mínimas" o "región hipervariante") construyendo polinucleótidos que codifiquen la CDR de interés. Dichos polinucleótidos se preparan, por ejemplo usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la 15 región variable usando ARNm de células productoras de anticuerpo como un molde (véase, por ejemplo, Larrick *et al.*, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2: 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," en Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Application, Ritter *et al.* (eds.), página 166, Cambridge University Press (1995); y Ward *et al.*, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch *et al.*, (eds.), página 137, WileyLiss, Inc. (1995)).
- 20 En un aspecto de la divulgación, el agente de unión a esclerostina bloquea de forma cruzada la unión de al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23, y Ab-24 (todos los cuales se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747) para esclerostina. Como alternativa o además, el agente de unión a esclerostina se bloquea de forma cruzada de la unión con esclerostina por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, 25 Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23, y Ab-24 (todos los cuales se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747). Las expresiones "bloqueo cruzado", "bloqueado de forma cruzada" y "bloquear de forma cruzada" se usan de forma intercambiable en el presente documento para indicar la capacidad de un anticuerpo u otro agente de unión para interferir con la unión de otros 30 anticuerpos o agentes de unión con esclerostina. El grado en que un anticuerpo u otro agente de unión es capaz de interferir con la unión de otro con esclerostina, y por lo tanto si puede decirse que bloquea de forma cruzada, puede determinarse usando ensayos de unión competitiva. En algunos aspectos de la divulgación, un anticuerpo de bloqueo cruzado o fragmento del mismo reduce la unión de esclerostina de un anticuerpo de referencia entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 100 %, tal como aproximadamente 60 % y aproximadamente 100 %, 35 específicamente entre 70 % y 100 %, y más específicamente entre 80 % y 100 %. Un ensayo cuantitativo particularmente adecuado para detectar el bloqueo cruzado usa una máquina Biacore que mide el alcance de las interacciones usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial. Otro ensayo de bloqueo cruzado cuantitativo adecuado usa un enfoque basado en ELISA para medir la competición entre anticuerpos u otros agentes de unión con respecto a su unión con esclerostina.
- 40 Los agentes de unión a esclerostina adecuados incluyen anticuerpos y partes de los mismos descritos en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747, tales como uno o más de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 como se desvela específicamente en la misma. Al menos una de las regiones de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 puede tener al menos una sustitución de aminoácido, siempre 45 que el agente de unión conserve la especificidad de unión de la CDR no sustituida. La parte no CDR del agente de unión puede ser una molécula no proteica, donde el agente de unión bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo desvelado en el presente documento con esclerostina y/o neutraliza la esclerostina. La parte no CDR del agente de unión puede ser una molécula no proteica en la que el agente de unión muestre un patrón de unión similar 50 con péptidos de esclerostina humana en un ensayo de unión competitiva de epítopos peptídicos de esclerostina humana como el mostrado por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 y Ab-24 (todos los cuales se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747), y/o neutraliza esclerostina. La parte no CDR del agente de unión puede estar compuesta de aminoácidos, donde el agente de unión es una proteína de unión recombinante o un péptido sintético, y la proteína 55 de unión recombinante bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo con esclerostina y/o neutraliza la esclerostina. La parte no CDR del agente de unión puede estar compuesta de aminoácidos, donde el agente de unión es una proteína de unión recombinante, y la proteína de unión recombinante muestra un patrón de unión similar con péptidos de esclerostina humana en el ensayo de unión competitiva de epítopos peptídicos de esclerostina humana (descrito en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747) como el mostrado 60 por al menos uno de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23, y Ab-24 (descrito en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747) y/o neutraliza la esclerostina. Preferentemente, el agente de unión a esclerostina es Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, 65 Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 o Ab-24 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747.

Además, el agente de unión a esclerostina puede comprender al menos una secuencia de CDR que tiene al menos 75 % de identidad (por ejemplo, 100 % de identidad) con una CDR seleccionada de SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 78, 79, 80, 81, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 351, 352, 353, 358, 359, y 360 desveladas en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747. Preferentemente, el agente de unión a esclerostina comprende al menos una secuencia de CDR que tiene al menos 75 % de identidad con una CDR seleccionada de SEQ ID NO: 245, 246, 247, 78, 79, 80, 269, 270, 271, 239, 240, y 24, todas las cuales se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747. Como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747, el agente de unión a esclerostina puede comprender: a) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 54, 55, y 56 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 51, 52, y 53; b) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 60, 61, y 62 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 57, 58, y 59; c) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 48, 49, y 50 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 45, 46, y 47; d) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 42, 43, y 44 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 39, 40, y 41; e) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 275, 276, y 277 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 287, 288, y 289; f) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 278, 279, y 280 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 290, 291, y 292; g) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 78, 79, y 80 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 245, 246, y 247; h) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 81, 99, y 100 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 248, 249, y 250; i) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 101, 102, y 103 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 251, 252, y 253; j) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 104, 105, y 106 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 254, 255, y 256; k) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 107, 108, y 109 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 257, 258, y 259; l) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 110, 111, y 112 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 260, 261, y 262; m) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 281, 282, y 283 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 293, 294, y 295; n) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 113, 114, y 115 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 263, 264, y 265; o) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 284, 285, y 286 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 296, 297, y 298; p) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 116, 237, y 238 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 266, 267, y 268; q) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 239, 240, y 241 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 269, 270, y 271; r) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 242, 243, y 244 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 272, 273, y 274; o s) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 351, 352, y 353 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 358, 359, y 360.

Los agentes de unión a esclerostina también pueden comprender al menos una secuencia de CDR que tiene al menos 75 % de identidad con una CDR seleccionada de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 en la que CDR-H1 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 245 o SEQ ID NO: 269, CDR-H2 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 246 o SEQ ID NO: 270, CDR-H3 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 247 o SEQ ID NO: 271, CDR-L1 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 239, CDR-L2 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 240 y CDR-L3 tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 80 o SEQ ID N.º 241, todas las cuales se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747.

Como alternativa, el agente de unión a esclerostina puede tener una cadena pesada que comprende las CDR H1, H2 y H3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 137 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 245, 246 y 247, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las CDR L1, L2 y L3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 133 o una variante de la misma en la que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente (como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747).

50 El agente de unión a esclerostina puede tener una cadena pesada que comprende las CDR H1, H2 y H3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 145 o 392 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 245, 246 y 247, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las CDR L1, L2 y L3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 141 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente (como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747).

60 El agente de unión a esclerostina puede tener una cadena pesada que comprende las CDR H1, H2 y H3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 335 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 269, 270 y 271, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las CDR L1, L2 y L3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 334 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 239, 240 y 241, respectivamente (como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747).

65 Como alternativa, el agente de unión a esclerostina tiene una cadena pesada que comprende las CDR H1, H2 y H3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 331 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 269, 270 y 271, respectivamente, y una cadena

ligera que comprende las CDR L1, L2 y L3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 330 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 239, 240 y 241, respectivamente (como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747).

- 5 El agente de unión a esclerostina puede tener una cadena pesada que comprende las CDR H1, H2 y H3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 345 o 396 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 269, 270 y 271, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las CDR L1, L2 y L3 y que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 341 o una variante del mismo en el que dichas CDR son al menos 75 % idénticas a SEQ ID NO: 239, 240 y 241, respectivamente (como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747).

Como alternativa, el agente de unión a esclerostina tiene una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 137, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 133; o una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 145 o 392, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 141; o una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 335, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 334; o una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 331 y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 330; o una cadena pesada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 345 o 396, y una cadena ligera que comprende un polipéptido que tiene la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 341 (como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747).

- 25 Los agentes de unión a esclerostina para su uso en el método de la invención preferentemente modulan la función de esclerostina en el ensayo basado en células descrito en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747 y/o el ensayo *in vivo* descrito en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747, se unen con uno o más de los epítopos descritos en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747, bloquean de forma cruzada la unión de uno de los anticuerpos descritos en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747 y/o está bloqueada de forma cruzada su unión con esclerostina por uno de los anticuerpos descritos en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20070110747.

Como alternativa, el método desvelado puede comprender administrar un inhibidor de esclerostina distinto de un agente de unión a esclerostina descrito en el presente documento. Dichos agentes pueden actuar directa o indirectamente en SOST o esclerostina. Los inhibidores de esclerostina contemplados para su uso en el método de la invención incluyen los descritos en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030229041. Por ejemplo, los agentes útiles para modular la expresión de SOST y actividad de esclerostina incluyen, pero sin limitación, esteroides (tales como los correspondientes a la Fórmula 1 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030229041), alcaloides, terpenoides, peptoides y productos químicos sintéticos. En algunos aspectos, el antagonista o agonista de SOST puede unirse con un receptor de glucocorticoides. Por ejemplo, la dexametasona tiende a anular el efecto estimulador de BMP-4 y BMP-6 en la expresión de SOST. Otras entidades químicas incluyendo análogos de glucocorticoides, sales biliares (tales como las correspondientes a Fórmula 3 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030229041) y prostaglandinas (tales como las correspondientes a Fórmula 2 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030229041) también modulan los efectos de las proteínas morfogenéticas del hueso en la expresión de SOST, y se contemplan para su uso en el método de la invención.

El inhibidor de esclerostina puede ser otros productos terapéuticos de moléculas pequeñas que actúan directa o indirectamente en SOST o esclerostina para reducir el nivel de al menos un marcador de la reabsorción del hueso y/o aumentar el nivel de al menos un marcador de la formación del hueso *in vivo*. La expresión "molécula pequeña" incluye un compuesto o complejo molecular, sintético, derivado de forma natural o parcialmente sintético, y que preferentemente tiene un peso molecular de menos de 5.000 Dalton (por ejemplo, entre aproximadamente 100 y 1.500 Dalton). Pueden obtenerse agentes usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, incluyendo bibliotecas de fase sólida o fase en solución paralelos espacialmente direccionables, métodos de biblioteca sintética que requieren desconvolución, el método de biblioteca de "una perla un compuesto", y métodos de biblioteca sintética usando selección de cromatografía de afinidad (véase, por ejemplo, Lam, Anticancer Drug Des., 12: 145 (1997) y Patentes de Estados Unidos N.º 5.738.996; 5.807.683; y 7.261.892). Se describen adicionalmente métodos para desarrollar y explorar inhibidores de esclerostina en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030229041.

60 Los inhibidores de expresión de esclerostina que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la divulgación incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos inhibidores, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, por ejemplo, sales sódicas. Los ejemplos no limitantes incluyen: oligonucleótidos antisentido (Eckstein, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 10: 117-121 (2000); Crooke, Methods Enzymol., 313: 3-45 (2000); Guvakova et al., J. Biol. Chem., 270: 2620-2627 (1995); Manoharan, Biochim. Biophys. Acta, 1489: 117-130 (1999); Baker et al., J. Biol. Chem., 272: 11994-12000 (1997); Kurreck, Eur. J. Biochem., 270: 1628-1644 (2003); Sierakowska et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 12840-12844 (1996); Marwick, J. Am. Med. Assoc., 280: 871 (1998); Tomita y Morishita, Curr. Pharm. Des., 10: 797-803 (2004); Gleave y Monia, Nat. Rev. Cancer, 5: 468-479 (2005) y Patil, AAPS J., 7: E61-E77 (2005)), oligonucleótidos triples (Francois *et al.*, Nucleic Acids Res., 16: 11431-11440 (1988) y Moser y Dervan, Science, 238: 645-650 (1987)), ribozimas/desoxiribozimas (ADNzimas) (Kruger *et al.*, Tetrahymena. Cell, 31: 147-157 (1982); Uhlenbeck, Nature, 328: 596-600 (1987); Sigurdsson y Eckstein, Trends Biotechnol., 13: 286-289 (1995); Kumar *et al.*, Gene Ther., 12: 1486-1493 (2005); Breaker y Joyce, Chem. Biol., 1: 223-229 (1994); Khachigian, Curr. Pharm. Biotechnol., 5: 337-339 (2004); Khachigian, Biochem. Pharmacol., 68: 1023-1025 (2004) y Trulzsch y Wood, J. Neurochem., 88: 257-265 (2004)), ARN de interferencia pequeños/ARNi (Fire *et al.*, Nature, 391: 806-811 (1998); Montgomery *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 15502-15507 (1998); Cullen, Nat. Immunol., 3: 597-599 (2002); Hannon, Nature, 418: 244-251 (2002); Bernstein *et al.*, Nature, 409: 363-366 (2001); Nykanen *et al.*, Cell, 107: 309-321 (2001); Gilmore *et al.*, J. Drug Target., 12: 315-340 (2004); Reynolds *et al.*, Nat. Biotechnol., 22: 326-330 (2004); Soutschek *et al.*, Nature, 432: 173-178 (2004); Ralph *et al.*, Nat. Med., 11: 429-433 (2005); Xia *et al.*, Nat. Med., 10: 816-820 (2004) y Miller *et al.*, Nucleic Acids Res., 32: 661-668 (2004)), aptámeros (Ellington y Szostak, Nature, 346: 818-822 (1990); Doudna *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92: 2355-2359 (1995); Tuerk y Gold, Science, 249: 505-510 (1990); White *et al.*, Mol. Ther., 4: 567-573 (2001); Rusconi *et al.*, Nature, 419: 90-94 (2002); Nimjee *et al.*, Mol. Ther., 14: 408-415 (2006); Gragoudas *et al.*, N. Engl. J. Med., 351: 3805-2816 (2004); Vinores, Curr. Opin. Mol. Ther., 5: 673-679 (2003) y Kourlas y Schiller *et al.*, Clin. Ther., 28: 36-44 (2006)) u oligonucleótidos señuelo (Morishita *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92: 5855-5859 (1995); Alexander *et al.*, J. Am. Med. Assoc., 294: 2446-2454 (2005); Mann y Dzau, J. Clin. Invest., 106: 1071-1075 (2000) y Nimjee *et al.*, Annu. Rev. Med., 56: 555-583 (2005)), con énfasis particular en las secciones de los documentos que se refieren a métodos de diseño, marcaje y uso de oligonucleótidos inhibidores. Proveedores comerciales tales como Ambion Inc. (Austin, TX), Darmacon Inc. (Lafayette, CO), InvivoGen (San Diego, CA), y Molecular Research Laboratories, LLC (Herndon, VA) generan moléculas de ARNip a petición. Además, están disponibles kits comerciales para producir moléculas de ARNip adaptadas, tales como el Kit de Construcción de ARNip SILENCER™ (Ambion Inc., Austin, TX) o Sistema psiRNA (InvivoGen, San Diego, CA).

Se contemplan oligonucleótidos inhibidores que son estables, tienen una alta resistencia a nucleasas, poseen farmacocinética adecuada para permitirles desplazarse al sitio de tejido diana a dosis no tóxicas, y tienen la capacidad para cruzar a través de membranas plasmáticas para su uso como un producto terapéutico. Los oligonucleótidos inhibidores pueden ser complementarios de la parte codificante de un gen diana, regiones no traducidas 3' o 5' o secuencias intrónicas en un gen, o como alternativa secuencias codificantes o intrónicas en el ARNm diana. Las secuencias intrónicas están generalmente menos conservadas y por lo tanto pueden proporcionar mayor especificidad. En un aspecto, el oligonucleótido inhibidor inhibe la expresión de un producto génico de una especie pero no su homólogo en otra especie; en otros aspectos, el oligonucleótido inhibidor inhibe la expresión de un gen en dos especies, por ejemplo humana y primate, o humana y murina.

Se ha mostrado que la expresión constitutiva de oligonucleótidos antisentido en células inhibe la expresión génica, posiblemente mediante el bloqueo de la traducción o prevención de corte y empalme. En ciertos aspectos, el oligonucleótido inhibidor es capaz de hibridar con al menos 8, 9, 10, 11 o 12 constitutivas del gen de esclerostina o ARNm (o la cadena inversa del mismo) en condiciones de rigurosidad moderada o alta. Los oligonucleótidos inhibidores adecuados pueden ser monocatenarios y contener un segmento, por ejemplo de al menos 12, 15 o 18 bases de longitud, que es suficientemente complementario de, y específico para una molécula de ADN o ARNm de modo que hibrida con la molécula de ARNm o ADN e inhibe la transcripción, corte y empalme o traducción. Generalmente la complementariedad sobre una longitud de menos de 30 bases es más que suficiente.

Típicamente, las condiciones rigurosas serán en las que la concentración salina es menor de aproximadamente 1,5 M de ion Na, típicamente concentración de ion Na de aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para ácidos nucleicos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para ácidos nucleicos más largos (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. Las condiciones de baja rigurosidad ejemplares incluyen hibridación con una solución de tampón de formamida 30 % a 35 %, NaCl 1 M, SDS (dodecil sulfato sódico) 1 % a 37 °C, y un lavado en SSC 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) de 50 °C a 55 °C. Las condiciones de rigurosidad moderada ejemplares incluyen hibridación en formamida 40 % a 45 %, NaCl 1,0 M, SDS 1 % a 37 °C, y un lavado en SSC de 0,5X a 1X de 55 °C a 60 °C. Las condiciones de alta rigurosidad ejemplares incluyen hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS 1 % a 37 °C, y un lavado en SSC 0,1X de 60 °C a 65 °C. La duración de la hibridación es generalmente menor de aproximadamente 24 horas, habitualmente de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 12 horas.

En algunos casos, dependiendo de la longitud de la región complementaria, pueden tolerarse una, dos o más coincidencias erróneas sin afectar a la función inhibidora. En ciertos aspectos, el oligonucleótido inhibidor es un oligonucleótido antisentido, un ARN inhibidor (incluyendo ARNip o ARNi, o ARNh), una enzima de ADN, una ribozima (opcionalmente una ribozima de cabeza de martillo), un aptámero o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En un aspecto, el oligonucleótido es complementario de al menos 10 bases de la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO: 1 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20040158045. En un aspecto, el oligonucleótido se dirige a los nucleótidos localizados cerca de la región no traducida 3' del ARNm de esclerostina.

- La secuencia específica utilizada en el diseño de los oligonucleótidos puede ser cualquier secuencia contigua de nucleótidos contenidos dentro del mensaje génico expresado de la diana. Los factores que gobiernan un sitio diana para la secuencia oligonucleotídica inhibidora incluyen la longitud del oligonucleótido, afinidad de unión y accesibilidad de la secuencia diana. Las secuencias pueden explorarse *in vitro* con respecto a la potencia de su actividad inhibidora midiendo la inhibición de la traducción de la proteína diana y fenotipo relacionado diana, por ejemplo, inhibición de la proliferación celular en células en cultivo. En general se sabe que la mayoría de las regiones del ARN (regiones no traducidas 5' y 3', inicio AUG, codificantes, puntos de unión de corte y empalme e intrones) pueden ser dianas usando oligonucleótidos antisentido. Pueden usarse programas y algoritmos, conocidos en la técnica, para seleccionar secuencias diana apropiadas. Además, pueden seleccionarse secuencias óptimas utilizando programas diseñados para predecir la estructura secundaria de una secuencia de ácido nucleico monocatenaria específica y permitiendo la selección de las secuencias que probablemente aparezcan en regiones monocatenarias expuestas de un ARNm plegado. Pueden encontrarse métodos y composiciones para diseñar oligonucleótidos apropiados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.251.588.
- Pueden usarse oligonucleótidos antisentido de fosforotioato. Las modificaciones del enlace de fosfodiéster así como del heterociclo o el azúcar pueden proporcionar un aumento de la eficacia. Se usa fosforotioato para modificar el enlace de fosfodiéster. Se ha descrito un enlace de fosforamidato N3'-P5' como estabilizador de oligonucleótidos para nucleasas y que aumenta la unión con ARN. El enlace de ácido péptido nucleico (PNA) es un reemplazo completo de la cadena principal de ribosa y fosfodiéster y es estable para nucleasas, aumenta la afinidad de unión con ARN, y no permite escisión por RNasa H. Su estructura básica también es susceptible de modificaciones que pueden permitir su optimización como un componente antisentido. Con respecto a modificaciones del heterociclo, se ha demostrado que ciertas modificaciones de heterociclo aumentan los efectos antisentido sin interferir con la actividad RNasa H. Un ejemplo de dicha modificación es una modificación de tiazol C5. Finalmente, también puede considerarse la modificación del azúcar. Las modificaciones de 2'-O-propilo y 2'-metoxietoxi ribosa estabilizan los oligonucleótidos para nucleasas en cultivo celular e *in vivo*.
- Se ha mostrado que la mayoría de los ARNm contienen varias estructuras secundarias y terciarias. Los elementos estructurales secundarios en ARN están formados principalmente por interacciones de tipo Watson-Crick entre diferentes regiones de la misma molécula de ARN. Los elementos estructurales secundarios importantes incluyen regiones bicatenarias intramoleculares, bucles en horquilla, abultamientos en ARN bicatenario y bucles internos. Se forman elementos estructurales terciarios cuando los elementos estructurales secundarios entran en contacto entre sí o con regiones monocatenarias para producir una estructura tridimensional más compleja. Varios investigadores han medido las energías de unión de un gran número de estructuras bicatenarias de ARN y han derivado un conjunto de normas que pueden usarse para predecir la estructura secundaria del ARN (véase, por ejemplo, Jaeger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 7706 (1989); y Turner *et al.*, Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17: 167 (1988)). Las normas son útiles en la identificación de elementos estructurales de ARN y, en particular, para identificar regiones de ARN monocatenarias que pueden representar segmentos del ARNm a los que dirigir los ARNip, ribozimas o tecnologías antisentido.
- La tecnología de ARN de interferencia corto (ip) (también conocido como ARNi) generalmente implica la degradación de un ARNm de una secuencia particular inducida por ARN bicatenario (ARNbc) que es homólogo de esa secuencia, "interfiriendo" de este modo con la expresión del gen correspondiente. Cualquier gen seleccionado puede reprimirse introduciendo un ARNbc que corresponda a toda o una parte sustancial del ARNm de ese gen. Parece que cuando se expresa un ARNbc largo, se procesa inicialmente por una ribonucleasa III en oligonucleótidos de ARNbc más cortos de tan poco como 21 a 22 pares de bases de longitud. En consecuencia, el ARNip puede verse afectado por la introducción o expresión de ARNbc homólogos relativamente cortos. Los ARNip ejemplares tienen cadenas con sentido y antisentido de aproximadamente 21 nucleótidos que forman aproximadamente 19 nucleótidos de ARN bicatenario con salientes de dos nucleótidos en cada extremo 3'. De hecho, el uso de ARNbc homólogos relativamente cortos puede tener ciertas ventajas.
- Las células de mamífero tienen al menos dos rutas que están afectadas por el ARN bicatenario (ARNbc). En la ruta de ADNip específica de secuencia, el ARNbc de inicio se divide en primer lugar en ARN de interferencia cortos, como se ha descrito anteriormente. Se cree que los ARN de interferencia cortos proporcionan la información de secuencia que permite que un ARN mensajero específico se dirija a degradación. Por el contrario, la ruta no específica se desencadena por ARNbc de cualquier secuencia, siempre que sea de al menos aproximadamente 30 pares de bases de longitud.
- Los efectos no específicos suceden debido a que al ARNbc activa dos enzimas: PKR, que en su forma activa fosforila el factor de inicio de la traducción eIF2 para detener toda la síntesis proteica, y 2', 5' oligoadenilato sintetasa (2', 5'-AS), que sintetiza una molécula que activa RNasa L, una enzima no específica que se dirige a todo el ARNm. La ruta no específica puede representar una respuesta de hospedador a tensión o infección viral y, en general, los efectos de la ruta no específica preferentemente se minimizan. Significativamente, parece que se requieren ARNbc más largos para inducir la ruta no específica y, en consecuencia, se contemplan ARNbc más cortos de aproximadamente 30 pares de bases para efectuar la represión génica por ARNi (véase Hunter *et al.*, J. Biol. Chem., 250: 409-17 (1975); Manche *et al.*, Mol. Cell. Biol. 12: 5239-48 (1992); Minks *et al.*, J. Biol. Chem., 254: 10180-3).

(1979); y Elbashir *et al.*, Nature, 411: 494-8 (2001)).

Se ha demostrado que el ARNip es un medio eficaz para reducir la expresión génica en una diversidad de tipos celulares. El ARNip típicamente reduce la expresión de un gen a niveles menores que los conseguidos usando

5 técnicas antisentido, y con frecuencia elimina la expresión completamente (véase Bass, Nature, 411: 428-9 (2001)). En células de mamífero, los ARNip son eficaces a concentraciones que están varios órdenes de magnitud por debajo de las concentraciones típicamente usadas en experimentos antisentido (Elbashir *et al.*, Nature, 411: 494-8 (2001)).

10 Los oligonucleótidos bicatenarios usados para efectuar el ARNi son preferentemente de menos de 30 pares de bases de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 o 17 pares de bases o menos de longitud y contienen un segmento suficientemente complementario del ARNm diana para permitir la hibridación con el ARNm diana. Opcionalmente los oligonucleótidos de ARNb pueden incluir extremos salientes 3'. Los salientes 3' de dos nucleótidos ejemplares pueden estar compuestos de restos de ribonucleótidos de cualquier tipo y pueden 15 incluso estar compuestos de restos de 2'-desoxitimidina, lo que reduce el coste de la síntesis de ARN y puede potenciar la resistencia a nucleasa de los ARNip en el medio de cultivo celular y dentro de células transfectadas (véase Elbashi *et al.*, mencionado anteriormente). Los ARNb ejemplares pueden sintetizarse químicamente o producirse *in vitro* o *in vivo* usando vectores de expresión apropiados (véase, por ejemplo, Elbashir *et al.*, Genes Dev., 15: 188-200 (2001)). Pueden transcribirse ARN más largos a partir de promotores, tales como promotores de 20 ARN polimerasa T7, conocidos en la técnica.

Pueden utilizarse ARNb más largos de 50, 75, 100 o incluso 500 pares de bases en ciertos aspectos de la divulgación. Son concentraciones ejemplares de ARNb para efectuar ARNi de aproximadamente 0,05 nM, 0,1 nM, 25 0,5 nM, 1,0 nM, 1,5 nM, 25 nM o 100 nM, aunque pueden utilizarse otras concentraciones dependiendo de la naturaleza de las células tratadas, la diana génica y otros factores fácilmente discernibles por el experto en la materia.

Se proporcionan composiciones, métodos y aplicaciones adicionales de tecnología de ARNip en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.278.039; 5.723.750; y 5.244.805.

30 En comparación con ARNip, el ARNhp ofrece ventajas en la longevidad del silenciamiento y las opciones de suministro. Véase, por ejemplo, Hannon *et al.*, Nature, 431: 371-378 (2004) para una revisión. Se han indicado vectores que producen ARNhp, que se procesan de forma intracelular en ARN bicatenarios cortos que tienen propiedades de tipo ARNip (Brummelkamp *et al.*, Science, 296: 550-553 (2000); Paddison *et al.*, Genes Dev., 16: 35 948-958 (2002)). Dichos vectores proporcionan una fuente renovable de un reactivo de silenciamiento génico que puede mediar en el silenciamiento génico persistente después de integración estable del vector en el genoma de la célula hospedadora. Además, el casete en "horquilla" de silenciamiento central puede insertarse fácilmente en vectores retrovirales, lentivirales y adenovirales, facilitando el suministro de ARNhp en una amplia serie de tipos celulares (Brummelkamp *et al.*, Cancer Cell, 2: 243-247 (2002); Dirac *et al.*, J. Biol. Chem., 278: 11731-11734 (2003); Michiels *et al.*, Nat. Biotechnol., 20: 1154-1157 (2002); Stegmeier *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 40 13212-13217 (2005); Khvorova *et al.*, Cell, 115: 209-216 (2003)) en cualquiera de los innumerables modos que se han ideado para el suministro de construcciones de ADN que permiten la expresión de ARNm ectópica.

45 Una horquilla puede organizarse en una horquilla levógira (es decir, 5'-antisentido-bucle-sentido-3') o una horquilla dextrógira (es decir, 5'-sentido-bucle-antisentido-3'). El ARNip también puede contener salientes en el extremo 5' o 3' de la cadena con sentido o la cadena antisentido, dependiendo de la organización de la horquilla. Preferentemente, si hay salientes, están en el extremo 3' de la horquilla y comprenden entre 1 y 6 bases. Los 50 salientes pueden estar no modificados, o pueden contener una o más modificaciones estabilizadoras o de especificidad, tales como una modificación de halógeno u O-alquilo de la posición 2', o modificaciones internucleotídicas tales como modificaciones de fosforotioato, fosforoditioato o metilfosfonato. Los salientes pueden ser ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico o una combinación de ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico.

55 Adicionalmente, una horquilla puede comprender además un grupo fosfato en el nucleótido más 5'. La fosforilación del nucleótido más 5' se refiere a la presencia de uno o más grupos fosfato unidos con el carbono 5' del resto de azúcar del nucleótido 5' terminal. Preferentemente, hay solamente un grupo fosfato en el extremo 5' de la región que formará la cadena antisentido después de procesamiento de Dicer. En un aspecto ejemplar de la divulgación, una horquilla dextrógira puede incluir un extremo 5', (es decir, el extremo 5' libre de la región con sentido) que no tiene un grupo fosfato 5', o puede tener el carbono 5' del nucleótido más 5' libre de la región con sentido que se modifica de tal modo que evita la fosforilación. Esto puede conseguirse por una diversidad de métodos, incluyendo adición de un grupo de bloqueo de fosforilación (por ejemplo, un grupo de 5'-O-alquilo), o eliminación del grupo funcional 5'-OH (por ejemplo, el nucleótido más 5' es un desoxinucleótido 5'. En casos en los que la horquilla es una horquilla levógira, preferentemente la posición de carbono 5' del nucleótido más 5' está fosforilada).

65 Las horquillas que tienen longitudes de tallos mayores de 26 pares de bases pueden procesarse por Dicer de modo que algunas partes no sean parte del ARNip resultante que facilita la degradación de ARNm. En consecuencia, la

primera región, que puede comprender nucleótidos con sentido, y la segunda región, que puede comprender nucleótidos antisentido, también puede contener un tramo de nucleótidos que son complementarios (o al menos sustancialmente complementarios entre sí) pero son o no son iguales que o complementarios del ARNm diana. Aunque el tallo de ARNhp puede estar compuesto de cadenas antisentido y con sentido complementarias o parcialmente complementarias exclusivas de los salientes, el ARNhp también puede incluir lo siguiente: (1) la parte de la molécula que está distante del eventual sitio de corte de Dicer contiene una región que es sustancialmente complementaria/homóloga del ARNm diana; y (2) la región del tallo que está próxima al sitio de corte de Dicer (es decir, la región adyacente al bucle) no está relacionada o está solamente parcialmente relacionada (por ejemplo, complementaria/homóloga) con el ARNm diana. El contenido de nucleótidos de esta segunda región puede seleccionarse basándose en varios parámetros, rasgos o perfiles termodinámicos.

Los ARNhp modificados pueden conservar las modificaciones en la doble cadena después del procesamiento con Dicer. En aspectos ejemplares, en casos en los que la horquilla es una horquilla dextrógira (por ejemplo, 5'-S-bucle-AS-3') que contiene salientes de 2-6 nucleótidos en el extremo 3' de la molécula, pueden añadirse modificaciones de 2'-O-metilo a nucleótidos en la posición 2, posiciones 1 y 2, o posiciones 1, 2 y 3 en el extremo 5' de la horquilla. Además, el procesamiento con Dicer de horquillas con esta configuración puede conservar el extremo 5' de la cadena con sentido intacta, conservando de este modo el patrón de modificación química en la doble cadena después del procesamiento con Dicer. La presencia de un saliente 3' en esta configuración puede ser particularmente ventajosa ya que las moléculas de extremos romos que contienen el patrón de modificación prescrito pueden procesarse adicionalmente por Dicer de tal modo que los nucleótidos que portan las modificaciones 2' se retiran. En casos en los que el saliente 3' está presente/conservado, la doble cadena resultante que porta los nucleótidos modificados con sentido puede tener rasgos altamente favorables con respecto a la especificidad y funcionalidad de silenciamiento. Se describen ejemplos de patrones de modificación ejemplares en detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20050223427 y las Publicaciones de Patente Internacional N.º WO 2004/090105 y WO 2005/078094.

Los ARNhp pueden comprender secuencias que se seleccionaron de forma aleatoria, o de acuerdo con cualquier procedimiento de selección de diseño racional. Por ejemplo, se describen algoritmos de diseño racional en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2004/045543 y la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20050255487. Adicionalmente, puede ser deseable seleccionar secuencias completamente o en parte basándose en perfiles de estabilidad interna promedios ("AISP") o perfiles de estabilidad interna regional ("RISP") que pueden facilitar el acceso o el procesamiento por maquinaria celular.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARNm, evitando de este modo la traducción (Para una revisión, véase Rossi, Current Biology, 4: 469-471 (1994)). El mecanismo de la acción de ribozimas implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con ARN diana complementario, seguido de un acontecimiento de escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozimas preferentemente incluyen (1) una o más secuencias complementarias de un ARNm diana, y (2) la secuencia catalítica bien conocida responsable de la escisión de ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 5.093.246).

Aunque las ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio pueden usarse para destruir ARNm diana, pueden usarse como alternativa ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden ARNm en localizaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm diana. Preferentemente, el ARNm diana tiene la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo se conoce bien en la técnica y se describe más completamente en Haseloff y Gerlach, Nature, 334: 585-591 (1988); y la Publicación de Patente Internacional N.º WO 89/05852.

Las ribozimas que se dirigen a genes pueden contener una región hibridante complementaria de dos regiones de un ARNm diana, cada una de las cuales es de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos (pero que no es necesario que sean ambas de la misma longitud).

Las secuencias de ribozimas de cabeza de martillo pueden incluirse en un ARN estable tal como un ARN de transferencia (ARNt) para aumentar la eficacia de escisión *in vivo* (Perriman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6175-79 (1995); de Feyter y Gaudron, Methods in Molecular Biology, Vol. 74, Capítulo 43, "Expressing Ribozymes in Plants," Turner, P. C. (ed.), Humana Press Inc., Totowa, N. J.). En particular, se conoce bien en la técnica la expresión mediada por ARN polimerasa III de ribozimas de fusión de ARNt (véase Kawasaki *et al.*, Nature, 393: 284-9 (1998); Kuwabara *et al.*, Nature Biotechnol., 16: 961-5 (1998); y Kuwabara *et al.*, Mol. Cell, 2: 617-27 (1998); Koseki *et al.*, J. Virol., 73: 1868-77 (1999); Kuwabara *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 1886-91 (1999); Tanabe *et al.*, Nature, 406: 473-4 (2000)). Hay típicamente varios sitios de escisión de ribozimas de cabeza de martillo potenciales dentro de una secuencia de ADNc diana dada. Preferentemente la ribozima se modifica por ingeniería genética de modo que el sitio de reconocimiento de escisión se localice cerca del extremo 5' del ARNm diana para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales. Además, el uso de cualquier sitio de reconocimiento de escisión localizado en la secuencia diana que codifica diferentes partes del ARNm diana permitiría la dirección selectiva de uno o el otro gen diana.

- Las ribozimas para su uso en el método desvelado también incluyen endorribonucleasas de ARN ("ribozimas de tipo Cech") tales como la que aparece de forma natural en *Tetrahymena thermophila* (conocida como la IVS, o ARN IVS L-19) y que se ha descrito exhaustivamente en Zaug *et al.*, *Science*, 224: 574-578 (1984); Zaug, *et al.*, *Science*, 231: 470-475 (1986); Zaug *et al.*, *Nature*, 324: 429-433 (1986); Publicación de Patente Internacional N.º WO 88/04300; y Been *et al.*, *Cell*, 47: 207-216 (1986)). Las ribozimas de tipo Cech tienen un sitio activo de ocho pares de bases que hibrida con una secuencia de ARN diana después de lo cual tiene lugar la escisión del ARN diana. En un aspecto, el método desvelado emplea esas ribozimas de tipo Cech que se dirigen a secuencias de sitios activos de ocho pares de bases que están presentes en un gen diana o secuencia de ácido nucleico.
- Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad y la dirección) y pueden sintetizarse químicamente o producirse mediante un vector de expresión. Debido a que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una menor concentración intracelular para su eficacia. Adicionalmente, en ciertos aspectos, una ribozima puede diseñarse identificando en primer lugar una parte de secuencia suficiente para provocar la inactivación eficaz por ARNi. Después pueden incorporarse partes de la misma secuencia en una ribozima.
- Como alternativa, la expresión génica diana puede reducirse dirigiendo secuencias desoxirribonucleotídicas complementarias de la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o los potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen en células diana en el cuerpo (véase en general Helene, C., *Anticancer Drug Des.*, 6: 569-84 (1991); Helene *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 660: 27-36 (1992); y Maher, L. J., *Bioassays*, 14: 807-15 (1992)).
- Las moléculas de ácido nucleico para usar en la formación de triple hélice para la inhibición de la transcripción son preferentemente monocatenarias y están compuestas de desoxirribonucleótidos. La composición básica de estos oligonucleótidos debería promover la formación de triple hélice mediante las reglas de formación de pares de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren que estén presentes tramos considerables de purinas o pirimidinas en una cadena de una doble cadena. Las secuencias de nucleótidos pueden estar basadas en pirimidina, lo que dará como resultado tripletes de TAT y CGC entre las tres cadenas asociadas de la triple hélice resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan complementariedad de bases con una región rica en purina de una única cadena de la doble cadena en una orientación paralela a esa cadena. Además, pueden seleccionarse moléculas de ácido nucleico que son ricas en purina, por ejemplo, que contienen un tramo de restos G. Estas moléculas formarán una triple hélice con una doble cadena de ADN que sea rica en pares de GC, en la que la mayoría de los restos de purina se localizan en una única cadena de la doble cadena dirigida, dando como resultado tripletes de CGC entre las tres cadenas en la triple cadena.
- Como alternativa, las secuencias diana a las que puede dirigirse la formación de triple hélice pueden aumentarse creando una molécula de ácido nucleico denominada "en zigzag". Las moléculas en zigzag se sintetizan de una manera 5'-3', 3'-5' alternante, de modo que forman pares de bases primero con una cadena de una doble cadena y después con la otra, eliminando la necesidad de que esté presente un tramo considerable de purinas o pirimidinas en una cadena de una doble cadena.
- Como alternativa, pueden usarse enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen diana, tal como el gen de esclerostina. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas de las tecnologías tanto antisentido como de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia de ácido nucleico diana particular, de forma muy similar a un oligonucleótido antisentido. Son, sin embargo, también catalíticas y específicamente escinden el ácido nucleico diana.
- Las enzimas de ADN incluyen dos tipos básicos identificadas por Santoro y Joyce (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 6.110.462). La enzima de ADN 10-23 comprende una estructura en bucle que conecta dos ramas. Las dos ramas proporcionan especificidad reconociendo la secuencia de ácido nucleico diana particular mientras que la estructura en bucle proporciona función catalítica en condiciones fisiológicas.
- Preferentemente, la secuencia única o sustancialmente única es un segmento rico en G/C de aproximadamente 18 a 22 nucleótidos. El contenido alto en G/C ayuda a asegurar una interacción más fuerte entre la enzima de ADN y la secuencia diana. La secuencia de reconocimiento antisentido específica que dirigirá la enzima al mensaje puede dividirse entre las dos ramas de la enzima de ADN.
- Pueden encontrarse métodos para preparar y administrar enzimas de ADN, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.110.462. Adicionalmente, un experto en la materia reconocerá que, como el oligonucleótido antisentido, las enzimas de ADN pueden modificarse opcionalmente para mejorar la estabilidad y mejorar la resistencia a la degradación.
- Pueden administrarse oligonucleótidos inhibidores directamente o suministrarse a células por transformación o transfección mediante un vector, incluyendo vectores o plásmidos virales, en los que se ha colocado ADN que codifica el oligonucleótido inhibidor con las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo un promotor, para dar

como resultado la expresión del oligonucleótido inhibidor en la célula deseada. Los métodos conocidos incluyen transfección transitoria convencional, transfección estable y suministro usando virus que varían de retrovirus a adenovirus. Se contempla el suministro de inhibidores de ácido nucleico por replicación o vectores deficientes en replicación. La expresión también puede conducirse por sistemas promotores constitutivos o inducibles (Paddison *et al.*, Methods Mol. Biol., 265: 85-100 (2004)). En otros aspectos, la expresión puede estar bajo el control de promotores específicos de tejido o desarrollo.

Por ejemplo, pueden introducirse vectores por transfección usando composiciones vehículo tales como Lipofectamine 2000 (Life Technologies) u Oligofectamine (Life Technologies). La eficacia de transfección puede comprobarse usando microscopía de fluorescencia para líneas celulares de mamífero después de cotransfección de pAD3 que codifica hGFP (Kehlenback *et al.*, J. Cell Biol., 141: 863-74 (1998)).

La vía de suministro será la que proporcione el mejor efecto inhibidor como se mide de acuerdo con los criterios descritos anteriormente. Son eficaces el suministro mediado por liposomas catiónicos, suministro por vectores retrovirales y suministro directo.

La eficacia del oligonucleótido inhibidor puede evaluarse por cualquiera de varios ensayos, incluyendo reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa o análisis de transferencia de Northern para determinar el nivel de ARNm de esclerostina humana existente, o análisis de transferencia de Western usando anticuerpos que reconocen la proteína de esclerostina humana, después de un tiempo suficiente para la renovación del grupo endógeno después de reprimirse la síntesis de nueva proteína.

La invención se describe adicionalmente en el siguiente ejemplo. El ejemplo sirve únicamente para ilustrar la invención y no pretende limitar el ámbito de la invención de ninguna manera.

Ejemplo

Este ejemplo describe estudios *in vivo* donde un agente de unión a esclerostina redujo el nivel de un marcador de reabsorción del hueso y aumentó el nivel de uno o más marcadores de la formación del hueso.

Se analizó un estudio en único centro, aleatorio, de doble ciego, controlado por placebo, de dosis individual ascendente en hombres sanos y mujeres posmenopáusicas. Se admitieron aproximadamente 72 sujetos en una de seis cohortes de dosis. Para las cohortes 1, 2, 3a, 4, 5 y 6a, se seleccionaron aleatoriamente ocho mujeres postmenopáusicas sanas para recibir un agente de unión a esclerostina o placebo mediante inyección subcutánea en una relación 3:1 a niveles de dosis de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg, respectivamente. En las cohortes 3b y 6b, 8 hombres sanos recibieron el agente de unión a esclerostina o un placebo por vía intravenosa y por vía subcutánea en una relación 3:3:1:1 (agente de unión a esclerostina por vía intravenosa: agente de unión a esclerostina por vía subcutánea: placebo por vía intravenosa: placebo por vía subcutánea) a un nivel de dosis de 1 mg/kg o 10 mg/kg (reducido a 5 mg/kg), respectivamente. Para las cohortes 3c y 6c, se seleccionaron aleatoriamente cuatro mujeres postmenopáusicas sanas para recibir el agente de unión a esclerostina o placebo por vía intravenosa en una relación 3:1 a un nivel de dosis de 1 mg/kg o 10 mg/kg (reducido a 5 mg/kg), respectivamente.

La terapia antiesclerostina se controló midiendo los niveles de marcadores de reabsorción del hueso y marcadores de formación del hueso antes de la administración, después al menos cada semana durante 12 semanas después de la administración. Se controlaron los niveles de P1NP y BSAP después de una administración subcutánea de una única dosis de agente de unión de esclerostina en mujeres postmenopáusicas sanas (véase Figuras 1 y 2). Los sujetos a los que se administró dosis a 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg disfrutaron de la mayor elevación de los niveles de P1NP o BSAP (por ejemplo, niveles aumentados menos del 20 %).

Los niveles de P1NP en sujetos a los que se administró 1 mg/kg aumentaron aproximadamente el 20 % el Día 10 y gradualmente disminuyeron hasta la línea basal aproximadamente el Día 56, mientras que los niveles de BSAP alcanzaron el máximo el Día 14 a aproximadamente 30 % por encima de la línea basal. Los niveles de P1NP y BSAP en sujetos a los que se administraron 3 mg/kg alcanzaron un máximo del Día 21 a aproximadamente 100 % (P1NP) y 60 % (BSAP) de aumento desde la línea basal, y volvieron a la línea basal aproximadamente el Día 56. En sujetos a los que se administraron 5 mg/kg, el nivel de P1NP se elevó a aproximadamente 140 % por encima de la línea basal el Día 14 después de la administración, y permaneció elevado el Día 77. En otras palabras, el nivel de P1NP aumentó aproximadamente 140 % en dos semanas después del tratamiento. El BSAP aumentó a aproximadamente 115 % por encima de la línea basal y permaneció elevado el Día 84. De forma similar, la administración de 10 mg/kg desencadenó un aumento de 180 % en los niveles de P1NP aproximadamente el Día 28. Los niveles de P1NP permanecieron elevados durante todo el periodo de control. Los sujetos a los que se administraron 10 mg/kg demostraron un aumento máximo de los niveles de BSAP el Día 21 (125 % de la línea basal durante 3 semanas después de la administración), que también permanecieron elevados el Día 84. Los resultados del estudio se ilustran en las Figuras 1 y 2.

También se controló la osteocalcina después de una administración subcutánea, de una única dosis de agente de

uniión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas sanas (véase Figura 3). Los sujetos a los que se proporcionaron menos de 1 mg/kg experimentaron poca elevación de osteocalcina. Los niveles de osteocalcina fluctuaron en pacientes a los que se administró 1 mg/kg, alcanzando un máximo a aproximadamente 30 % por encima de la línea basal los Días 21 y 35. Los niveles de osteocalcina alcanzaron un máximo a aproximadamente el 100 % por encima de la línea basal el Día 21 en sujetos a los que se administraron 3 mg/kg, y los niveles permanecieron elevados hasta aproximadamente el Día 56. De forma similar, la administración de 5 mg/kg de agente de unión a esclerostina dio como resultado un aumento del 140 % en niveles de osteocalcina el día 28, cuyos niveles permanecieron el Día 84. Los sujetos a los que se administró una dosis de 10 mg/kg demostraron un nivel de osteocalcina máximo de aproximadamente 180 % por encima de la línea basal el Día 35. Los niveles de osteocalcina permanecieron elevados por encima de la línea basal hasta al menos aproximadamente el Día 77.

Los niveles del marcador de reabsorción del hueso sCTX también se controlaron (véase Figura 4). Los sujetos a los que se administró placebo y 0,1 mg/kg demostraron reducciones modestas de los niveles de sCTX (por ejemplo, menos del 20 %). La administración de 0,3 mg/kg de agente de unión a esclerostina redujo los niveles de sCTX en aproximadamente el 20 % el Día 21 (es decir, los niveles de sCTX se redujeron aproximadamente el 20 % a las dos semanas después del tratamiento). Los niveles fluctuaron en sujetos a los que se administró una dosis de 1 mg/kg pero alcanzaron aproximadamente el 30 % por debajo de la línea basal los Días 10, 28 y 49. Los niveles en los sujetos a los que se administraron 3 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg cayeron al mínimo el Día 14 a aproximadamente 35 %, 55 % y 55 % por debajo de la línea basal, respectivamente, y los niveles permanecieron por debajo de la línea basal cuando se controlaron a continuación. Se proporciona una comparación de los niveles de todos los biomarcadores controlados en la Figura 5.

Los niveles de calcio ionizado en suero se controlaron después de una única dosis subcutánea de agente de unión a esclerostina en mujeres postmenopáusicas sanas (véase Figura 6). Notablemente, los niveles de calcio ionizado no fluctuaron drásticamente a ninguna dosificación. De hecho, todos los sujetos (incluyendo los que recibieron placebo) experimentaron una reducción transitoria modesta en el calcio ionizado en suero de aproximadamente el 5 % durante el periodo de control.

Finalmente, se midió la densidad mineral del hueso en la columna y cadera de mujeres postmenopáusicas sanas, que recibieron 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, o 10 mg/kg de agente de unión a esclerostina (véase Figura 7). Se observaron aumentos significativos de BMD en la columna, por ejemplo, los Días 28, 56 y 84, particularmente en pacientes que recibieron 5 mg/kg y 10 mg/kg. La BMD en la cadera aumentó menos que la de la columna, pero la BMD se elevó el Día 56 en pacientes a los que se administraron 3 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg. La BMD se elevó más el Día 84 en pacientes a los que se administró una dosis de 5 mg/kg y 10 mg/kg.

Este ejemplo ilustra la capacidad del método de la invención para reducir los niveles de un marcador de reabsorción del hueso, elevar los niveles de marcadores de la formación del hueso y aumentar la densidad mineral ósea sin alteraciones drásticas en el calcio en suero. El efecto terapéutico de una única dosis de agente de unión a esclerostina es de larga duración, continuando observándose niveles de marcadores de la formación del hueso aumentados y niveles de marcadores de reabsorción del hueso reducidos a los 84 días (12 semanas) después del tratamiento. Además, los datos descritos en el presente documento sugieren que la eficacia terapéutica de la invención tiene ventajas significativas en comparación con otros tratamientos por “desacoplamiento” de la formación del hueso y la reabsorción del hueso para maximizar la formación y mineralización del hueso *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antiesclerostina o fragmento del mismo para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con el hueso mediante el aumento de la densidad mineral ósea en un ser humano, comprendiendo el método administrar al ser humano el anticuerpo antiesclerostina o fragmento del mismo en una cantidad de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, donde el anticuerpo antiesclerostina o fragmento del mismo bloquea de forma cruzada la unión a esclerostina del anticuerpo Ab-4 que tiene una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 137 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 133, o del anticuerpo Ab-13 que tiene una secuencia de la cadena pesada de SEQ ID NO: 209 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO: 205.
- 5 2. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en que:
- (a) el método inhibe la reabsorción ósea;
 - (b) el ser humano es uno en el que el tratamiento con una hormona paratiroidea o un análogo de la misma está contraindicado o un ser humano en el que el tratamiento con bisfosfonato está contraindicado; o
 - 10 (c) el ser humano es uno que padece o está en riesgo de hipocalcemia o hipercalcemia.
- 15 3. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 2, en que el ser humano que padece o está en riesgo de hipocalcemia o hipercalcemia tiene hipocalcemia o hipercalcemia como resultado de enfermedad renal crónica, insuficiencia renal, hiperparatiroidismo primario o secundario, seudohiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo, seudohipoparatiroidismo, agotamiento de magnesio, hipermagnesemia grave, deficiencia de vitamina D, hiperfosfatemia, pancreatitis aguda, síndrome del hueso hambriento, quelación, metástasis osteoblástica, sepsis, cirugía, quimioterapia, síndrome de neoplasia, hipoparatiroidismo, hipercalcemia hipocalciúrica familiar, sarcoidosis, tuberculosis, beriliosis, histoplasmosis, Candidiasis, Coccidioidomycosis, histiocitosis X, Linfoma de Hodgkin o no de Hodgkin, enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener, neumonía, granulomas inducidos por silicona, administración de diuréticos de tiazida o litio, o inmovilización.
- 20 4. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en que:
- 25 (A) el método es uno en que la cantidad de anticuerpo es eficaz para reducir el nivel en suero de telopeptido C de colágeno de tipo I (CTX) en al menos el 20 %, en comparación con los niveles pretratamiento o normales, a las 3 semanas después de comenzar el tratamiento y en que la reabsorción ósea está inhibida;
 - (B) el método es uno en que la cantidad de anticuerpo es eficaz para (a) reducir el nivel en suero de CTX en al menos el 20 % en comparación con los niveles pretratamiento o normales, a las 3 semanas después de comenzar el tratamiento, y (b) aumentar el nivel en suero de un marcador de formación del hueso seleccionado del grupo que consiste en nivel en suero de fosfatasa alcalina específica del hueso (BSAP), nivel en suero de la extensión amino terminal del péptido de procolágeno de tipo 1 (PINP) y nivel en suero de osteocalcina (OstCa), en al menos el 20 %, en comparación con los niveles pretratamiento o normales, a las 3 semanas después de comenzar el tratamiento; o
 - 30 (C) el método comprende: (a) administrar al ser humano el anticuerpo durante un primer periodo de tiempo, donde la cantidad es eficaz para aumentar la densidad mineral ósea en la cadera, columna, muñeca, dedo, tibia y/o talón en al menos aproximadamente el 3 %, y (b) administrar al sujeto un anticuerpo antiesclerostina en una cantidad de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg durante un segundo periodo de tiempo eficaz para mantener la densidad mineral ósea.
- 35 5. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en que:
- (a) la cantidad de anticuerpo antiesclerostina administrada es de aproximadamente 2 mg/kg o de aproximadamente 3 mg/kg;
 - (b) el anticuerpo se administra al sujeto una vez cada dos semanas; o
 - 40 (c) el anticuerpo se administra al sujeto una vez al mes.
- 45 6. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende: a) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 54, 55 y 56 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 51, 52 y 53; b) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 60, 61 y 62 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 57, 58 y 59; c) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 48, 49 y 50 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 45, 46 y 47; d) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 42, 43 y 44 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 39, 40 y 41; e) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 275, 276 y 277 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 287, 288 y 289; f) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 278, 279 y 280 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 290, 291 y 292; g) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 78, 79 y 80 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 245, 246 y 247; h) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 81, 99 y 100 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 248, 249 y 250; i) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 101, 102 y 103 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 251, 252 y 253; j) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 104, 105 y 106 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 254, 255 y 256; k) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 107, 108 y 109 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 257, 258 y 259; l) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 110, 111 y 112 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 260, 261 y 262; m) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 281, 282 y 283 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 293, 294 y 295; n) secuencias de CDR de

- SEQ ID NO: 113, 114 y 115 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 263, 264 y 265; o) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 284, 285 y 286 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 296, 297 y 298; p) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 116, 237 y 238 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 266, 267 y 268; q) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 239, 240 y 241 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 269, 270 y 271; r) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 242, 243 y 244 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 272, 273 y 274; o s) secuencias de CDR de SEQ ID NO: 351, 352 y 353 y secuencias de CDR de SEQ ID NO: 358, 359 y 360.
7. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 6, donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende la CDRH-1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1 CDR-L2 y CDR-L3 donde (a) CDR-H1 es SEQ ID NO: 245, CDR-H2 es SEQ ID NO: 246, CDR-H3 es SEQ ID NO: 247, CDR-L1 es SEQ ID NO: 78, CDR-L2 es SEQ ID NO: 79 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 80; o (b) CDRH1 es SEQ ID NO: 269, CDR-H2 es SEQ ID NO: 270, CDR-H3 es SEQ ID NO: 271, CDR-L1 es SEQ ID NO: 239, CDRL2 es SEQ ID NO: 240 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 241.
8. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo antiesclerostina comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 245, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 246, una CDR-H3 de SEQ ID NO: 247, una CDR-L1 de SEQ ID NO: 78, una CDRL-2 de SEQ ID NO: 79 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 80.
9. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde:
- (a) el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo químérico; o
(b) el anticuerpo demuestra una afinidad de unión por la esclerostina de SEQ ID NO: 1 de menos de o igual a 1×10^{-9} M.
10. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el ser humano padece un trastorno relacionado con el hueso seleccionado del grupo que consiste en acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, Enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, síndrome de Marfan, exostosis hereditarias múltiples, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, seudoartrosis, osteomielitis piógena, enfermedad periodontal, pérdida de hueso inducida por fármaco antiepileptico, hiperparatiroidismo primario y secundario, síndromes de hiperparatiroidismo familiar, pérdida de hueso inducida por ingratidez, osteoporosis en hombres, pérdida de hueso postmenopáusica, osteoartritis, osteodistrofia renal, trastornos infiltrantes del hueso, pérdida de hueso oral, osteonecrosis de la mandíbula, enfermedad juvenil de Paget, melorreostosis, enfermedades óseas metabólicas, mastocitosis, enfermedad/anemia falciforme, pérdida de hueso relacionada con trasplante de órganos, pérdida de hueso relacionada con trasplante de riñón, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, epilepsia, artritis juvenil, talasemia, mucopolisacaridosis, Enfermedad de Fabry, Síndrome de Turner, Síndrome de Down, Síndrome de Klinefelter, lepra, Enfermedad de Perthes, escoliosis idiopática adolescente, enfermedad inflamatoria multisistémica de aparición infantil, Síndrome de Winchester, Enfermedad de Menkes, Enfermedad de Wilson, enfermedad ósea isquémica (tal como la enfermedad de Legg-Calve-Perthes, osteoporosis migratoria regional), estados anémicos, afecciones provocadas por esteroides, pérdida de hueso inducida por glucocorticoides, pérdida de hueso inducida por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis, osteopenia, alcoholismo, enfermedad hepática crónica, estado posmenopáusico, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, colitis inflamatoria, enfermedad de Crohn, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, trastornos tiroideos, trastornos paratiroides, enfermedad de Cushing, acromegalía, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional, osteomalacia, pérdida de hueso asociada con el reemplazo de articulaciones, pérdida de hueso asociada con VIH, pérdida de hueso asociada con pérdida de hormona del crecimiento, pérdida de hueso asociada con fibrosis quística, pérdida de hueso asociada con quimioterapia, pérdida de hueso inducida por tumor, pérdida de hueso relacionada con cáncer, pérdida de hueso ablativa hormonal, mieloma múltiple, pérdida de hueso inducida por fármaco, anorexia nerviosa, pérdida de hueso facial asociada con enfermedad, pérdida de hueso craneal asociada con enfermedad, pérdida de hueso del cráneo asociada con enfermedad, pérdida de hueso facial asociada con envejecimiento, pérdida de hueso craneal asociada con envejecimiento, pérdida de hueso de la mandíbula asociada con envejecimiento, pérdida de hueso del cráneo asociada con envejecimiento y pérdida de hueso asociada con viaje espacial.
11. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ser humano es una mujer postmenopáusica.
12. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ser humano padece osteoporosis.
13. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que reduce la unión a la esclerostina de Ab-4 o Ab-13 entre el 40 % y el 100 %, el 60 % y el 100 %, el 70 % y el 100 % o el 80 % y el 100 %.

**Aumento relacionado con la dosis observado en PiNP
después de administración SC en dosis individual de Sci-Mab
a mujeres postmenopáusicas sanas**

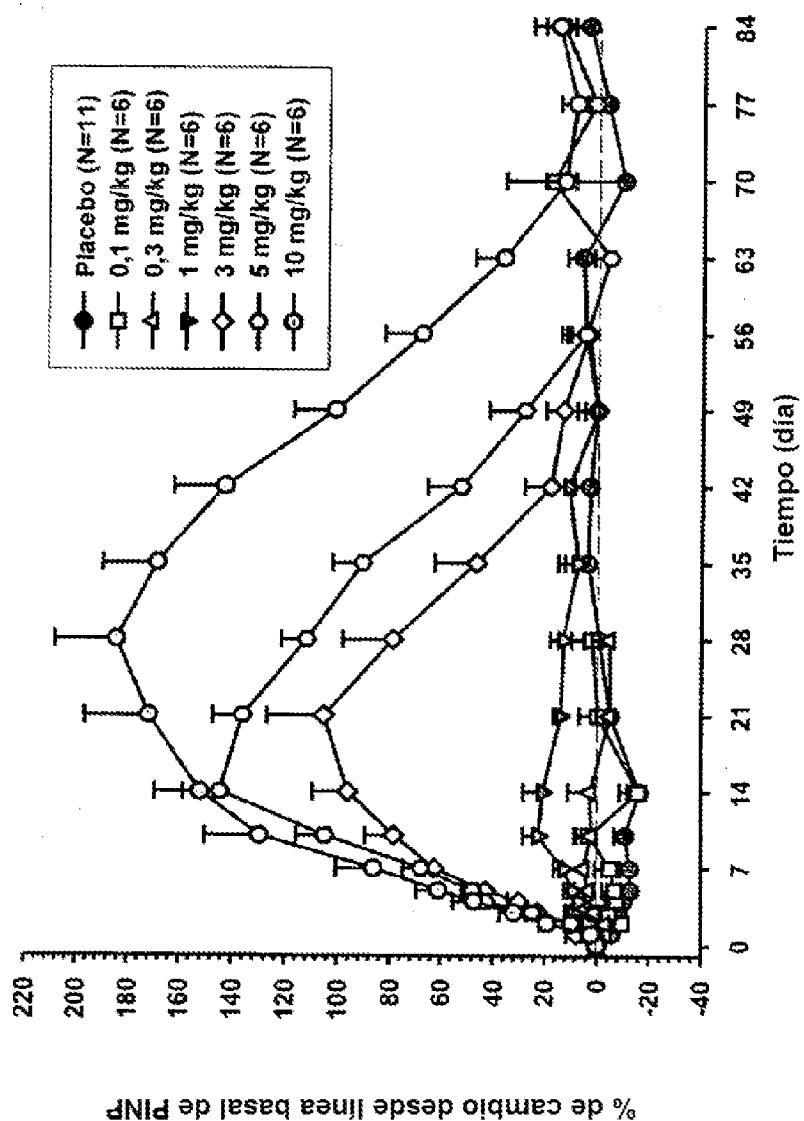


FIGURA 1

**Aumento relacionado con la dosis observado en BSAP
después de la administración SC en dosis individual de Sci-Mab
a mujeres postmenopáusicas sanas**

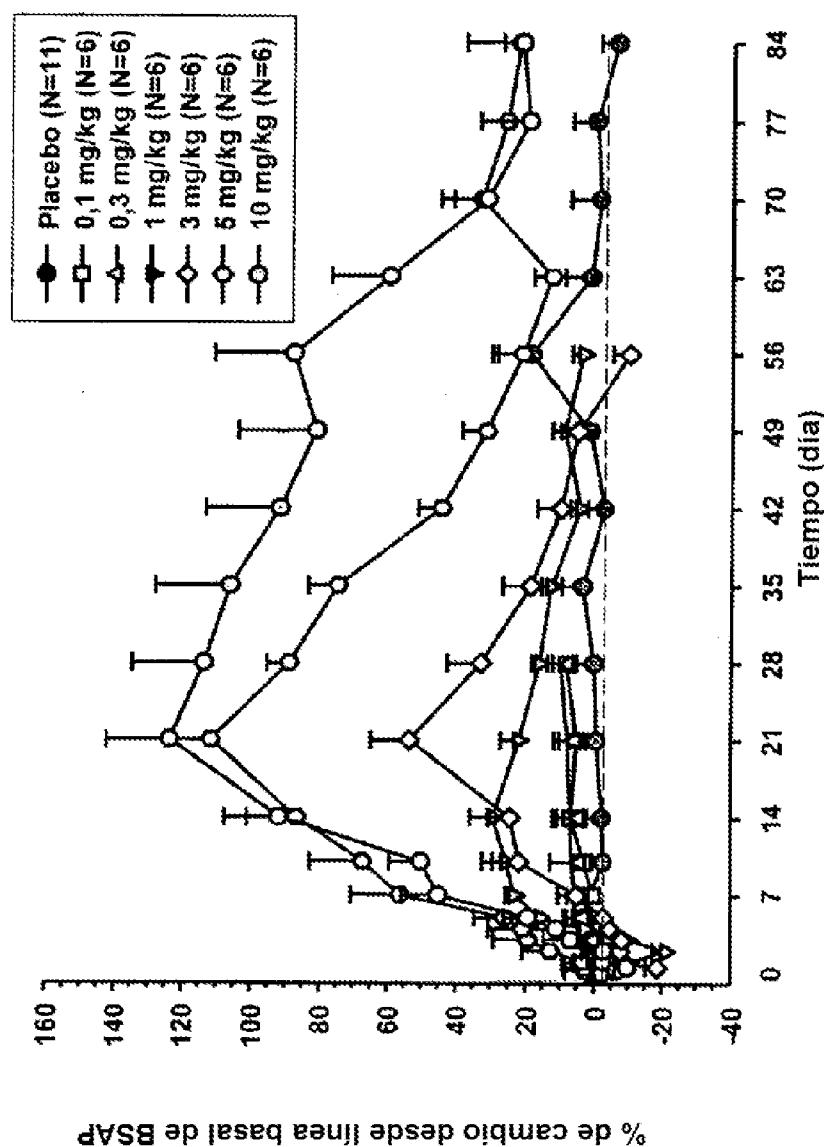


FIGURA 2

Aumento relacionado con la dosis observado en osteocalcina después de administración SC en dosis individual de Sci-Mab a mujeres postmenopáusicas sanas

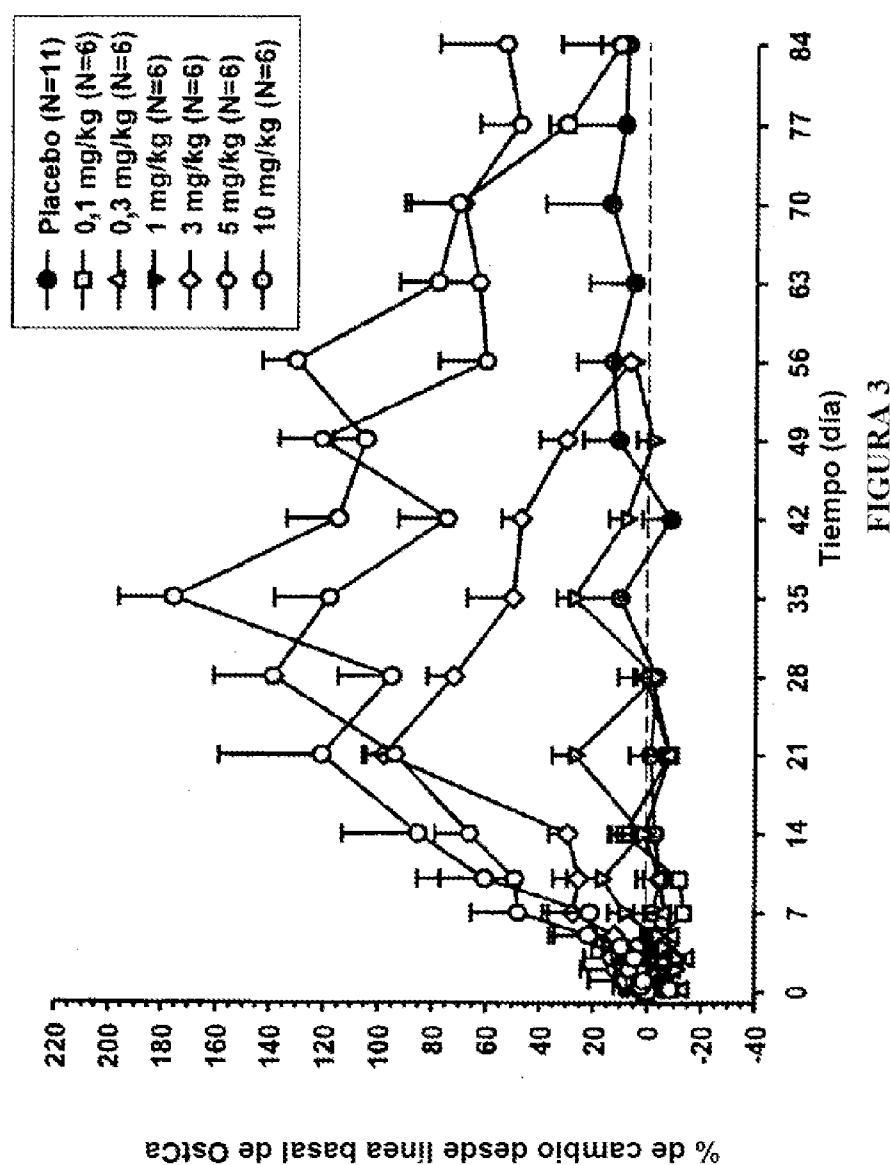


FIGURA 3

**Reducción relacionada con la dosis en sCTx
después de administración SC en dosis individual de Sci-Mab
a mujeres postmenopáusicas sanas**

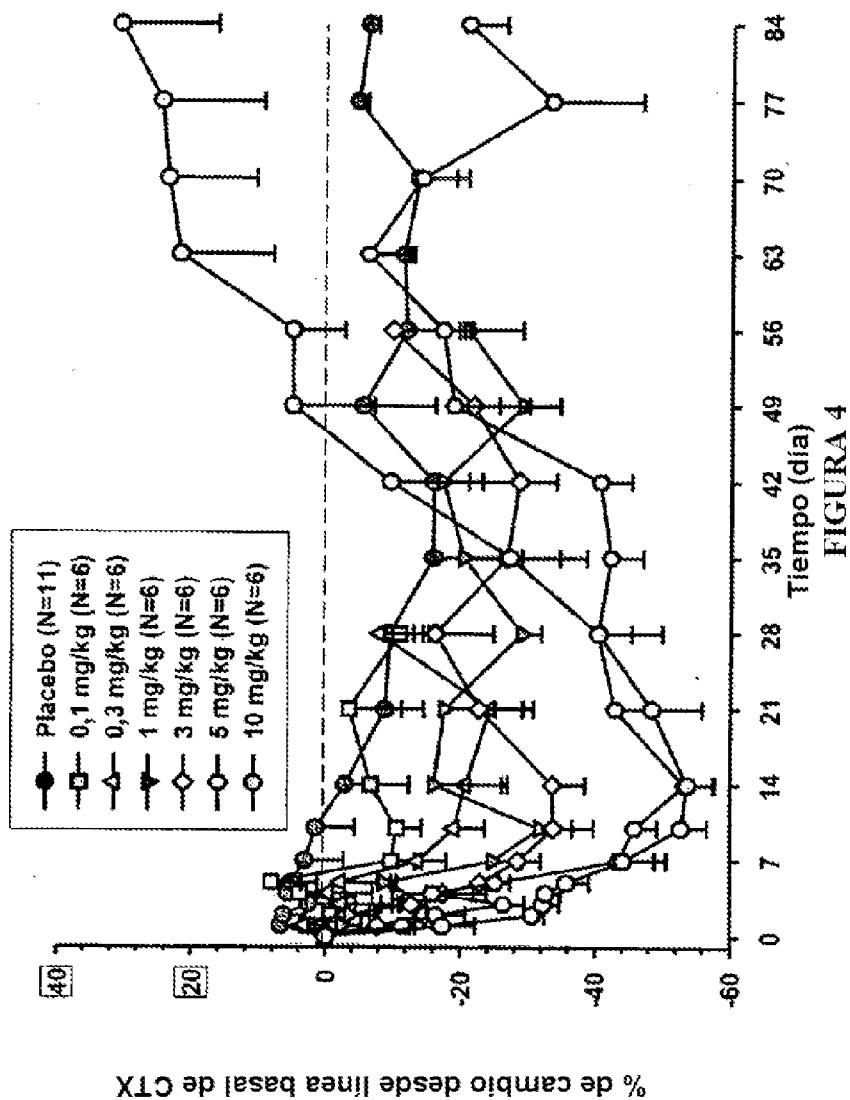


FIGURA 4

Ventana anabólica grande después de dosis SC individuales de 5 y 10 mg/kg de Sci-Mab a mujeres postmenopáusicas sanas

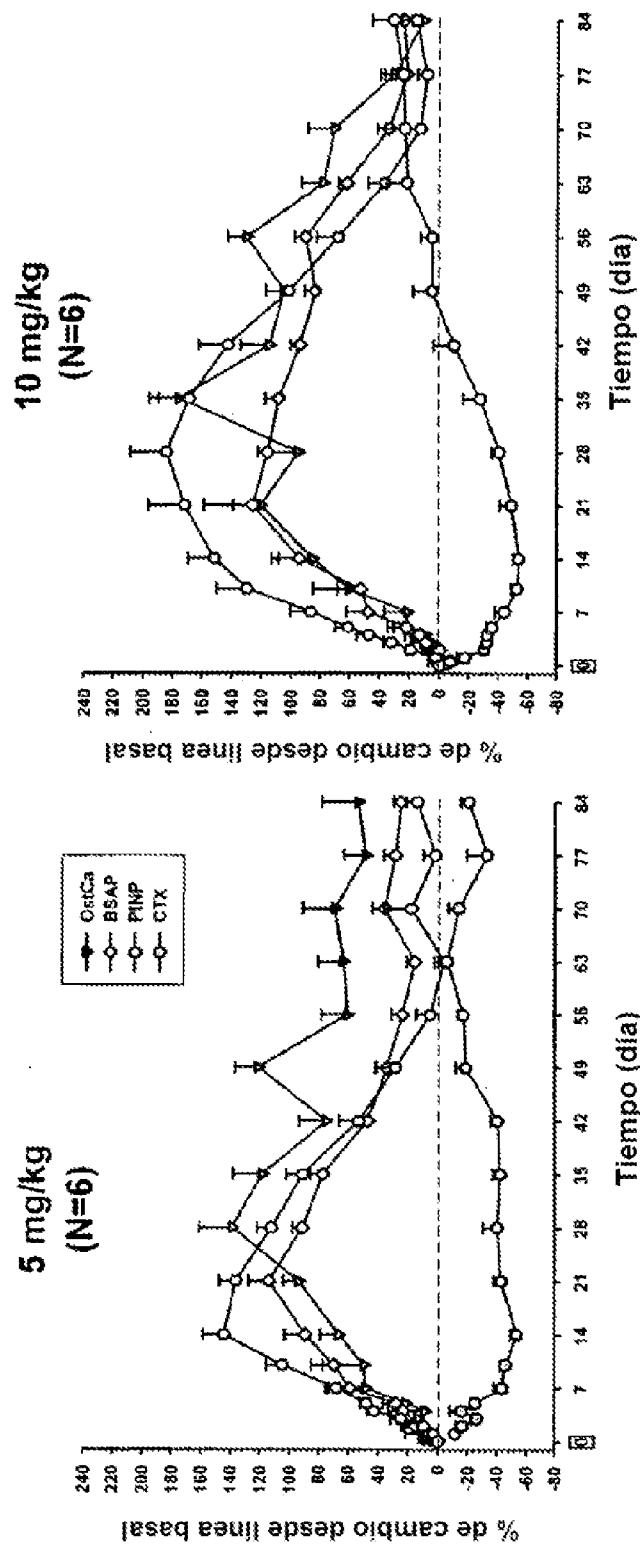


FIGURA 5

**Sin cambios clínicamente significativos en el calcio
en suero después de administración SC en dosis individual
de ScI-Mab a mujeres postmenopáusicas sanas**

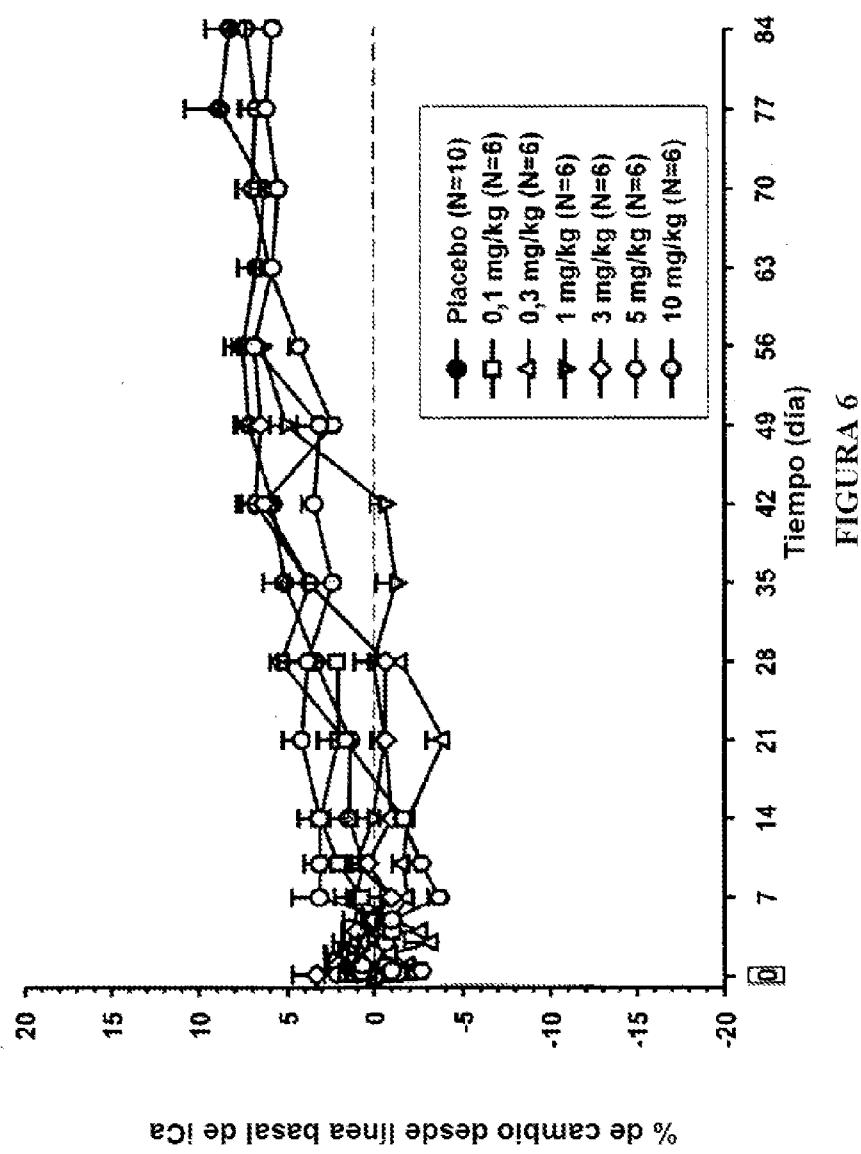


FIGURA 6

Las dosis individuales de Sci-Mab dieron como resultado un aumento de BMD en mujeres postmenopáusicas sanas

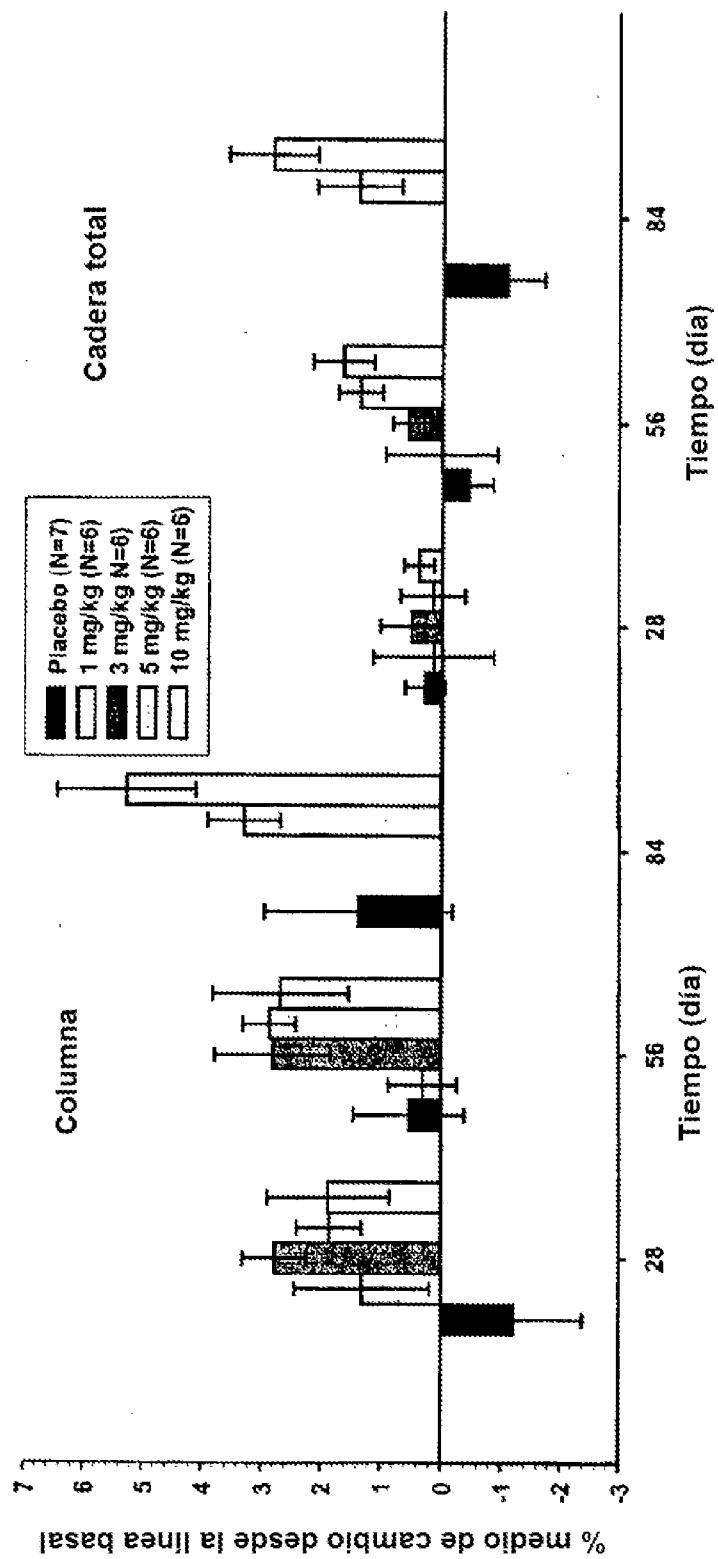


FIGURA 7