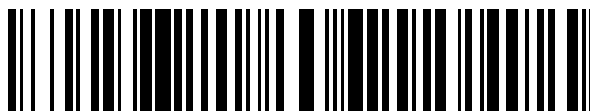


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 626**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011** **E 17169408 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020** **EP 3219725**

54 Título: **Anticuerpos DKK1 y métodos de uso**

30 Prioridad:

**27.10.2010 US 407128 P**

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

**11.10.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RICHARDS, WILLIAM GLEASON;**  
**LU, HSIENG SEN;**  
**KE, HUA ZHU;**  
**LI, CHAOYANG y**  
**JACOBSEN, FREDERICK W.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 863 626 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos DKK1 y métodos de uso

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. Nº 61/407.128, presentada el 27 de octubre de 2010.

- 5 La presente solicitud está siendo presentada junto con un listado de secuencias en formato electrónico.

## CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a agentes de unión selectivos para la proteína dickkopf-1 (DKK1) y, más particularmente, a anticuerpos y dominios de unión a antígenos y regiones CDR que median en la unión selectiva a proteínas DKK1.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Durante la vida de un individuo se producen dos o tres fases distintas de cambios en la masa ósea (véase Riggs, West J. Med. 154:63 77 (1991)). La primera fase se produce tanto en hombres como en mujeres y prosigue a la consecución de una masa ósea pico. Esto se logra a través del crecimiento lineal de las placas de crecimiento endocondral y crecimiento radial debido a una tasa de aposición perióstica. La segunda fase se inicia alrededor de los 30 años de edad para el hueso trabecular (huesos planos que se encuentran más comúnmente en las vértebras y la pelvis) y alrededor de los 40 años de edad para el hueso cortical (p. ej., que se encuentra predominantemente en huesos largos tales como en las extremidades)
- 15 y continúa hasta la vejez. Esta fase se caracteriza por pérdida ósea lenta y se produce tanto en hombres como en mujeres. En mujeres, también se produce una tercera fase de pérdida ósea, lo más probablemente debido a deficiencias de estrógeno postmenopáusicas. Durante esta fase sola, las mujeres pueden perder una masa ósea adicional del hueso cortical y del compartimiento trabecular (véase Riggs, supra).
- 20 La pérdida de contenido mineral del hueso puede ser provocado por una variedad amplia de afecciones y puede resultar en problemas médicos importantes. Por ejemplo, la osteoporosis es una enfermedad debilitante en seres humanos y se caracteriza por disminuciones marcadas en la masa ósea esquelética y la densidad mineral, deterioro estructural del hueso, incluyendo degradación de la microarquitectura ósea e incrementos correspondientes en la fragilidad ósea (esto es, disminuciones en la resistencia ósea), y susceptibilidad a fracturas en individuos afectados. La osteoporosis en seres
- 25 humanos va generalmente precedida por una osteopenia clínica (densidad mineral ósea que es mayor que una desviación estándar, pero menor que 2,5 desviaciones estándares por debajo del valor medio para huesos de adultos jóvenes), una afección encontrada en aproximadamente 25 millones de personas en los Estados Unidos. Otros 7-8 millones de pacientes en los Estados Unidos han sido diagnosticados con osteoporosis clínica (definida como contenido mineral óseo mayor que 2,5 desviaciones estándares por debajo del hueso en adultos jóvenes maduros). La frecuencia de osteoporosis en la población humana aumenta con la edad. Entre los caucásicos, la osteoporosis es predominante en mujeres quienes, en los Estados Unidos, comprenden el 80% del grupo de pacientes con osteoporosis. La susceptibilidad y fragilidad incrementada a fracturas del hueso esquelético en los ancianos se agrava por el riesgo mayor de caídas accidentales en esta población. Las caderas, muñecas y vértebras fracturadas están entre las lesiones más comunes asociadas con la osteoporosis. Las fracturas de caderas, en particular, son extremadamente incómodas y caras para el paciente, y para las
- 30 mujeres. se correlacionan con tasas altas de mortalidad y morbilidad.

- Aunque la osteoporosis ha sido considerada como un incremento en el riesgo de fractura debido a una masa ósea disminuida, pocos de los tratamientos actualmente disponibles para trastornos esqueléticos pueden incrementar la densidad ósea de los adultos, y la mayoría de los tratamientos actualmente disponibles trabajan principalmente inhibiendo la resorción ósea adicional en vez de estimular la formación de nuevo hueso. El estrógeno está siendo ahora prescrito
- 40 para retardar la pérdida ósea. Sin embargo, existe alguna controversia sobre si los pacientes obtienen algún beneficio a largo plazo y si el estrógeno tiene algún efecto en los pacientes mayores de 75 años de edad. La calcitonina, osteocalcina con vitamina K o dosis altas de calcio en la dieta, con o sin vitamina D, también han sido sugeridas para mujeres postmenopáusicas. Las dosis altas de calcio, sin embargo, tienen a menudo efectos colaterales gastrointestinales indeseados, y los niveles de calcio en la orina y suero deben vigilarse continuamente (p. ej., Khosla y Riggs, Mayo Clin. Proc. 70:978982, 1995).
- 45

Otros enfoques terapéuticos actuales para la osteoporosis incluyen bisfosfonatos (p. ej., Fosamax<sup>TM</sup>, Actonel<sup>TM</sup>, Bonviva<sup>TM</sup>, Zometa<sup>TM</sup>, olpadronato, neridronato, skelid, bonefos), hormona paratiroidea, calcilíticos, esteroides anabólicos, sales de lantano y estroncio, y fluoruro de sodio. Agentes terapéuticos de este tipo, sin embargo, se asocian a menudo con efectos colaterales no deseados (véase Khosla y Riggs, supra).

Dickkopf-1 (DKK1) es un miembro de la familia de proteínas dickkopf que han demostrado ser reguladores negativos de señalización Wnt, que tiene un papel central en el desarrollo y la formación del hueso (véase, p. ej., Glinka et al., *Nature* 391:357-62 (1998); Fedi et al., *J Biol Chem* 274(27):19465-72 (1999); Zorn, *Curr Biol* 11:R592-95 (2001); y Krupnik et al., *Gene* 238: 301-13 (1999)). DKK1 inhibe la señalización Wnt a través de su interacción con los co-receptores Wnt LRP5 o LRP6 y las proteínas kremen (véase, por ejemplo, Bafico et al., *Nature Cell Biol* 3:683 (2001); Mao et al., *Nature* 411(17):321 (2001); Mao et al., *Nature* 417:664 (2002); y Semenov et al., *Curr Biol* 11:951-61 (2001). Al unir LRP5 (LRP6) y proteínas kremen, DKK1 previene que LRP5 o LRP6 se asocie con miembros de la vía Wnt y, de esta manera, previene la transducción de señales mediada por Wnt, lo cual, a su vez, resulta en la inhibición de la formación ósea.

El receptor LRP5/6 de DKK1 es una proteína clave para regular la masa ósea (véase, por ejemplo, Gong et al., *Cell* 107:513-23 (2001); Patel, *N Eng J Med* 346(20):1572 (2002)). Un trastorno recesivo autosómico caracterizado por masa ósea baja (síndrome de osteoporosis-pseudoglioma, u "OPPG", por sus siglas en inglés) se ha identificado como que es provocado por mutaciones con pérdida de función en LRP5 (Gong et al., 2001). Además, las mutaciones con ganancia de función en LRP5 han demostrado que resultan en masa ósea alta dominante autosómica en seres humanos (Little et al., *Am J Human Genetics*. 70(1):11-19, 2002). Las mismas mutaciones en LRP5 que resultan en una masa ósea alta pueden interferir con la capacidad de DKK1 de inhibir la señalización de LRP5 (véase, por ejemplo, Boyden et al., *N Eng J Med*. 346(20):1513-1521, 2002). De esta manera, DKK1 se caracteriza apropiadamente por ser un regulador negativo de deposición ósea.

La esclerostina, el producto del gen SOST, está ausente en la esclerosteosis, una enfermedad esquelética ilustrada 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). Inhibidores de la esclerostina han demostrado incrementar la tasa de mineralización ósea y, por lo tanto, la densidad mineral ósea (Padhi et al., *J Bone Miner Res.* junio de 2010; publicado antes de la impresión). Igualmente, DKK1 ha demostrado involucrarse en la regulación de la formación ósea, particularmente al reparar la fractura ósea, y sus papeles en diversas otras enfermedades que se asocian con la pérdida ósea (p. ej., cáncer y diabetes). Anticuerpos anti-DKK1, tales como 11H10, útiles en el tratamiento de trastornos óseos se han descrito, p. ej., en el documento WO 2006/015373 A2.

Dados los inconvenientes de las terapias actuales, existe la necesidad de agentes terapéuticos mejorados en la zona de la pérdida ósea, tal como osteoporosis, y reparación de fracturas mejorada entre otros trastornos óseos.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

Se describen en la presente inhibidores de DKK1 novedosos que son efectivos para tratar afecciones que requieren una formación incrementada del hueso, por ejemplo, reparación de fracturas o pérdida ósea asociada con afecciones patológicas, tales como mieloma múltiple. Además, se proporcionan en la presente combinaciones de agentes que incrementan el anabolismo óseo, incluyendo combinaciones de DKK1 e inhibidores de esclerostina. Estas combinaciones pueden usarse para el tratamiento de, por ejemplo, la osteoporosis, la aceleración de curación de fracturas y cualquier número de afecciones que requieren un incremento en la tasa de la formación ósea. La combinación puede ser de dos inhibidores separados, por ejemplo, un anticuerpo anti-esclerostina y un anticuerpo anti-DKK1, o puede ser una entidad molecular pequeña, por ejemplo, una molécula biespecífica que incluye un anticuerpo biespecífico.

También se proporcionan en la presente anticuerpos que se unen a DKK1. Los agentes anti-DKK1 también pueden bloquear o reducir la unión entre DKK1 y LRP5 y/o LRP6, estimulando con ello al menos una actividad asociada con señalización Wnt. Los agentes pueden ser un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo y, por lo tanto, incluyen anticuerpos con una estructura que se presenta de forma natural, así como polipéptidos que tienen un dominio de unión al antígeno (p. ej., un anticuerpo de dominio). Los anticuerpos y fragmentos pueden usarse para tratar una variedad de diferentes enfermedades incluyendo la prevención o el tratamiento de afecciones relacionadas con la pérdida de masa ósea o para estimular la producción de hueso nuevo. También se describen moléculas de ácido nucleico, vectores y células huéspedes útiles en la producción de los anticuerpos y agentes de unión selectivos.

Algunos de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan incluyen las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de cadena ligera (LC): (i) una CDR1 de LC de SEQ ID NO: 223; (ii) una CDR2 de LC de SEQ ID NO: 224; y (iii) una CDR3 de LC de SEQ ID NO: 225. Algunos de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan incluyen una o más de las CDRs de LC precedentes y las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de cadena pesada (HC): (i) una CDR1 de HC de SEQ ID NO: 226; (ii) una CDR2 de HC de SEQ ID NO: 227; y (iii) una CDR3 de HC de SEQ ID NO: 228.

Anticuerpos o fragmentos de este tipo pueden unir específicamente un polipéptido DKK1. Ciertos anticuerpos o fragmentos incluyen las seis de las CDRs anteriores.

Los anticuerpos o fragmentos son unos que incluyen una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94, y una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

Los anticuerpos o fragmentos que se describen compiten con un anticuerpo, tales como aquellos descritos arriba para la unión específica a un polipéptido DKK1. Por ejemplo, algunos anticuerpos y fragmentos compiten con un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, en donde las cadenas pesadas comprenden la SEQ ID NO: 94 y dichas cadenas ligeras comprenden la SEQ ID NO: 96.

Los diversos anticuerpos y fragmentos que se proporcionan pueden incluir una cadena ligera y/o pesada sencilla o un dominio ligero variable sencillo y/o un dominio pesado variable sencillo. Otros anticuerpos y fragmentos incluyen dos cadenas ligeras y/o dos cadenas pesadas. En aquellos casos en los cuales el anticuerpo o fragmento incluye dos cadenas ligeras y/o pesadas, las dos cadenas ligeras en algunos casos son idénticas entre sí; asimismo, las dos cadenas pesadas en algunos casos son idénticas. Los anticuerpos que se proporcionan pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los fragmentos inmunológicamente funcionales pueden incluir, pero no se limitan a un scFv, un Fab, un Fab', un F(ab')<sup>2</sup>, o un anticuerpo de dominio. En ciertos casos, el anticuerpo o fragmento se disocia de un polipéptido DKK1 con una  $k_d$  ( $k_{inactiv}$ ) de  $5 \times 10^{-4}$  o menos.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los anticuerpos anteriores y fragmentos inmunológicamente activos. Composiciones de este tipo también incluyen típicamente un tampón, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un portador, un solubilizante, un emulsionante o un conservante. También se proporciona el uso de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente activos anteriores en la preparación de una composición farmacéutica o medicamento.

También se proporciona una diversidad de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anteriores. Algunos ácidos nucleicos, por ejemplo, codifican (a) una CDR de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 93; y (b) una CDR de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 95, de manera que la(s) CDR(s) codificadas codifican un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo que puede enlazar específicamente un polipéptido DKK1. También se describen en la presente vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos anteriores, como son células (p. ej., células CHO) que comprenden vectores de expresión de este tipo. También se describen métodos para producir un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo al cultivar células que contienen vectores de expresión de este tipo.

En otro aspecto, se describe el uso de los anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales o una combinación de los mismos en el tratamiento de una diversidad de enfermedades. Ciertos métodos, por ejemplo, implican administrar a un paciente que necesita del mismo una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo o combinaciones tal como se describe en la presente para trauma óseo, incluyendo pero no limitado a procedimientos ortopédicos, procedimientos dentales, cirugía de implantes, reemplazo de articulaciones, injerto óseo, cirugía cosmética ósea y reparación ósea, tales como curación de fracturas, curación de ausencia de unión, curación de unión retardada y reconstrucción facial. Una o más composiciones pueden administrarse antes, durante y/o después del procedimiento, reemplazo, injerto, cirugía o reparación u otros trastornos asociados con daño óseo.

Además se proporcionan en la presente medios para tratar o prevenir la pérdida de masa ósea, que comprenden administrar a un paciente que necesita de los mismos una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional del mismo como se describe en la presente (un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional que comprende al menos una CDR de cadena ligera de la SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 224 y SEQ ID NO: 225, y una CDR de cadena pesada de la SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227 y SEQ ID NO: 228). Aún en otro aspecto, el paciente se selecciona de pacientes que tienen osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, periodontitis, artritis reumatoide, y pérdida ósea debido a la inmovilización. Aún en otras realizaciones, el paciente se selecciona de aquellos que tienen daño óseo, que puede o no puede resultar de una pérdida subyacente de masa ósea tal como aquella provocada por osteoporosis o lesiones osteolíticas asociadas con el cáncer (p. ej., mieloma múltiple). Ejemplos de un daño óseo de este tipo incluyen pero no se limitan a procedimientos ortopédicos, procedimientos dentales, cirugía de implantes, reemplazo de articulaciones (p. ej., reemplazo de cadera, reemplazo de rodilla, etc.), injerto óseo, cirugía cosmética ósea y reparación ósea tal como curación de fracturas, curación de ausencia de unión, curación de unión retardada y reconstrucción facial. Una o más composiciones pueden administrarse antes, durante y/o después del procedimiento, reemplazo, injerto, cirugía o reparación.

Aún en otras realizaciones, el paciente se selecciona de aquellos que tienen pérdida ósea que puede o no puede resultar de una afección tal como aquella provocada por osteoporosis, lesiones osteolíticas asociadas con el cáncer (p. ej., mieloma múltiple).



Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Sitios de epítipo de anticuerpos DKK1 humanos. Se indican sitios de tripsina con flechas de líneas continuas y sitios AspN con flechas de línea punteada. Los sitios de tripsina están en flechas de líneas continuas y los sitios AspN en flechas punteadas. La región de unión para Ab 5.25.1 incluye dos porciones discontinuas, la primera de los aminoácidos 98 hasta 104 y una región de los aminoácidos 107-121 y 127-140. Los últimos tres enlaces disulfuro forman una región de epítipo principal, en donde todos los sitios trípticos pueden protegerse por Ab 5.25.1. ARG102 también se protege de la digestión de tripsina. La eliminación de la posición de aminoácidos 121-125 por tratamiento con CNBr no provoca pérdida de unión. A la región señalada como resistente a digestión de AspN no se puede acceder para la unión de anticuerpo.

Figura 2: Panel A pista 1 solo se incluye LRP6-His; pista 2 rhDKK1-Flag; pista 3 hLRP6-His + hDKK1-Flag; pista 4 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5.80.1; pista 5 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 6.37.5; pista 6 hLRP6-His + hDKK1-Flag + r11H10; pista 7 hLRP6-His+hDKK1-Flag + 5.25.1; pista 8 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5.77.1. Panel B, pista 1 solo se incluye LRP6-His; pista 2 rhDKK1-Flag; pista 3 hLRP6-His + hDKK1-Flag; pista 4 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 0,5 µg de 5.80.1; pista 5 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5 µg de 5.80.1; pista 6 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 0,5 µg de 6.37.5; pista 7 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5 µg de 6.37.5; pista 8 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 0,5 µg de r11H10; pista 9 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5 µg de r11H10; pista 10 hLRP6-His+hDKK1-Flag + 5 µg de 5.25.1; pista 11 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5 µg de 5.77.1.

Figura 3: Muestra el cambio de porcentaje en la densidad mineral ósea de la tibia a las tres semanas para el vehículo, PTH y cantidades diferentes de anticuerpo 2.40.2. La dosis de 20 mg/kg fue significativamente diferente del vehículo.

Figura 4: Anticuerpo 5.32.1 del intervalo 5.25.1 y 5.80.1 del intervalo 11H10 se probaron in vivo en cuanto a su capacidad para incrementar la osteocalcina. A ratones BDF-1 macho de ocho semanas de edad se les inyectaron por vía subcutánea durante un periodo de dos semanas una de tres dosis del anticuerpo monoclonal purificado (3, 10 o 30 mg/kg). Se usaron seis ratones por grupo. A ratones control negativo se les inyectó vehículo (PBS).

Figura 5: A ratones se les inyectaron por vía subcutánea dos veces por semana durante tres semanas 25 mg/kg de los anticuerpos respectivos (6.37.5 y 6.116.6). Se usaron diez ratones por grupo. A los grupos de control se les inyectó vehículo (dos veces por semana) o PTH (100 µg/kg cinco veces por semana). Los datos se presentan como cambio de porcentaje del valor de referencia en la densidad mineral ósea de las vértebras lumbares.

Figura 6: Se realizó un estudio adicional con la agrupación de anticuerpos 11H10 de rata en un modelo de curación de fracturas cerrado de rata. Se utilizó la agrupación de anticuerpos 11H10 completamente de rata r11H10 en este estudio como una molécula sustituta para los anticuerpos completamente humanos descritos en la presente. La mejora en la carga máxima y la BMD alcanzada con tratamiento Anti-DKK1 en el callo de la fractura indica la aceleración de la curación de fracturas.

Figura 7: Se detectó DKK1 en suero aislado de modelos animales de enfermedad y los niveles de proteína DKK1 son aproximadamente cinco veces elevados en 3 semanas después de la inducción de daño al riñón con el agente farmacológico.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se defina en la presente de otra manera, las expresiones y los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden comúnmente por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. Además, a menos que se requiera de otra manera por el contexto, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de ácidos nucleicos y proteínas e hibridación descritas en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique de otra manera. Véase, p. ej., Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se alcanza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente. La terminología usada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en la presente son

aquellos bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. Las técnicas estándares pueden usarse para síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro y tratamiento de pacientes.

Los siguientes términos y expresiones utilizados en esta divulgación, a menos que se indique de otra manera, se entenderá que tienen los siguientes significados:

- 5 “DKK1”, tal como se usa en la presente, incluye, por ejemplo, formas nativas de DKK1 de rata, murinas, de cynomolgus y seres humanos. Se muestran secuencias de nucleótido ejemplares que codifican las proteínas DKK1 de ser humano, murino, rata y cynomolgus, respectivamente, en las SEQ ID NOs: 1, 3, 5 y 7; se muestran las secuencias de aminoácidos correspondientes, respectivamente, en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6 y 8. La proteína DKK1 humana (SEQ ID NO: 2) tiene una secuencia conductora que consiste en los aminoácidos 1-31 de la SEQ ID NO: 2. Una secuencia de proteína DKK1 de rata ejemplar se enumera en el Acceso a GenBank XP219804. El término también incluye variantes de tales secuencias nativas que son reactivas inmunológicamente cruzadas con estas proteínas nativas. Estas proteínas pueden inhibir la interacción entre LRP5 o LRP6 con Wnt. El término también se puede referir a un fragmento de una forma nativa o variante de DKK1 que contiene un epítipo al cual puede unirse específicamente un anticuerpo.
- 10
- 15 El término “polinucleótido” o la expresión “ácido nucleico” significa polímeros de cadena sencilla o de doble cadena. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones base tales como derivados de bromouridina e inosina, modificaciones de ribosa, tales como 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de enlace de internucleótidos, tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término incluye tanto formas de cadena sencilla como doble.
- 20 El término “oligonucleótido” significa un polinucleótido que comprende 200 o menos nucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos son de 10 hasta 60 bases de longitud. En otras realizaciones, los oligonucleótidos son de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 hasta 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena, p. ej., para uso en la construcción de un gen mutante.
- 25 Una “molécula de ácido nucleico aislada” significa un ADN o ARN de origen genómico, ARNm, ADNc, o sintético o alguna combinación de los mismos que no está asociada con todos o una porción de un polinucleótido en el cual el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, o está enlazada a un polinucleótido al cual no está enlazado en la naturaleza. Para los propósitos de esta divulgación, debe entenderse que “una molécula de ácido nucleico que comprende” una secuencia de nucleótido particular no abarca cromosomas intactos. Moléculas de ácido nucleico aisladas “que comprenden” secuencias de ácidos nucleicos específicas pueden incluir, además de las secuencias específicas, secuencias codificantes para hasta diez o incluso hasta veinte de otras proteínas o porciones de las mismas, o pueden incluir secuencias reguladoras operativamente enlazadas que controlan la expresión de la región codificante de las secuencias de ácido nucleico reseñadas, y/o pueden incluir secuencias de vectores.
- 30
- 35 A menos que se especifique de otra manera, el extremo del lado izquierdo de cualquier secuencia de polinucleótido de cadena sencilla comentada en la presente es el extremo 5'; a la dirección del lado izquierdo de las secuencias de polinucleótido de cadena doble se la alude como la dirección 5'. A la dirección de la adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se la alude como la dirección de transcripción; a regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que están 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se las alude como “secuencias de aguas arriba”; a regiones de secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que están 3' al extremo 3' del transcrito de ARN se las alude como “secuencias de aguas abajo”.
- 40 La expresión “secuencia de control” se refiere a una secuencia de polinucleótido que puede afectar a la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las cuales está enlazada. La naturaleza de secuencias de control de este tipo puede depender del organismo huésped. En realizaciones particulares, las secuencias de control para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción. Por ejemplo, secuencias de control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para los factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias de terminación de la transcripción. “Secuencias de control” de acuerdo con la invención pueden incluir secuencias conductoras y/o secuencias participantes en la fusión.
- 45
- El término “vector” significa cualquier molécula o entidad (p. ej., ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) usada para transferir la información de codificación de proteínas en una célula huésped.
- 50 La expresión “vector de expresión” o “construcción de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (en unión con la célula huésped) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas enlazadas operativamente a ellas. Una

construcción de expresión pueden incluir, pero no se limita a secuencias que afectan o controlan la transcripción, traducción y, si están presentes intrones, afectan al corte y empalme de ARN de una región codificante operativamente enlazada a ellas.

5 Como se usa en la presente, “operativamente enlazado” significa que los componentes a los cuales se aplica la expresión están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes bajo condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control en un vector que está “operativamente enlazada” a una secuencia codificante de proteínas está enlazada a ello, de manera que la expresión de la secuencia codificante de proteínas se logra bajo condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control.

10 La expresión “célula huésped” significa una célula que ha sido transformada o que es capaz de ser transformada, con una secuencia de ácido nucleico y con ello expresa un gen de interés. La expresión incluye la progenie de la célula parental, ya sea la progenie idéntica o no en morfología o en la constitución genética para la célula parental original, siempre que el gen de interés esté presente.

El término “transducción” significa la transferencia de genes de una bacteria a otra, usualmente por bacteriófago. La “transducción” también se refiere a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucarióticas por retrovirus.

15 El término “transfección” significa la absorción de ADN extraño o exógeno por una célula, y una célula ha sido “transfectada” cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Un número de técnicas de transfección son bien conocidas en la técnica y se describen en la presente. Véase, p. ej., Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Id.; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; y Chu et al., 1981, *Gene* 13:197. Técnicas de este tipo pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno en  
20 células huéspedes adecuadas.

El término “transformación” se refiere a un cambio en las características genéticas de la célula, y una célula ha sido transformada cuando se ha modificado para que contenga nuevo ADN o ARN. Por ejemplo, una célula se transforma en los casos en los que se modifica genéticamente de su estado nativo al introducir material genético nuevo por medio de transfección, transducción u otras técnicas. Después de la transfección o la transducción, el ADN transformante puede  
25 recombinarse con el de la célula al integrarse físicamente en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse transitoriamente como un elemento episomático sin ser replicado, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Una célula se considera que ha sido “transformada establemente” cuando el ADN transformante se replica con la división de la célula.

Los términos “polipéptido” o “proteína” significan una macromolécula que tiene la secuencia de aminoácidos de una  
30 proteína nativa, que es, una proteína producida por una célula que se presenta de forma natural y no recombinante, o producida por una célula modificada genéticamente o recombinante, y comprende moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen delecciones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos “polipéptido” y “proteína” abarcan específicamente anticuerpos anti-DKK1, o secuencias que tienen delecciones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos del anticuerpo  
35 anti-DKK1. La expresión “fragmento de polipéptido” se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal, una delección de carboxilo-terminal y/o una delección interna en comparación con la proteína nativa de longitud completa. Fragmentos de este tipo también pueden contener aminoácidos modificados en comparación con la proteína nativa. En ciertas realizaciones, los fragmentos son de alrededor de 5 hasta 500 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, los fragmentos pueden ser de al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de longitud.  
40 Fragmentos de polipéptido útiles para esta invención incluyen fragmentos inmunológicamente funcionales de anticuerpos, incluyendo dominios de unión. En el caso de anticuerpos anti-DKK1, fragmentos útiles incluyen pero no se limitan a una región CDR, un dominio variable de una cadena pesada o ligera, una porción de una cadena de anticuerpo o solo su región variable que incluye dos CDRs, y similares.

La expresión “proteína aislada” a la que se alude en la presente significa que una proteína objeto (1) está libre de al menos  
45 algunas otras proteínas con las cuales normalmente debería encontrarse, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, p. ej., de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos alrededor de 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos, u otros materiales con los cuales se asocia en la naturaleza, (5) se asocia operativamente (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el cual no se asocia en la naturaleza, o (6) no aparece en la naturaleza. El ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de  
50 origen sintético, o cualquier combinación de los mismos puede codificar una proteína aislada de este tipo. Preferiblemente, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que deberían interferir con su uso terapéutico, de diagnóstico, profiláctico, de búsqueda u otro uso.

Una "variante" de un polipéptido (p. ej., un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácido se insertan en, se eliminan de y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos con relación a otra secuencia de polipéptido. Variantes de la invención incluyen proteínas de fusión.

- 5 Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (p. ej., un anticuerpo) que se ha modificado químicamente de alguna manera distinta de las variantes de inserción, delección o sustitución, p. ej., por medio de conjugación a otro resto químico.

El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta de cualquier isotipo, o un fragmento de la misma que puede competir con el anticuerpo intacto para la unión específica al antígeno objetivo, e incluye anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Un anticuerpo intacto comprenderá, generalmente, al menos dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, pero en algunos casos pueden incluir pocas cadenas, tales como anticuerpos que se presentan de forma natural en camélidos que pueden comprender solo cadenas pesadas. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden derivarse únicamente de una fuente sencilla, o pueden ser "quiméricos", es decir, las porciones diferentes del anticuerpo pueden derivarse de dos anticuerpos diferentes. Por ejemplo, las regiones CDR pueden derivarse de una fuente de rata o murina, mientras que la región marco de la región V se deriva de una fuente de animal diferente, tal como un ser humano. Los anticuerpos o fragmentos de unión de la invención pueden producirse en hibridomas, por técnicas de ADN recombinante o por escisión química o enzimática de anticuerpos intactos. A menos que se indique de otra manera, el término "anticuerpo" incluye, además, anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos y muteínas de los mismos, ejemplos de los cuales se describen más adelante.

20 La expresión "cadena ligera" incluye una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad de unión. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, VL, y un dominio de región constante, CL. El dominio de región variable de la cadena ligera está en el extremo amino del polipéptido. Cadenas ligeras de acuerdo con la invención incluyen cadenas kappa y cadenas lambda.

25 La expresión "cadena pesada" incluye una cadena pesada de longitud pesada y fragmentos de la misma que tienen secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad de unión. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, VH, y tres dominios de región constante, CH1, CH2, y CH3. El dominio VH está en el extremo amino del polipéptido, y los dominios CH están en el extremo carboxilo, estando CH3 más próximo al extremo -COOH. Cadenas pesadas de acuerdo con la invención pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (incluyendo los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluyendo los subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

30 La expresión "fragmento inmunológicamente funcional" (o simplemente "fragmento") de una cadena de inmunoglobulina, como se usa en la presente, se refiere a una porción de una cadena ligera o una cadena pesada del anticuerpo que carece de al menos algunos de los aminoácidos presentes en una cadena de longitud completa, pero que es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Fragmentos de este tipo son biológicamente activos, debido a que se unen específicamente al antígeno objetivo y pueden competir con anticuerpos intactos por la unión específica a un epítipo dado.

35 En un aspecto de la divulgación, un fragmento de este tipo conservará al menos una CDR presente en la cadena ligera o pesada de longitud completa, y en algunas realizaciones comprenderá una cadena pesada y/o una cadena ligera sencilla o porción de la misma. Estos fragmentos biológicamente activos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante, o pueden producirse por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales de la invención incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticuerpos de dominio y anticuerpos de cadena sencilla, y pueden derivarse de cualquier fuente de mamífero, incluyendo pero no limitada a ser humano, ratón, rata, camélido o conejo. Se contempla, además, que una porción funcional de los anticuerpos de la invención, por ejemplo, una o más CDRs, podrían unirse de forma covalente a una segunda proteína o a una molécula pequeña para crear un agente terapéutico dirigido a un objetivo particular en el cuerpo, que posee propiedades terapéuticas bifuncionales, o que tiene una semivida de suero prolongada.

45 Un "fragmento Fab" está compuesto de una cadena ligera y las regiones CH1 y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios CH2 y CH3 de un anticuerpo y, en algunos casos, la región de bisagra inferior. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos por dos o más enlaces disulfuro (típicamente en la región de bisagra) y por interacciones hidrofóbicas de los dominios CH3.

50 Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio CH1 y también la región entre los dominios CH1 y CH2, de manera que un enlace disulfuro entre cadenas puede formarse entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')<sub>2</sub>.

Un "fragmento F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de manera que un enlace disulfuro entre cadenas se forma entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento F(ab')<sub>2</sub> está compuesto, por lo tanto, de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

- 5 La "región Fv" comprende las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras, pero carece de las regiones constantes.

"Anticuerpos de cadena sencilla" son moléculas Fv en las cuales las regiones variables de cadena ligera y pesada se han conectado por un enlazador flexible para formar una cadena polipeptídica sencilla, que forma una región de unión al antígeno. Anticuerpos de cadena sencilla se comentan en detalle en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 88/01649 y Patentes de EE.UU. N°s 4.946.778 y 5.260.203.

10 Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones VH se unen covalentemente con un enlazador peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones VH de un anticuerpo de dominio bivalente pueden fijar como objetivo los mismos o diferentes antígenos.

- 15 Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión a antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades del antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos (véase más adelante).

Un "anticuerpo multiespecífico" es uno que fija como objetivo más de un antígeno o epítopo.

20 Un anticuerpo "biespecífico", "específico doble" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido que tiene dos sitios de unión al antígeno diferentes. Los anticuerpos biespecíficos son una especie de anticuerpo multiespecífico y pueden producirse por una diversidad de métodos que incluyen, pero no se limitan a fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véase, p. ej., Songsivilai & Lachmann (1990), Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al. (1992), J. Immunol. 148:1547-1553. Los dos sitios de enlace de un anticuerpo biespecífico se unirán a dos epítomos diferentes, que pueden residir en los mismos o en diferentes objetivos de proteína.

25 La expresión "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que se une a un ligando, previene la unión del ligando a su participante en la unión e interrumpe la respuesta biológica que de otra manera debería resultar de la unión del ligando a su participante en la unión. Al evaluar la unión y especificidad de un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional del mismo, un anticuerpo o fragmento inhibirá sustancialmente la unión de un ligando a su participante en la unión cuando un exceso de anticuerpo reduzca la cantidad del participante en la unión unido al ligando en al menos alrededor de 20%,  
30 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más (como se mide en un ensayo de unión competitivo in vitro). En el caso de anticuerpos para DKK1, un anticuerpo neutralizante disminuirá la capacidad de DKK1 de unirse a LRP5 o LRP6, induciendo con ello un incremento medible en la actividad Wnt.

El término "competir", cuando se usa en el contexto de anticuerpos que compiten por el mismo epítopo, significa competencia entre anticuerpos, se determina por un ensayo en el cual el anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional sometido a prueba previene o inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (p. ej., DKK1 o un fragmento del mismo). Pueden usarse numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competencia de sándwich (véase, p. ej., Stahl et al. (1983) Methods in Enzymology 9:242-253); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase, p. ej., Kirkland et al., (1986) J. Immunol. 137:3614-3619) ensayo de marcaje  
40 directo en fase sólida, ensayo de sándwich de marcaje directo en fase sólida (véase, p. ej., Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA de marcaje directo en fase sólida utilizando el marcador I-125 (véase, p. ej., Morel et al. (1988) Molec. Immunol. 25:7-15); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase, p. ej., Cheung, et al. (1990) Virology 176:546-552); y RIA de marcaje directo (Moldenhauer et al. (1990) Scand. J. Immunol. 32:77-82). Típicamente, un ensayo de este tipo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. Se mide la inhibición competitiva al determinar la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Usualmente la inmunoglobulina de prueba se presenta en exceso. Anticuerpos identificados por ensayo de competencia (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítopo adyacente lo suficientemente próximo al epítopo  
50 unido al anticuerpo de referencia para que se produzca el impedimento estérico. Se proporcionan detalles adicionales con respecto a los métodos para determinar la unión competitiva en los ejemplos en la presente. Usualmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75%. En algún caso, la unión se inhibe en al menos 80%,

85%, 90%, 95% o 97% o más por un agente de unión selectivo, tal como un anticuerpo, y adicionalmente capaz de ser usado en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a ese antígeno. Un antígeno puede poseer uno o más epítopos que son capaces de interactuar con diferentes anticuerpos.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o a un receptor de células T. Un epítipo es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo que fija específicamente como objetivo a ese antígeno, y cuando el antígeno es una proteína, incluye aminoácidos específicos que contactan directamente con el anticuerpo. Más a menudo, los epítopos residen en las proteínas, pero en algunos casos pueden residir en otros tipos de moléculas, tales como ácido nucleicos. Determinantes de epítopos pueden incluir agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específica. Generalmente, los anticuerpos específicos para un antígeno objetivo particular preferentemente reconocerán un epítipo en el antígeno objetivo en una mezcla de complejo de proteínas y/o macromoléculas.

Se dice que un anticuerpo de la invención se "une específicamente" a su antígeno objetivo cuando la constante de disociación ( $K_d$ ) es  $1 \times 10^{-7}$  M. El anticuerpo se une específicamente al antígeno con "afinidad alta" cuando la  $K_d$  es  $1 \times 10^{-8}$ , con afinidad mayor es  $5 \times 10^{-9}$  M, y con "muy alta afinidad" cuando la  $K_d$  es  $5 \times 10^{-10}$  M. En una realización de la invención, el anticuerpo tiene una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-9}$  M y una constante de disociación de alrededor de  $1 \times 10^{-4}$ /s. En una realización de la invención, la constante de disociación es  $< 1 \times 10^{-5}$ . En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos se unirán a DKK1 humana con una  $K_d$  de entre alrededor de  $1 \times 10^{-8}$  M y  $1 \times 10^{-10}$  M, y en aún otra realización se unirá con una  $K_d$  de  $2 \times 10^{-10}$ . Un experto en la técnica reconocerá que unirse específicamente no significa una unión exclusiva, sino que se permite algún grado de unión no específica como es típico en reacciones biológicas entre grupos con afinidad entre sí.

El término "identidad" se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptidos o dos o más moléculas de ácidos nucleicos, según se determina al alinear y comparar las secuencias. "Porcentaje de identidad" significa el porcentaje de residuos idénticos entre los aminoácidos o nucleótidos en las moléculas comparadas y se calcula en base al tamaño de la más pequeña de las moléculas que se comparan. Para estos cálculos, los huecos en los alineamientos (si hubiera) deben dirigirse por un programa de computadora o modelo matemático particular (esto es, un "algoritmo"). Métodos que pueden usarse para calcular la identidad de los ácidos nucleicos o polipéptidos alineados incluyen los descritos en Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Human Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; y Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48: 1073.

Al calcular el porcentaje de identidad, las secuencias que se comparan se alinean en una forma que da el emparejamiento más grande entre las secuencias. El programa de computadora usado para determinar el porcentaje de identidad es el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux et al., 1984, Nucl Acid Res 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wisc.). Se usa el GAP del algoritmo de computadora para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los cuales el porcentaje de identidad de secuencia se ha de determinar. Las secuencias se alinean para un emparejamiento óptimo de su aminoácido o nucleótido respectivo (el "periodo emparejado", según se determina por el algoritmo). Una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal promedio, en donde la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se usa; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada emparejamiento perfecto de aminoácidos por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que es usualmente 1/10 veces la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se usan en unión con el algoritmo. En ciertas realizaciones, también se usa por el algoritmo una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62).

Los parámetros recomendados para determinar el porcentaje de identidad para los polipéptidos o secuencias de nucleótido usando el programa GAP son los siguientes:

Algoritmo: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., 1992, supra;

Penalización por hueco: 12 (pero sin penalización para huecos finales)

Penalización por longitud de hueco: 4

Umbral de similitud: 0

Ciertos esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden resultar en un emparejamiento de solo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta, aunque no existe una relación importante entre las dos secuencias de longitud completa. En consecuencia, puede ajustarse el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) si se desea para dar como resultado un alineamiento que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido objetivo.

Como se usa en la presente, “sustancialmente pura” significa que la especie descrita de la molécula es la especie predominante presente, es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la misma mezcla. En ciertas realizaciones, una molécula sustancialmente pura es una composición en donde la especie objeto comprende al menos 50% (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En otras realizaciones, la especie objetivo se purifica para una homogeneidad esencial, en donde la especie contaminante no puede detectarse en la composición por métodos de detección convencionales y de esta manera la composición consiste en una especie macromolecular detectable sencilla.

El término “osteopenia” se refiere a un paciente con pérdida ósea de al menos una desviación estándar comparada con un paciente estándar considerado que tiene una densidad mineral ósea (BMD) normal. Para los presentes propósitos, la medición se determina por Absorciometría de rayos X de Energía Dual (DEXA) y la BMD del paciente se compara con un patrón emparejado con el sexo y la edad (puntuación Z). Al determinar la osteopenia, las mediciones de la BMD pueden tomarse de uno o más huesos.

La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de un anticuerpo anti-DKK1 determinado para producir una respuesta terapéutica en un mamífero. Cantidades terapéuticamente efectivas de este tipo se determinan fácilmente por un experto ordinario en la técnica.

“Aminoácido” incluye su significado normal en la técnica. Los veinte aminoácidos que se presentan de forma natural y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology--A Synthesis, 2ª Edición, (E. S. Golub y D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991). Estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos .alfa.-, .alfa.-disustituidos, N-alquil aminoácidos y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, .epsilon.-N,N,N-trimetilisina, .epsilon.-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, .sigma.-N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la anotación de polipéptido usada en la presente, la dirección del lado izquierdo es la dirección amino terminal y la dirección del lado derecho es la dirección carboxilo terminal, de acuerdo con uso y convención estándares.

La presente invención proporciona composiciones novedosas que comprenden anticuerpos y sitios de unión a antígeno de inmunoglobulinas específicas para DKK1 (p. ej., un polipéptido que consiste en los aminoácidos 32 a 266 de la SEQ ID NO: 2). Algunos de estos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo pueden reaccionar de forma cruzada con DKK1 de varias fuentes de mamífero, incluyendo DKK1 de rata, ratón, mono cynomolgus y ser humano. Algunos de los anticuerpos y fragmentos tienen afinidad superior por DKK1 de una especie que otra (p. ej., algunos anticuerpos y fragmentos tienen afinidad superior por DKK1 humana en comparación con DKK1 de rata o murino; otros anticuerpos tienen afinidad superior por DKK1 de rata o murino en comparación con DKK1 humana). La invención también proporciona neutralizantes de anticuerpos novedosos, incluyendo anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, así como anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que se unen a un epítipo conformacional en DKK1 humana. También se describen ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y fragmentos, así como métodos para expresar los anticuerpos usando estos ácidos nucleicos. En otro aspecto, la invención se refiere a moléculas (p. ej., fragmentos y polipéptidos inmunológicamente funcionales) que son capaces de exhibir propiedades de unión inmunológicas de los sitios de unión a antígeno del anticuerpo.

Los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se describen en la presente tienen una diversidad de utilidades. Algunos de los anticuerpos y fragmentos, por ejemplo, son útiles en ensayos de unión específica, purificación por afinidad de DKK1 o sus ligandos y en ensayos de rastreo para identificar otros antagonistas de la actividad de DKK1. Ciertos anticuerpos pueden usarse para tratar diversas enfermedades que están asociadas con la actividad de DKK1. Algunos anticuerpos y fragmentos pueden de esta manera usarse en una diversidad de tratamientos relacionados con los huesos, tales como incrementar la densidad mineral ósea, síntesis de nuevo hueso, tratamiento de pérdida ósea sistémica (p. ej., erosiones óseas), reparación ósea, y tratamientos para diversas formas de artritis.

Se proporciona una diversidad de agentes de unión selectiva, útiles para regular la actividad de DKK1. Estos agentes incluyen, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que contienen un dominio

de unión a antígeno (p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio, inmunoadhesiones y polipéptidos con una región de unión a antígeno) y específicamente que se unen a un polipéptido DKK1 (p. ej., un polipéptido DKK1 de ser humano, rata y/o murino). Algunos de los agentes, por ejemplo, son útiles al inhibir la unión de DKK1 a LRP5 y/o LRP6 y, por lo tanto, pueden usarse para estimular una o más actividades asociadas con la señalización Wnt.

5 Algunos de los agentes de unión que se proporcionan tienen la estructura típicamente asociada con anticuerpos que se presentan de forma natural. Las unidades estructurales de estos anticuerpos comprenden típicamente uno o más tetrámeros, cada uno compuesto de dos dobletes idénticos de cadenas polipeptídicas, aunque algunas especies de mamíferos también producen anticuerpos que tienen solo una cadena pesada sencilla. En un anticuerpo típico, cada par o doblete incluye una cadena "ligera" de longitud completa (en ciertas realizaciones, alrededor de 25 kDa) y una cadena  
10 "pesada" de longitud completa (en ciertas realizaciones, alrededor de 50-70 kDa). Cada una de las cadenas de inmunoglobulina individual está compuesta de varios "dominios de inmunoglobulina," consistiendo cada uno en aproximadamente 90 hasta 110 aminoácidos y expresando un patrón de plegamiento característico. Estos dominios son las unidades básicas de las cuales están compuestos los polipéptidos de anticuerpo. La porción amino-terminal de cada cadena incluye típicamente un dominio variable que es el responsable del reconocimiento de antígeno. La porción carboxi-terminal está más conservada evolutivamente que el otro extremo de la cadena y se la alude como la "región constante" o "región C". Las cadenas ligeras humanas se clasifican generalmente como cadenas ligeras kappa y lambda, y cada una de estas contiene un dominio variable y un dominio constante. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como cadenas mu, delta, gamma, alfa o epsilon, y éstas definen el isotipo del anticuerpo, tal como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varios subtipos, incluyendo, pero no limitados a IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los subtipos IgM incluyen IgM e IgM2. Los subtipos IgA incluyen IgA1 e IgA2. En seres humanos, los isotipos IgA e IgD contienen cuatro cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras; los isotipos IgG e IgE contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras; y el isotipo IgM contiene cinco cadenas pesadas y cinco cadenas ligeras. La región C de cadena pesada comprende típicamente uno o más dominios que pueden ser responsables de la función efectora. El número de dominios de región constante de cadena pesada dependerá del isotipo. Las cadenas pesadas IgG, por ejemplo, contiene cada una tres dominios de región C conocidos como CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos que se proporcionan pueden tener cualquiera de estos isotipos y subtipos. En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-DKK1 es del subtipo IgG1, IgG2 o IgG4.

En cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de alrededor de 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de alrededor de 10 o más aminoácidos. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology*, 2ª ed., Capítulo 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman típicamente el sitio de unión al antígeno.

Regiones variables de cadenas de inmunoglobulina generalmente exhiben la misma estructura global, que comprende regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, más a menudo denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada par de cadena pesada/cadena ligera arriba mencionadas se alinean típicamente por las regiones marco para formar una estructura que se une específicamente con un epítipo específico sobre la proteína objetivo (p. ej., DKK1). Del extremo N al extremo C, las regiones variables de cadena ligera y pesada que se presentan de forma natural se conforman ambas típicamente con el siguiente orden de estos elementos: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Se ha diseñado un sistema de numeración para asignar números a los aminoácidos que ocupan posiciones en cada uno de estos dominios. Este sistema de numeración se define en *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 y 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), o Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 878-883.

En la Tabla 1 se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos de ser humano (SEQ ID NOs: 1 y 2), ratón (SEQ ID NOs: 3 y 4), rata (SEQ ID NOs: 5 y 6) y mono cynomolgus (SEQ ID NOs: 7 y 8) y secuencias de proteínas DKK1, respectivamente. También se proporcionan ejemplos específicos de las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos que se proporcionan en la presente y sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes. Los identificadores de secuencia se proporcionan en la columna del extremo izquierdo, secuencias (ácido nucleico o proteína) en la columna de en medio y designaciones internas para las secuencias en la columna en el extremo derecho. Además, se proporcionan las CDR respectivas (SEQ ID NOs: 97-228). Vh = cadena pesada variable; Vk = cadena ligera kappa variable; Vl = cadena ligera lambda variable.

50



Tabla 1

SEQ ID NO	ADN or Proteína	DDK1 HUMANO
1	ATGATGGCTCTGGGCGAGCGGGAGCTACCCGGGCTTTGTGCGGATGGTAGCGCGGCTCTCGGC GGCCACCTCTGTGGAGTGAGCGCACTTGAACTCGGTCTCAATCCACGCTATCAAGAAC CTGCCCCACCGCTGGGCGGCTGGGGCACCCAGGCTCTGCAGTCAGCGCGCGCGGGGAATC CTGTACCCGGCGGGAATAAGTACCAGACATTGACAACTACACGCCGTACCCGTGCGCAGAGGAC GAGGAGTGGGCACCTGATGAGTACTGCTAGTCCACCCGCGGAGGACGAGCGGTGCAAAATC TGCTCGCTGTCACGAAGCGCGGAAAACCTGTGATCCCTACCTATCTCTGCTGCCCGGGAATTAC TGCAAAAATGGAATATGTGTCTCTGATCAAAATCATTTCCGAGGAGAAATTCAGGAAACCATC ACTGAAAGCTTTGGTAATGATCATAGCACTTGGATGGGTATCCAGAGAACCACTTTGTCTTCA AAAATGATACACCAAGGACAGAAGTTCTGTTGTCCTCAGGTATCAGACTGTGCCCTCAGGA TCTGTGTTGTATAGACACTTCTGGTCCAAGATCTGTAACCTGTCTCTGAAAGAGGTCAAGTGIGT ACCAAGCATAGGAGAAAGGCTCTCATGGACTAGAAATATTCACAGCGTTGTTACTGTGGAGAAGGT CTGTCTTGGCGGATACAGAAAGATCACCATCAAGCCAGIAATTTCTTAGGCTTCACACTTGTCTCAG AGACAC	DDK1 HUMANO
2	MMALGAAGAT RVFVANVAAA LGGHPILGVS ATLNSVLNSN AIKNLPPPLG GAAGHPGSAV SAAFGILYPG GNKYQIDNY QPIPCAEDDEE CGTDEYCASP TRGGDAGVQI CLACRRKRKR CMRHAMCCPG NYKNGICVS SDQNHFRGEI EETITESFGN DHSTLDGYSR RTTLLSKMYH TKGQFQSVCT, RSSDCASGLC CDRIFWSKIC KPVLRKGGVQ TKHRRKGSUG LEIFQRCYCG EGLSQRIQKD HHQASNSSRL HTQQRH	DDK1 de murino
3	ATGATGGTTGTGTGTCAGCGGCGAGCTGTCCGGTTCTTGGCGGTGTTTACAAATGATGGCTCTCTGC AGCCTCCCTCTGTAGGAGCCAGTGCCACCTTGAACTCAGTTCTCATCAATTCACACGCGATCAAG AACCCTCCCAACCGCTGGGTGGTGTCTGGGGGACGCCGGGTCTGCTGTCTAGTGTGGCGCGGGA GTCTCTATGAGGGCGGGAACAAGTACCAGACTCTTGACAACTACCAAGCCCTACCTTGGCTGAA GATGAGGAGTGGGCTGTGACGAGTACTGCTCCAGCCCCAGCGCGGGGACGCGCGGTGCGAGGI GTACAGATCTGTCTGGTTGCCGAAAGCGCAGGAAGGCTGATGAGGACGCTATGTGTGTCCTCC GGGAACCTACTGCAAAAATGGAATATGATGCCCTCTGACCAACAGCCATTTCTCGAGGGGAGATT GAGAAAGCATCATTTGAAACCTTTGGTAATGACCAACACCGCCCGGGGGATGGATATCCAGA AGAACCACTGACTTCAAAAATATATACACCAAGGACAGAAAGGCTCCCTGCTGCTCCGATCA TCAGACTGTGCGCGAGGCTGTGTGTGTCGAAGACACTTCTGTCTCAAGATCTGTAACCTGTCTCT AACAAGGTACGTGTCCACCAACCAACGGAAGGCTCCACAGGCTGGAGATATTCACCCGC TGTTACTGCGGGGAAGGCTGTGCTGAGGATACAGAAAGATCACCATCAAGCCAGCAATTTCTCT AGGCTCCACACCTGCCAGAGACAC	DDK1 de murino
4	MMVCAAAAVRFLAVFTMMALCSLPLGASATLNSVLINSNAIKNLPPPLGAGGQPGSAVSVAPG VLYEGGNKYQTLNDNYQPIPCAEDDEECDEYCSSPSRGAAGVGVQICLACRRKRKRMRHAMCCP CNYCKNGICMPSDHSHPRGEIEESI IENLNDHNAAGVGPRTTLETSKIYHTKGQEGSVCLRS SDCAAGLCCARHFWSKICKPVLRKGGVCTKHRRKGSUGLEIFQRCYCGEGLACRQKDHQASNSS RLHTCQRH	DDK1 de murino

(Continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
5	<p>ATGACGGTTGTGCGTGCAGTGGCAGCTGTGCGGTTCTTGGTGGTCTTACACGATGGCTCTCTGC  AGCCTCCCTCCGCTCGGAGTCAGCGCACCTTTGAACTCAGTTCTCATCAATTCACACGCGATCAAG  AACCTGCCCCACCGGOTGGTGGTGTGIGGGGGAGCCGGCTCTGTGTGACGTGGCGCCGCA  GTCCTCTATGAGGGCGGAACAAGTACCAGACTCTTGACAACATACCAGCCCTACCTTTGGCGGAG  GATGAGAGTGGGCACTGACGAGTACTGCTCCAGTCCAGCCGGGGAGCGCGGCTGGGAGGT  GACAAATCTGCCIGGCTGCCGAAGCGCAGGAACGCTGCATGAGGACGCTATGTGTGCCCC  GGAAATACTGCAAAACGGAAATATGATGCCCTCTGACCAAGCCATTACCTCGAGGGGAATC  GAGGAAGGCATCATTTGAAAACCTTTGGCAATGACCAAGGTGCCGGGATGGATATCCAGAAACCC  ACACTCACTTCAAAATATATACACCAAGGCAAGAGGCTCTGTCTGCTCCGATCATCAGAC  TGCGCACAGGGCTGTGTGTGCAAGACATTTCTGGTCCAAGATCTGTAACCTGTCTTAAAGAA  GGTCAGGTATGCACCAAGCACAGAGGAAGGCTCCACGGGCTGGAGATATTCACAGCGCTGTAC  TGTGGGAAGGTCIGGCTTGCAAGATACAGAAAGATCACCATCAAAACAGCAATTTCTCCAGGCTC  CACACCTCCAGAGAC</p>	DKK1 de rata
6	<p>MTVRAVAARFLVVLTWALCSLPPLVSVATLNSVLINSNAIKNLPPLGGAGGPGSAVSAPG  VLYEGGNKYQTLIDNYQYPCEAEDEECGTDEYCSSPSRGAAGVGVQICLACRKRRCMRHAMCCP  GNYCKNGICMPSDHSHLPRGEIEEGI-ENLGNHDHAGDGYPRRTTLTSKIYHTKGQEGSVCLRSSD  CATGLCCARHFWSKICKPVLKEGVCTKRRKRGSHGLEIFQRCYCGEGLACRIQKDHQTSNSRL  HTCQRH</p>	
7	<p>AAGATGGCTCTGGGCGCAGGAGCTGCCCGGCTTGGTGGCTGGTAGCGCGGCTCTTGGC  GGCCACCTCTGCTGGGAGTGAGCGCCACCTTGAATCGGTTCTCAATTCACACGCGATCAAGAAC  CTGCCCCACCGCTGGCGCGCTGGCGGCACCCAGGCTCTGAGTCAGCCGCGCCAGGAATT  CTGTACCCGGCGGGAATAAGTACCAAGCCATTGACAACACCAAGCGGTACCTTTGGCAGAGGAT  GAGGAGTGGGCACTGATGAGTACTGGCTAGTCCACCCCGGAGGGACCGGGCGTGCATATC  TGCTCGCTGCGAGGAGCGCCGAAACGCTGCATGGCTCACGCTATGTGCTGCCCGGGAATTAC  TGCAAAATGGAATCTGTGTCTTCTGATCAAAATATTTCCGAGGGGAAATGAGGAAACCAATT  ACTGAAGCTTTGGTATGATCATAGCACTTTGGATGGTATTCAGAGAACACATTTGCTTCA  AAAATGATATCACAGCAAGGACAAAGAGGTTCTGTGTCTCCGGTCATCAGACTGTGCCACAGGA  CTGTGTTGTGCTAGACACTTCTGGTCCAAGATCTGTAACCTGTCTCAAGAGGTCAAGTGTGT  ACCAAGCATAGAGAAAGGCTCTCATGGGCTAGAAATATTCACGCGTTGTTACTCGCGAGAGGT  CTGTCTTGCCGGATACAGAAAGATCACCATCAAGCAGTAATTTCTTTAGGCTTCACACTTGTCTAG  AGACAC</p>	DKK1 Cyno
8	<p>MMALGAACAARVLVALVAAALGGHPLLGVSATLNSVLINSNAIKNLPPLGGAGHPGSAVSAAPGI  LYPGGNKYQTLIDNYQYPCEAEDEECGTDEYCASPTRGGDAGVQICLACRKRRCMRHAMCCPGNY  CKNGICVSSDQNNFRGEIEETITESFGNDHSTLDGYSRRTTLSSKNYHSGQEGSVCLRSSDCATG  LCCARHFWSKICKPVLKEGVCTKRRKRGSHGLEIFQRCYCGEGLSCRIQKDHQAASNSRLHTCQ  RH</p>	

(Continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
9	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGCAAGTCAGGCAATAGAGATGATTTAGGCTGGTTTACAGAGAAACCCAGGAAAGCCCT AAGCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAGTGGGTCCCATCAAGTTACGCGGACAGTGA TCTGGACAGAAATTCACCTCTCACATCAGACGCTGACGCTGAGAGATTTTGGCAACTATTACTGT CTACAGCATAATAGTTACCGTGCACCTTTGGCCACGGGACCAAGCTGGAGTTCAA	2.4.1 Vk
10	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIKRDLDLGFQKPKRAPKRLIYAASSLSQGVPSRFSGG SGTEFTLTITSSLPEDFATYYCLOHNSYPFCSFGQGTKEFK	
11	CAGGTTCAGCTAATGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAGAGAAACCTGGGGCTCACTGAAGTCTCTCTGC AAGGCTTCTGTTACACCTTTACACAGCTATGGTATCAGCTGGTGGACAGGCTGGACAGG CTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTGACAAATGTCACACAACTATGCACAGAACTCCAGGGC AGATCACCATGACACAGACACATCCACGAGACAGCTACATGGAGCTGAGGAGCTGAGATCT GACGACACGGCGGTATTTACTGTCCGAGAGATGGGAGCTACTAAATTACTACTACTACTACGGT ATGACGCTCTGGGGCAAGGGACACAGGTACCGCTCTCTCTCA	2.4.1 Vh
12	QVQLMQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW-SADNGHTNYAQKLQG RVMTTDTSTSTAYKEISRLSRSDTAVYYCARDGELLNYYYYGMDVWGQTTVTVSS	
13	GAIAITGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCTCTCTGGACAGCCGCTCCATCTCC TSCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGTGAGAGAACCTATTGTACTGTACTCTGCAGAGG CCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTATGAGTTTCCAAACCGTTCTCTGGAGTCCACATAGG CTCAGTGGCAGCGGTCAGGGACAGAIITCACACTGAAATCAGCCGGTGGAGGCTGAGGATGTT GGGTTTATTACTGCATGCAAGTATACAGGTTCCTGTGACGTCCTGGCCAGGGACCAAGGTGGAA ATCAA	2.20.1 Vk
14	DIVMTQTPLSLSVIPGQPAISICKSSQSLHSDGKTYLYWTLQRPQPPQLLIYEVSNRFSGVPHR LSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQSIQVFWTFGGGTKVEIK	
15	CAGTGTACAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGCGGTGGTCCAGCCTGGGAGTCCCTGAGATC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTATGGCATGGCTGGTCCGCGAGGCTCCAGGC AAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAAATACTATGCAGACTCCGTG AAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTG AGACTGAGGACACGGCTGTGTTACTGTGCGAGAGATCAATGGGTGGGAGCCAGCCGCGCCCC TGGGCCAGGGAACCTGGTCACTCTCTCTCA	2.20.1 Vh
16	QVQLVESGGGVVQPGPSRLRLSCAASGFTTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSCKYYADSVKG RFTISRDNKNTLY-QMNSLRAEDTAVYYCARDQWGGSPAGPWGQGTLLTVSS	



(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
17	GAAATTGTGTGACCCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCC TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGAGCAACTACTTAGCTGGTACAGACAGAAACCTGGCCAGGCT CCAGGCTCCTCAICTATGTTGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCAGACACAGTTTCAGTGGCAGT GGTCTGGACAGACITTCACCTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGAGTGATTTAC TGTCAGCAGTATGTTAGCTCACCGTACCTTCGGCCACGGACACGACTGGAGATTAA	2.37.1 Vk
18	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSES GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGRLEIK	
19	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTCT GCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGCATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGSG CTGGAATGGGTGGCAGTTATATCATAGTGAAGTGAATAATACATGACAGACTCCGTGAAGGSC CGATTCACCTTCTCCAGAGACAATCCPAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCT GAGGACACGCTGTGTTACTGTGCGAGAGAAATTGGGTATAGCAGCTTCCTTTGACTACTGGGGC CAGGAAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA	2.37.1 Vh
20	QVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSVKYADSVKG RFTFSRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGLIAAFDYWGQGLIVTVSS	
21	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCTCTGTCCGTCAACCCCTGGACAGCCGGCTCCATCTCC TCCAAGTCTAGTCAAGCCCTCCTGCACAGTGTATGGAAGACCTAATTGTATTTGGTATCTGCAGANG CCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGGAGTGCCAGATAGG TTCAGTGGCAGCGGGTCAGGACAGATTTCACTGAATCAAGCCGGGTGGAGCTGAGGATGTT GGGTCTATTACTGCATGCAAAAGTATACAGGTTCCGTGGAGCTTCGGCCAGGGACCAAGGTGSA ATCAAA	2.40.1 Vk
22	DIVMTQSPPLSLSVFPOQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQSIQVPWTFGQCTKVEIK	
23	CAGGTGCACACTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTCACTTCACTTCACTATGGCATGCATGGGTCCGACAGGCTCCAGGCAAGGSG CTGGGTGGTGGCAGTTATATCATATGATGAAGTGAATAATACATGACAGACTCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCT GAGGACACGCTGTGTTACTGTGCGAGAGACCTCGTGGATACAGCTATGCCCTGGGGCCAGGG ACCAGGTACCGTCTCCTCA	2.40.1 Vh
24	QVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSVKYADSVKG RFTFSRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLDVDTAMPWGQGLIVTVSS	

(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
25	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCTGACCCCTGGACAGCGGCTCCATCTCC TGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCAATAGTATGGAAGACCTATTGTATTTGGTACCTGCAGAG CCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCAACCGGTTCTCTGGAGTCCAGATAGG TTCAGTGGCAGCGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAATCAGCCGGTGGAGGCTGAGGATGTT GGGTTTATTACTGTCATGCAAAGTAAACAGCTTCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGAT ATCAAA	2.41.1 Vk
26	DIVMTQTPLSLVTPGPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQSKQLPFTTFGGTKVDIK	
27	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGSGG CTGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTATATACTATGCACTCCGTGAAGGGC CGATTCAACATCTCCAGAGACAAATCCCAAGAACAGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGGGCT GAGGACACGGCTGTGTTACTGTGCGAGAGCGGGTACICCTCTACTACTACTACGGTATGAC GTCGGGGCCAAAGGACACCGTCAACGCTCCTCA	2.41.1 Vh
28	QVQLVESGGGVQPGPRLRLSAAAGFTFSYGMHWRQAPGKLEWVAVISYDSDKYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICARAGYSLIYYGMDVWGQGTITVTVSS	
29	GATATTGTGATCACCCAGACTCCACTCTCCTGCGCGTCAACCCCTGGAGAGCGGCTCCATCTCC TGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGATAGTATGATGATGGAGACACCTATTTGGACTGGTACCTGCAG AAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATACGCTTCTCATCGGCCCTCTGGAGTCCAGAC AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCAAGGCACTGATTTCACACTGAAATCAGCAGGTTGAGGCTGAGGAT GTTGGAGTTATTACTGTCATGCAACGATAGAGTTCCACTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAAGTG GATATCAAA	2.47.1 Vk
30	DIVMTQTPLSLVTPGPASISCRSSQSLSDSDGDTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLISYRASGVPD RFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQRLEFPFTFGPGTKVDIK	
31	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCCTGCTCCCTCACCTGC ACTGTCCTGSGGTCCATCAGCAGTGGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGG AAGGCCCTGGAGTGGATGGGACATCTATACAGTGGGAGCACCTACTACACCCGTCCTCTCAAG AGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCATAAGAACAGTCTCTCCCTGAAGTGAAGTCTGTGACT GCCGGGACACGGCGGTGTTACTGTGCGAGAGATCGGGCTTACGGTGACTACGGGGGAGACTAC TACTACGGTATGGAAGTCTGGGGCCAAAGGACACCGGTCAACGCTCTCCTCA	2.47.1 Vh
32	QVQLQESGPGLVKPQSLSLTCTVSGGISGCGYYSWIRQHPGKGLEWIGDIYYSGSTYYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRAYGYGDIYYGMDVWGQGTITVTVSS	

(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
33	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCAGGCGAGTCAGGACATTAACAATTTAAATTTGGTATCAGGAGAAACCCAGGGAAAGCCCT AATCTCTGATCTACGATGCATCCAAATTGGAAACAGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGAAGTGGGA TCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGAGCTGCAGCCTGCAGATATTGCAACATATTACTGT CAACAATATGATGATTTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGAGATCAAA	5.17.1 Vk
34	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDINNYLNWYQQKPGKAPNLLIYDASNLETGVPSRFSGSG SGTDFTFTISSLPADIATYYCQQYDDFLPLTFGGGTKVEIK	
35	CAGGTGCAACTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCCTCACCTGC ACTGCTCTGCTGGTCCCATCAGTAGTACTACTAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGA CTGGAATGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAACACCAATTACACCCCTCCCTCAAGAGTCSA GTCACCATATCAGTAGACACAGTCCAGAACCAAGTCTCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACCGCTCGG GACACGGCCGTATATTACTGTCCAGGTATAAAGTGAACCAACGACCTCTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA	5.17.1 Vh
36	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYMSWIRQPPGKGLEWIGVYYSGNTNYPNPSLKS VCTISVDTSKNQFSLKRSVTAADTAVYYCARYNWNNDLFDYWGQGLVTVSS	
37	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTAAATTTGGTATCAGGAGAAACCCAGGGAAAGCCCT AAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAAATTGGAAACTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGAAGTGGGA TCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGT CAACAATATGATATCTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGAGATCAAA	5.23.1 Vk
38	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSG SGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQYDNLPLTFGGGTKVEIK	
39	CAGGTGACAGTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCACGCTCTGGATCACCTTCACTAGTATGGCATGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGG CTGGAGTGGTGGCAGTTATATGGTGTGATGGAAGTAATAATATCATGACAGCTCCGTGAAGGSC CGATTCAACATCTCCAGAGACAGTCCCAAGAACACCGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCC GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGCTATGGTTCGGGAGTTATGAGGACTACTAC TACGGTATGGAGTCTGGGGCCCAAGGACACCGTCACTCCTCA	5.23.1 Vh
40	QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWNAVINCDSNKYYADSVK RFTISRDSKNTLLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARGGYSGSYEDYYGMVDVWGQGTITVTVSS	



(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
41	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGCTGTCATCTGTAGGAGACGAGTCACCATCACT TGCAGGCGAGTCAGGACATTAGTAGGATTTAAATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCT AGGTCCTGATCTACGATGCATCCAAATTTGGAACGGGGTCCCATCAAGGTCAGTGAAGTGA TCTGGGACAGATTTTACTTTACCATCAGCAGCCCTGAGCCCTGAAGATATTGCAACATTTTACTGT CAACAGTATGATCATCTCCCGATCGCCTTCGGCCAGGGACACGACTGGAGATTAA	5.25.1 Vk
42	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITTCQASQDISKDLNHWYQKPKAPRLLIYDASNLEAGVPSRFSGSG SGTDFTTISSLQPEDIAIFYCQYDHLPIAFGQTRLEIK	
43	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCTGGATACACCTTCACAGTTATGATATCAACIGGGTSCGACAGGCCACTGGCCAAAGGG CTTGAGTGGATGGATGGATGGACCCIAACAGTGGTAACACAGGCTATGCAAGAGATTCCAGGGC ASAGTCACCATGACCCAGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTTCATGGAGCTGAGCAGCCCTGAGATCT GAGGACAGGGCGGTGTATTACTGTGCGGAGAACGGACTACTTCTACTTCGGTATGGACGTCTGGGGC CAAGGACACCGGTCACCGTCTCCTCA	5.25.1 Vh
44	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYDINWVRQATCGLEWMGMNDPNSGNTGYAQKFGQ RVTMTRNTSISTAFNELSLRSEDTAVYYCARDYFYFGMDVWGQGITVTYSS	
45	GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGCTGCACTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAATTGATTCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCT AAGTCTCTGATCTAGATGCATCCAAATTGGAGCAGGGGTCCTCCATCAAGGTCAGTGGAGTGA TCTGGGACAGATTTTACTTTACCATCAGCAGCCCTGAGCCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGT CAACAGTATGATATACTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	5.31.1 Vk
46	DIQVTSPPSSLSASVGRVTITTCQASQDISNYLNWYQKPKAPKFLIYDASNLEAGVPSRFSGSG SGTDFTTISSLQPEDIAIYYCQYDNLPLTFGGGKVEIK	
47	CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGTCTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG CTGGAGTGGTGGCAGTTATATGGTAIGATGGAAGAAACAATACTATGCACTATCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCCTGAGAGCC GAGGACAGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGAGTGGCTGATACAACTACTACTAC GGTATGACGCTCTGGGGCCCAAGGACACCGGTCACTCCCTCA	5.31.1 Vh
48	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCLASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI#YDGRNKYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARGGGAVDYNIYYGMDVWGQCTTIVTSS	

(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
49	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGCTGTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TECCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAAGGATTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCT AAGCTCTGATCTACCATGATCAATTTGGAAACAGGGTCCCATCAAGGTCAGTGGAGCTGGA TCTGGGACAGATTTTACTTTACCATCAGCAGCTGACCTGAAGATATTGCAACATATTACTGT CAACAGTATGATGATCTCCCGATCACCTTCGGCCAAGGACACAGCTGGAGATTAAA	5.32.1 Vk
50	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITTCQASQDISKDLNWYQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSPRPSGSG SGTDFTFITISLQPEDIAN YYCQYDDLPITFGQTRLEIK	
51	CAGGTGACGTGGTACAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCTGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGC AAGCCTCTGGATTACCTTCACAGTTATGATATCAGCTGGTGGACAGGCCACTGGACTAGGG CTTGAGTGGTGGGATGGATGAACCTAGCAGTGTGTACACAGGCTATGCACAGAACTTCCAGGEC AGATCACCATGACCTGGAACACCTCCATAAGCACAGTCTACATGGAGCTGACAGCCTGAGATCT GAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACGGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC CGAGGGACCAACGGTCACCGTCTCCTCA	5.32.1 Vh
52	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKRSGFTFTSYDISWVRQATGLGLEWMGMWNPSSGYTGYAQNFG RVMTWNTSISTV YMEISSLRSEDTAVYVCARTDYIYYGMDVWGRGTTVTVSS	
53	GACATCCGGTTGACCCAGTCTCCATCCCTCGTCTGTGATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTAAATTGGTATCAGCAGGAACAGGGAAGCCCT AAGCTCTGATCTACCATGATCCAAITTCGAAACAGGGTCCCATCAAGTTCAGTGGAGTGA TCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGACGCTGAAGATATTGCAACATATTACTGT CAACAGTATGATAAATTTCCCGCTCACATTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	5.40.1 Vk
54	DIRLTQSPSSLSASVGRVTITTCQASQDISNYLNWYQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSPRPSGSG SGTDFTFITISLQPEDIANYYCQYDDLPITFGGTRLEIK	
55	CAGGTGCTACTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCTTCGGAGACCTGTCCCTCACCTGC ACTGTCTCTGTGGCTCCATCAGTAGTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGACCCAGGGAAGGA CTGAGTGGATTGGGTATGTCTATTACAGTGGAGACACCCCTACACCCCTCCCTCAAGAGTCGA GTCACCATATCATATGATACAGTCCACAGACCGATCTCCCTGAAGTACGCTGTGTACCCGTCCG GACACGGCCGTGATATTCTGTCGAGGTATACTGGAACAACGACCTCTTGTACTACTGGGGCCAG GGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA	5.40.1 Vh
56	QVLLQESGPGIVKPESETLSLTCTVSGSSISSYYVMSWIRQTPGKGLEWIGVYVYSGSTSYNPILKSR VTISMYTSKTEFSKLSSVTAADTAVIYCARYNNNDLFDYWGQGLTVTVSS	



(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
57	TCCATATGTTGACTCAGCCACCCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGT GGGGAAACAACATTGGAAGTAAAGTGTGCACTGGTACACAGCAGAGCCAGGCCAGGCCCTGTG CTGGTCGCTCTATGATGATAGCGACGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTGTGGCTCCAACTCT GGGAACACGGCCACCCCTGACCATCAGCAGGTGGAAGCGGGGATGAGCCGCTATTACTGTCTAG GTGTTGGATAGTAGTAGTGATCATGTGATATTCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCCTA	5.65.1 VI
58	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIIVYDDSDRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDSSSDHVFVGGGKLTVL	
59	TCCTATGTGTTGACTCAGCCACCCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGT GGGGAAACAACATTGGAAGTAAAGTGTGCACTGGTACACAGCAGAGCCAGGCCAGGCCCTGTG CTGGTCGCTCTATGATGATAGCGACGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTGTGGCTCCAACTCT GGGAACACGGCCACCCCTGACCATCAGCAGGTGGAAGCGGGGATGAGCCGCTATTACTGTCTAG GTGTTGGATAGTAGTAGTGATCATGTGATATTCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCCTA	5.65.1 Vh
60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTSNYAMSVWRQAPKGLHWVSAISGGGGTTYADSVEG RFTISRDNKNTLYQLNSLRADETAVYYCAKEFGELEPRFDYWGQGTLVTVSS	
61	TCCTATGTGTTGACTCAGCCACCCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGT GGGGAAACAACATTGGAAGTAAAGTGTGCACTGGTACACAGCAGAGCCAGGCCAGGCCCTGTG CTGGTCGCTCTATGATGATAGCGACGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTGTGGCTCCAACTCT GGGAACACGGCCACCCCTGACCATCAGCAGGTGGAAGCGGGGATGAGCCGCTATTACTGTCTAG GTGTTGGATAGTAGTAGTGATCATGTGATATTCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCCTA	5.76.1 VI
62	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIIVYDDSDRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDSSSDHVFVGGGKLTVL	
63	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCTTCGGAGACCCCTCCCTCAGCTGC ACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAATTACTTGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCGGCG AAGGGCTGGAGTGGATTGGGACTATCTATTATAGTGGAGCACCTACTACACCCGTCCTCCCTCAAG AGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCACAGAACCTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACC GCCGAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGATAGCAGTGGCTGCTATAGTCTTC TTTGACTACTGGCGCCACGGACCCCTCGTCACCGTCTCCCTCA	5.76.1 Vh
64	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGESISSNYWGWIRQPPGKGLWIGTIYYSGSTYTPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAIVYCARERAIATAVAIVFFDYWGQGLVTVSS	

(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
65	TCCCTAATGTGCTCACTAGTCACCTCCGCTGTCAGTGGCCCAAGACACAGCCAGGATACCTGT GGGGAACAACATTGGAAGTAAAGTGTGCACTGGTACCAAGCAGAGCCAGGCGCCCTGTG CTGCTCGTCTATGATAGTACGACCGCCCTCAGGATCCCTAGAGGATTCCTGGCTCCAACTCT GGGAACAGGCCACCTGACCATCAGAGGTCGAAGCCGGGATGAGGCCGACTACTACTGTCTAG GTGTGGGATAGTAGTAGTATGATGTTGGTGTTCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCTCTA	5.77.1 VI
66	QSPSVVAPQQTARITCGGNNIGSKSVHWYQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTAT LTIISRVEAGDEADYYCQVWDSSDHWFGGTKLTVL	
67	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGC AAGGCTTCTGGATACACCTTCACCACTATGATATCAACCTGGTGGCAGCCACTGGACAAGG CTTGACTCGATCGGATCGATGATCTTAAACAGTGAACACAGCTATGACAGAGTTCCACGGC AGATCAACCATACAGGAACACCTCCATAAGCACTGCTACATGGAGCTGAGCAGCCCTGAGATCT GAGGACACGGCCGTATTAATGCTGCGGTATAGCAGCTCTGCGGACTACAACTACTACGGTATG GACGCTCTGGGCCCAAGGACCAAGGTACCGTCTCTCTCA	5.77.1 Vh
68	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGMNLSNDNTGYAQKFTQ RVTMTNRTISISTAYMELSLRSEDYAVYCASIAARRDYNYYGMDVWGQTKVTVSS	
69	GAAATTGTGTGACCGAGTCTCCAGGCACCTGTCTGTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCTCTCC TGCAGGGCCAGTCAAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCTGTGATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT CCAGGCTCTCAICTATGTGTCATCCGCGAGGCGCCTGGATCCAGACAGGTTCACTGGCAGT GGCTCTGGGACAGACTTCACTTCAACATCAGCAGCTGAGCCTGAAGATTTTCAGTGTATTAC TGTCAGCAGTATGTTAGCTCAITCACTCGGGGAGGACCAAGGTGAGATCAAA	5.78.1 Vh
70	EIVLTQSPGTLISVSPGERATLSRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASGRATGIPDRFSGS GSCTDFILTIISRLPEPDFAVYVQYQYGSSTFTGGGTVKVEIK	
71	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCTGGGAGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGG CTGGAGTGGTGGCAGTTATATATATGATGGAAGTGAATTAATTAATGAGACTCCCGTGAAGGC CGATTCAACATCTCCGAGACATTCAGAACACGCTGTATCTGCAATGACAGCCTGAGAGCT GAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGAGGATAGCAGTGGTGGGACTACTACTACTAC GGTATGGACGCTCTGGGCCCAAGGACCAAGGTACCGTCTCTCTCA	5.78.1 Vh
72	QVQLVESGGGVQPGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNDNYADSVK PFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICAREGIAVAGDYIYYGMDVWGQGTITVTVSS	

(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
73	CAGTCAGTGTGACGACGCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCTCAGGCGAGGGTCACCATCTCCTGC ACTGGAGCAGCTCCAAACATCGGGGCGATTAAGATGTACTGTACCTACGACAGCTTCCAGGAACA GCCCCAAACTCCTCACTATGATTACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACACCGATTCTCTGGC TCCAGTCTGGCACCTCAGCTCCCTGCGCATCATCGGTCCAGGCTCAGGATGAGGATGATTAT TACGCCAGTCTCTATGACAAACAGCCTGAGTGTGTTATGCTATTCGGCGGAGGACCAAGCTCACC GTCTTA	5.80.1 VI
74	QSVLTQPPSVSGAPGQRTVTSCTGSSSNIGADYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDYSNRPSGVPRFSFQ SKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSDNSLSGYVVFGGTKLIVL	
75	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCGAGGTTGAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT AAGGT"CTGGATACAGCTTTACACAGTACTGGATCGGTGGGNGGCCAGATGCCCGGGAAGGC CTGGAGTGGATGGGATCATCTATCC TGGTACTCTGTATACAGATACAGCCCGTCCCTTCCAGGC CAGGTCAACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCTACCTGCAGTGAGCAGCTGACGGCC TCGGACACCGCATGTATTACTGTGCGAGACAGGAGAGAGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC CTGTCAACCGTCTCCTCA	5.80.1 Vh
76	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIPGDSDTRYSPSFQ QVTISADKSI STAYLQWSSSLTASDTAMYCARQGESFDYWGQGLIVTVSS	
77	CAGTCTGTGTGACGACGCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGCGAGGGTCACCATCTCCTGC ACTGGGAGCAGCTCCAAACATCGGGGCGGTTATGATGTACACTGGTACCGAGCAGCTTCCAAGACA GCCCCAAACTCCTCATCTATGTTACAGCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATCTCTGAC TCCAGTCTGGCACTCAGCTCCCTGCGCATCATCTGGCTCCAGGCTGAGGATGAGCTGATTAT TACTGCCAGTCTCTATGACAGCAGCCTGAGTGTGATATTGCGGGGAGGACCAAGCTGACCGTCTCTA	5.85.1 VI
78	QSVLTQPPSVSGAPGQRTVTSCTGSSSNIGADYDVHWYQQLPRTAPKLLIYDYSNRPSGVPRFSFQ SKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSDNSLSVIFGGTKLIVL	
79	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT AAGTCTCTGGATACAGCTTTACCACTTACTGGATCGGTGGTGGCGCGAGATGCCGGGAAGGC CTGGACTGGATGGGATCATCTATCTGTTGACTCTGTATACAGATACAGCCCGTCCCTTCCAGGC CAGGTCAACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCTACCTGACAGTGAGGAGCAGCTGAGGCC TCGACACCGCATGTATTACTGTGCGAGACAGGTATAGCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCAACCGTCTCCTCA	5.85.1 Vh
80	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYSFTTYWIGWVRQMPGKGLDWMGIIPGDSDTRYSPSFQ QVTISADKSI STAYLQWSSSLKASDTAMYCARQGIADFWGQGLIVTVSS	



(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteína	
81	GATAATGTGATGACCCAGACTCCACATCTCTGTCCTCACCCTGGACAGCGCGCCTCATCTCC TGCAGTCTGGTCAGAGCCCTCCTGCAATGATGAGAAACCTATTGTATTGGTACCTGCAGAAG CCAGCCAGCCTCCACAGTCTCTGATCTATGAAGTTCCAAACCGTTCTCTAGAGTCCAGATAGG FTCAGTGGCAGCGGTGAGGACAGATTTACACTGAGAATCAGCGGGTGGAGGCTGAGGATGTT GGAATTTATTACTGTCATGCAAAAGTATACAGCTTCCGTGGACGTTCCGGCCAAAGGACCCAGGTGAA ATCAAA	6.37.5 Vk
82	DIVMTQPLSLSVTPGQPASISCKSGQSLHSDGKTYLYWYLOKPGQPPQFLIYEVSNRFSRVDDR FSGSGSGTDFTLPISRVEAEDVGIYYCMQSIQLPWTFGGTQVEIK	
83	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCGGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGGCTAAGGCAJGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGG CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAATGATAAATACTATGACACTCCGTGAAGGC CGATTCAACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCT GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGGGAGAGAGCTACGGGTCTCTGGGGCTAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCTAGT	6.37.5 Vh
84	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTPSGYGMHWVRQAPGKLEWAVISYDGNDKYYADSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARELRVLMGQGLTVTVSS	
85	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCTGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCC TGCAAGTCTGGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATGGAAGAACCTATTGTATTGGTACCTGCAGAAG CCAGGCCAGCCTCCACAGTTCCTGATCTATGAAGTTTCCAAACCGTTCTCTAGAGTCCAGATAGG TTCAGTGGCAGCGGTGAGGACAGATTTACACTGAAATCAGCCGGTGGAGGCTGAGGATGTT GGAATTTATTACTGTCATGCAAAAGTATACAGCTTCCGTGGACGTTCCGGCCAAAGGACCCAGGTGAA ATCAAA	6.116.6 Vk
86	DIVMTQPLSLSVTPGQPASISCKSGQSLHNDGKTYLYWYLOKPGQPPQFLIYEVSNRFSRVDDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQSIQLPWTFGGTQVEIK	
87	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCGGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGG CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGCAAAATGATAAATACTATCCAGACTCCGTGAAGGC CGATTCAACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCT GAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGGCAGAGAGACTACGGGTCTCTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCTCTCA	6.116.6 Vh
88	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTPSGYGMHWVRQAPGKLEWAVISYDGNDKYYADSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARELRVLMGQGLTVTVSS	

(continuación)

SEQ ID NO	ADN o Proteina	
89	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTCTGTCGGTCACCCCTAGACAGCGCGCTCCATCTCC TGCAGTCTAGTCAGAGCCCTCTGATAGTATGGAAGACGATATTGTATTGGTACTGCAGAG CCAGCCAGGCTCCACAGTCTCTGATGATGAAGTTTCCACCGGTTCTTGAGTGCAGATAGG TTCAGTGGCAGCGGTCAGGACAGATTTCACACTGAAATCAGCCGGTGGAGGCTGAGGATGT GGGGTTTATTACTGCATGAAAAGTATACAGCTTCCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGAA ATCAA	6.139.5 Vh
90	DIVMTQTPLSLSVTPRQASISCKSSQLLHSDGKTYLYWYLQKPGQPQLIYEVSNRFSGVDPDR F SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQSIQLPWTFGQTKVEIK	6.139.5 Vh
91	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCGGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCTCTGGATCACCTTCAGTAGTATGGCATGCACACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGG CTGGAGTGGTGCAGTTATATCATATGATGGAGGTGATCACTACTATGCAGACTCCGTGAAGGC CGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACGCTGTATCTGCAATGAACAGCTGAGAACT GAGACACGGCTGAGTATTACTGTGCGAGAGACTCCGGGTCTCTGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCA	6.139.5 Vh
92	QVLVESGGGVQPRSLRLSCAASGFTFSYGMHWRQAPGKGLEWVAVISYDGGDQYYADSVKRG RFTISRDNKNTLYLQMNLSRTEDTAEYYCARELRVLNGQGLTVTVSS	6.147.4 Vh
93	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCCTCGGTGTCTAGTGGCCCCCAGGACAGCGCCAGGATTACCTGT GGGGAACAACATGGAGTAAAGTGTACACTGGTACCACAGAGCCAGGCCAGGCCCTCTG CTGTCGTCTATGATGATGTAACCGGCCCTCAGAGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCT GGGACACGGCCACCTGACCATCAGACGGGTCCAGCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCTAG GTGTGGATAGTAGTAGTATCATGTGTATTCGGCGGAGGACAGGCTGACCGCTCCTA	6.147.4 Vh
94	YVLTQPPSVSVAIPGQTAITCGGNINIGSKSVHWYQKPGQAPVILVVDSDRPSIEPERFSGNSG NTATLTIISRVEAGDEADYYICQVWDSDDHVFVGGTRLTLVL	6.147.4 Vh
95	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGGCTCTGGATTCACCTTCAGTCGCTATGACTGACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGG CTGGAGTGGTGCACAATTATATCTATGATGGCAGCAATAATACTATGCAGACCCCGTGAAGGC CGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACACTGTATCTGCAATGAACAGCTGAGAGCC GAGACACGGCTGTGATTACTGTGCGACTCTAGCAGCAGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCAACCGTCTCCTCA	6.147.4 Vh
96	QVLVESGGGVQPRSLRLSCAASGFTFSYDMHWRQAPGKGLEWVAIFIYDGSNKYYADPVKRG RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCATLAAFDYWGQGLTVTVSS	

SEQ ID NO	ADN o Proteina	
97	RASQGIRDDLQ	2.4.1
98	AASSLQS	
99	LQHNSYPQS	
100	SYGIS	
101	WISADNGHTNYAQKLQ	
102	DGELLNYYYYYGMQV	
103	KSSQSLHSDGKTYL	2.20.1
104	EVSNRFS	
105	MQSIQVPWT	
106	SYGMH	
107	VISYDGSDKYYADSVKG	
108	DQWGGSPAGP	
109	RASQSVSSNYLA	2.37.1
110	GASSRAT	
111	QQYGSSPIT	
112	SYGMH	
113	VISYDGSDKYYADSVKG	

SEQ ID NO	ADN o Proteina	
114	ELGIAASFDY	
115	KSSQSLHSDGKTYLY	2.40.1
116	EVSNRFS	
117	MQSIQVPWT	
118	SYGMH	
119	VISYDGSCKYYADSVKG	
120	DLVDTAMP	
121	KSSQSLHSDGKTYLY	2.41.1
122	EVSNRFS	
123	MQSKQLPFT	
124	SYGMH	
125	VISYDGSCKYYADSVKG	
126	AGYSLYYYYGMDV	
127	RSSQSLDSDGDTYLD	2.47.1
128	TLSYRAS	
129	MQRIEFPQRIEFP	

SEQ ID NO	ADN o Proteina	
130	SGGYWS	
131	DIYSGSTYYNPSLKS	
132	DRAYGDYGGDYYYGMDV	
133	QASCDINNYLN	5.17.1
134	DASNLET	
135	QQYDDFPLT	
136	SYWS	
137	YIYSGTNTNYPNPSLKS	
138	YNWNNDLFDY	
139	QASCDISNYLN	5.23.1
140	DASNLET	
141	QQYDNLPLT	
142	SYGMH	
143	VIWCDGSKNYADSVKG	
144	GGYSGSYEDYYYGMDV	
145	QASCDISKDLN	5.25.1



SEQ ID NO	ADN o Proteina	
146	DASNLET	
147	QQYDNLPLT	
148	SYGMH	
149	WMDPNSGNTGYAQKFQG	
150	TDYFYFGMDV	
151	QASQDISNYLN	5.31.1
152	DASNLEA	
153	QQYDNLPLT	
154	SYGMH	
155	VIWYDGRNKYYADSVKG	
156	GGGAVADYNYYYGMDV	
157	QASQDISKDLN	5.32.1
158	DASNLET	
159	QQYDDLPT	
160	SYDIS	
161	WMNPSSGYTGYAQNFQG	
162	TDYYYYGMDV	

SEQ ID NO	ADN o Proteina	
163	QASQDISNYLN	5.40.1
164	DASNLET	
165	QQYDNFPLT	
166	SYYWS	
167	YVYSGSTSYNPSLKS	
168	YNWNNDLFDY	5.65.1
169	GGNIGSKSVH	
170	DDSDRPS	
171	QVLDSSSDHVI	
172	NYAM/S	
173	AISGGGGTTYADSVEG	
174	EFGELEPRFDY	
175	GGNIGSESVH	5.76.1
176	DDSDRPS	
177	QWDDSSNDHW	
178	SSNYWYG	

SEQ ID NO	ADN o Proteina	
179	TIYSGSTYYTPSLKS	
180	ERAIAVAIVFFDY	
181	GGNIGKSVH	5.77.1
182	DDSDRPS	
183	QVWDSSDHWV	
184	SYDIN	
185	WMNLNSDNTGYAQKFQG	
186	IAARDYNYGMDV	
187	RASQSVSSSYLA	5.78.1
188	GASGRAT	
189	QQYGSSFT	
190	SYGMH	
191	VILYDGSNDYYADSVKG	
192	EGIAVAGDYYYYGMDV	
193	TGSSNIGADYDVH	5.80.1
194	DYSNRPS	

SEQ ID NO	ADN o Proteina	
195	QSYDNSLSGYV	
196	SYWIG	
197	IYPGDS DTRYSPSFQG	
198	QGESFDY	
199	TGSSNIGAGYDVH	5.85.1
200	GNSNRPS	
201	QSYDSSLVI	
202	TYWIG	
203	IYPGDS DTRYSPSFQG	
204	QGIADFY	
205	KSGCSLLHSDGKTYLY	6.37.5
206	EVSNRFS	
207	MQSIQLPWT	
208	GYGMH	
209	VISYDGNKYYADSVKG	
210	ELRVL	

SEQ ID NO	ADN o Proteina	
211	KSGCSLLHNDGKTYLY	6.116.6
212	EVSNRFS	
213	MQSIQLPWT	
214	GYGMH	
215	VISYDGNKYYADSVKG	
216	ELRVL	
217	AASGTFSTRYDMH	6.139.5
218	IFYDGSNKYYAD	
219	ATLAAAFDY	
220	SYGMH	
221	VISYDGGDQYYADSVKG	
222	ELRVL	
223	GGNNIGSKSVH	6.147.4
224	DDSDRPS	
225	QWWDSSDHW	
226	RYDMH	
227	IIFYDGSNKYYADPVKG	



[illegible]







Un experto en la técnica apreciará la distinción entre las secuencias mostradas en la Tabla 1 que abarcan regiones variables tanto de las cadenas ligeras como pesadas, comparada con secuencias del anticuerpo de longitud completa, las cuales comprenden regiones constantes adicionales. Los dominios variables pueden combinarse con dominios constantes apropiados usando tecnología estándar bien conocida en la técnica. Cada una de las cadenas ligeras enumeradas en la Tabla 1 puede combinarse con cualquiera de las cadenas pesadas mostradas en la Tabla 1 (p. ej., polipéptidos representados en las SEQ ID NOs: 242 o 244) para formar un anticuerpo. En algunos casos, los anticuerpos incluyen al menos una cadena pesada y una cadena ligera de las enumeradas en la Tabla 1. En otros casos, los anticuerpos contienen dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Como un ejemplo, un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional puede incluir dos cadenas ligeras L1 y dos cadenas pesadas H1, o dos cadenas ligeras L2 y dos cadenas pesadas H3, o dos cadenas ligeras L2 y dos cadenas pesadas H4 o dos L2 y dos cadenas pesadas H5 y otras combinaciones similares de pares de cadenas ligeras y pares de cadenas pesadas como se enumeran en la Tabla 1.

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y regiones marco (FR) de un anticuerpo dado pueden identificarse usando el sistema descrito por Kabat et al. en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, Publicación NIH nº 91-3242, 1991.

Los anticuerpos y fragmentos inmunológicos funcionales que se proporcionan incluyen las seis de las CDRs enumeradas arriba. Algunos anticuerpos o fragmentos incluyen tanto la CDR3 de cadena ligera como la CDR3 de cadena pesada.

Polipéptidos que comprenden una o más de las CDRs de cadena ligera o pesada pueden producirse al usar un vector adecuado para expresar los polipéptidos en una célula huésped adecuada, tal como se describe con mayor detalle más adelante. Las regiones variables de cadena ligera y pesada y las CDRs que se describen en la Tabla 1 pueden usarse para preparar cualquiera de los diversos tipos de fragmentos inmunológicamente funcionales que se conocen en la técnica incluyendo, pero no limitados a anticuerpos de dominio, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena sencilla y scFvs.

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítipo dentro de residuos especificados, tales como DKK1, por ejemplo, lo que se quiere decir es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que consiste en los residuos especificados (p. ej., un segmento especificado de DKK1). Un anticuerpo de este tipo no contacta necesariamente con cada residuo dentro de DKK1. Ni cada sustitución o delección de cada uno de los aminoácidos dentro de DKK1 necesariamente afecta de forma significativa la afinidad de unión. La especificidad de epítipo exacta de un anticuerpo puede determinarse de una diversidad de formas. Un enfoque, por ejemplo, implica probar una colección de péptidos solapantes de alrededor de 15 aminoácidos que abarcan la secuencia de DKK1 y difieren en incrementos de un número pequeño de aminoácidos (p. ej., 3 aminoácidos). Los péptidos se inmovilizan dentro de los pocillos de una placa de microtitulación. La inmovilización puede efectuarse al biotinilar un extremo de los péptidos. Opcionalmente, diferentes muestras del mismo péptido pueden biotinilarse en los extremos N y C e inmovilizarse en pocillos separados para fines de comparación. Esto es útil para identificar anticuerpos específicos del extremo. Opcionalmente, los péptidos adicionales pueden incluirse terminando en un aminoácido particular de interés. Este enfoque es útil para identificar anticuerpos específicos del extremo para fragmentos internos de DKK1. Un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional se rastrea en cuanto a la unión específica a cada uno de los diversos péptidos. El epítipo se define como ocurre con un segmento de aminoácidos que es común para todos los péptidos a los cuales el anticuerpo muestra una unión específica.

También se describen anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos que se unen a un epítipo conformacional que se ubica en la porción carboxi-terminal de DKK1 (véase la Tabla 1). El extremo carboxi de DKK1 contiene varios residuos cisteína que forman un racimo de enlaces disulfuro que crean varios bucles. Los anticuerpos que se unen a dos de estos bucles neutralizan con ello la capacidad de DKK1 de suprimir la actividad Wnt. Anticuerpos ejemplares capaces de unirse al epítipo conformacional antes mencionado son los anticuerpos monoclonal 11H10 y 1F11, cada uno de los cuales comprende una cadena ligera y una cadena pesada. Estos anticuerpos se describen en detalle en la Patente de EE.UU. Nº 7.709.611.

El epítipo que comprende estos dos bucles se forma por enlaces disulfuro entre los residuos cisteína 220 y 237 de la SEQ ID NO: 2 y entre los residuos cisteína 245 y 263 de la SEQ ID NO: 2. El cuerpo de los dos bucles que forman el epítipo incluye, por lo tanto, los aminoácidos 221-236 y 246-262 de la SEQ ID NO: 2. Segmentos dentro de este bucle que se implican en la unión incluyen los aminoácidos 221-229 de la SEQ ID NO: 2 y los aminoácidos 246-253 de la SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, ciertos anticuerpos y fragmentos que se describen en la presente se unen específicamente a las regiones anteriores. Algunos de los anticuerpos y fragmentos, por ejemplo, se unen a un péptido que comprende o consiste en los aminoácidos 221 a 262 de la SEQ ID NO: 2.

También se proporcionan anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que compiten con uno de los anticuerpos ejemplificados o fragmentos funcionales para la unión específica a DKK1. Anticuerpos y fragmentos de

este tipo también pueden unirse al mismo epítipo que uno de los anticuerpos ejemplificados. Se espera que los anticuerpos y fragmentos que compiten con o se unen al mismo epítipo como el anticuerpo ejemplificado o fragmento muestren propiedades funcionales similares. Los anticuerpos ejemplificados y fragmentos incluyen los descritos arriba, incluyendo aquellos con las cadenas ligeras y pesadas, dominios de región variable y CDRs según se reivindica. Los anticuerpos o fragmentos inmunológicamente funcionales que compiten pueden incluir aquellos que se unen al epítipo descrito en la sección de anticuerpos y epítopos de arriba.

Como un ejemplo específico, algunos anticuerpos o fragmentos que compiten incluyen aquellos que específicamente se unen a la proteína DKK1 que consiste en los aminoácidos 32 a 266 de la SEQ ID NO: 2 y pueden prevenir o reducir la unión a DKK1 humana de un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Otros anticuerpos que compiten previenen o reducen la unión a DKK1 humana de un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas tales como las enumerados en la Tabla 1.

Los anticuerpos que se proporcionan incluyen anticuerpos monoclonales que se unen a DKK1. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando cualquier técnica conocida en la técnica, p. ej., al immortalizar células de bazo cosechadas del animal transgénico después de la compleción del programa de inmunización. Las células de bazo pueden immortalizarse usando cualquier técnica conocida en la técnica, p. ej., al fusionarlas con células de mieloma para producir hibridomas. Las células de mieloma para uso en procedimientos de fusión que producen hibridoma preferiblemente no son productoras de anticuerpo, tienen eficiencia de fusión alta y deficiencias de enzima que las hace incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de solo las células fusionadas (hibridomas) deseadas. Ejemplos de líneas celulares adecuadas para uso en fusiones de ratón incluyen Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XXO Bul; ejemplos de líneas celulares usadas en fusiones de rata incluyen R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMY2 y UC729-6.

En algunos casos, se produce una línea celular de hibridoma al inmunizar un animal (p. ej., un animal transgénico que tiene secuencias de inmunoglobulina humana) con un inmunógeno DKK1; células de bazo cosechadas del animal inmunizado; fusionar las células de bazo cosechadas a una línea celular de mieloma, generando con ello células de hibridoma; establecer líneas celulares de hibridoma de las células de hibridoma e identificar una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une a un polipéptido DKK1. Líneas celulares de hibridoma de este tipo y anticuerpos monoclonales anti-DKK1 producidos por ellas, se abarcan por la presente divulgación.

Anticuerpos monoclonales secretados por una línea celular de hibridoma pueden purificarse usando cualquier técnica útil conocida en las técnicas de anticuerpos. Hibridomas o mAbs pueden rastrearse, además, para identificar mAbs con propiedades particulares, tales como la capacidad de bloquear una actividad inducida por Wnt. Ejemplos de rastreos de este tipo se proporcionan en los ejemplos que figuran más adelante.

También se proporcionan anticuerpos quiméricos y humanizados basados en las secuencias anteriores. Anticuerpos monoclonales para uso como agentes terapéuticos pueden modificarse de varias formas antes del uso. Un ejemplo es un anticuerpo "quimérico", que es un anticuerpo compuesto por segmentos de proteína de diferentes anticuerpos que se unen covalentemente para producir cadenas ligeras o pesadas de inmunoglobulina funcionales o porciones inmunológicamente funcionales de las mismas. Generalmente, una porción de la cadena pesada y/o cadena ligera es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas son idénticas con u homólogas a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo. Para métodos relacionados con anticuerpos quiméricos, véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1985). Se describe el injerto de la CDR, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N°s 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089 y 5.530.101.

Generalmente, el objetivo de hacer un anticuerpo quimérico es crear una quimera en la cual se maximiza el número de aminoácidos de la especie del paciente pretendida. Un ejemplo es el anticuerpo "inertado con CDR", en el cual el anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas de anticuerpo son idénticas u homólogas a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos. Para uso en seres humanos, la región V o CDRs seleccionadas de un anticuerpo de roedor se injertan a menudo en un anticuerpo humano, reemplazando las regiones V o CDRs que se presentan de forma natural o del anticuerpo humano.

Un tipo útil de anticuerpo quimérico es un anticuerpo "humanizado". Generalmente, un anticuerpo humanizado se produce a partir de un anticuerpo monoclonal desarrollado inicialmente en un animal no humano. Ciertos residuos de aminoácido en este anticuerpo monoclonal, típicamente de porciones que no reconocen el antígeno del anticuerpo, se modifican para

que sean homólogas con residuos correspondientes en un anticuerpo humano de isotipo correspondiente. La humanización puede realizarse, por ejemplo, usando diversos métodos al sustituir al menos una porción de una región variable de roedor con las regiones correspondientes de un anticuerpo humano (véase, p. ej., Patente de EE.UU. N°s 5.585.089 y 5.693.762; Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen et al., 1988, *Science* 239:1534-36). En ciertas realizaciones, las regiones constantes de especies diferentes de ser humano pueden usarse junto con la o las regiones variables humanas para producir anticuerpos híbridos.

También se proporcionan anticuerpos completamente humanos. Están disponibles métodos para hacer anticuerpos completamente humanos específicos para un antígeno dado sin exponer a los seres humanos al antígeno ("anticuerpos completamente humanos"). Un medio para implementar la producción de anticuerpos completamente humanos es la "humanización" del sistema inmunitario humoral de ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que se han inactivado los genes Ig endógenos es un medio para producir anticuerpos monoclonales (MAbs) completamente humanos en ratones, un animal que puede inmunizarse con cualquier antígeno deseado. Usando anticuerpos completamente humanos se pueden minimizar las respuestas inmunogénicas y alérgicas que pueden algunas veces provocarse al administrar Mabs de ratones o derivados de ratones a seres humanos como agentes terapéuticos.

Anticuerpos completamente humanos pueden producirse al inmunizar animales transgénicos (usualmente ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Los antígenos para este propósito tienen típicamente seis o más aminoácidos contiguos, y opcionalmente se conjugan a un portador, tal como un hapteno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555; Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362:255-258; y Bruggermann et al., 1993, *Year in Immunol.* 7:33. En un ejemplo de un método de este tipo, los animales transgénicos se producen al incapacitar loci de la inmunoglobulina de ratón endógena que codifican las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas de ratón en ellos, e insertar en los fragmentos grandes de genoma de ratón del ADN de genoma humano que contiene loci que codifican las proteínas de cadena ligera y pesada humanas. Animales parcialmente modificados, que tienen menos del complemento completo de loci de inmunoglobulina humana, se cruzan luego para obtener un animal que tiene todas las modificaciones del sistema inmunitario deseadas. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos que son inmuno-específicos para el inmunógeno, pero tienen secuencias de aminoácidos humanas en vez de murinas, incluyendo las regiones variables. Para detalles adicionales de métodos de este tipo, véanse, por ejemplo, los documentos WO96/33735 y WO94/02602. Métodos adicionales con relación a ratones transgénicos para producir anticuerpos humanos se describen en las Patentes de EE.UU. N°s 5.545.807; 6.713.610; 6.673.986; 6.162.963; 5.545.807; 6.300.129; 6.255.458; 5.877.397; 5.874.299 y 5.545.806; en las publicaciones PCT WO91/10741, WO90/04036 y en los documentos EP 546073B1 y EP 546073A1.

Los ratones transgénicos descritos arriba, a los que se alude en la presente como ratones "HuMab", contienen un minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y de cadena ligera kappa humanas no reordenadas, junto con mutaciones fijadas como objetivo que inactivan los loci de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógena (Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-859).

En consecuencia, los ratones antes mencionados exhiben una expresión reducida de IgM o kappa de ratón en respuesta a la inmunización, y los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan un cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales kappa IgG humanos de alta afinidad (Lonberg et al., supra.; Lonberg y Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536-546). La preparación de ratones HuMab se describe en detalle en Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Research*, 20: 6287-6295; Chen et al., 1993, *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille et al., 1994, *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113: 49-101; Taylor et al., 1994, *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg y Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding y Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536-546; Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse, además, las Patentes de EE.UU. N°s 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; así como la Patente de EE.UU. N° 5.545.807; Publicaciones Internacionales N°s WO 93/1227; WO 92/22646; y WO 92/03918. Las tecnologías utilizadas para producir anticuerpos humanos en estos ratones transgénicos se describen también en el documento WO 98/24893, y Méndez et al., 1997, *Nature Genetics* 15: 146-156. Por ejemplo, las cepas de ratones transgénicos HCO7 y HCO12 pueden usarse para generar anticuerpos anti-DKK1 humanos.

Usando tecnología de hibridoma, los MAbs humanos específicos para antígenos con la especificidad deseada pueden producirse y seleccionarse de los ratones transgénicos tales como los descritos arriba. Anticuerpos de este tipo pueden clonarse y expresarse usando un vector y una célula huésped adecuados, o los anticuerpos pueden cosecharse de células de hibridoma cultivadas.

Anticuerpos completamente humanos también pueden derivarse de colecciones de expresión en fagos (como se describe en Hoogenboom et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; y Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). Las técnicas de expresión

en fagos imitan la selección inmunitaria a través de la expresión de repertorios de anticuerpo sobre la superficie de bacteriófago filamentosos, y selección posterior de fago por su unión a un antígeno de elección. Una técnica de este tipo se describe en la Publicación PCT No. WO99/10494, que describe el aislamiento de anticuerpos agonísticos de alta afinidad y funcionales para receptores MPL y msk usando un enfoque de este tipo.

- 5 Los agentes anti-DKK1 proporcionados en la presente también pueden bloquear o reducir la unión entre DKK1 y LRP5 y/o LRP6, estimulando con ello al menos una actividad asociada con la señalización Wnt. Los agentes pueden ser un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo y, por lo tanto, incluyen anticuerpos con una estructura que se presenta de forma natural, así como polipéptidos que tienen un dominio de unión al antígeno (p. ej., un anticuerpo de dominio). Los anticuerpos y fragmentos pueden usarse para tratar una diversidad de diferentes enfermedades
- 10 incluyendo la prevención o el tratamiento de afecciones relacionadas con la pérdida de masa ósea o para estimular la producción de nuevo hueso. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico, vectores y células huéspedes útiles en la producción de los anticuerpos y agentes de unión selectivos.

- Algunos de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan incluyen una o más de las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de cadena ligera (LC): (i) una CDR1 de LC con la SEQ ID NO: 223; (ii) una CDR2 de LC con la SEQ ID NO: 224; y (iii) una CDR3 de LC con la SEQ ID NO: 225. Algunos de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan incluyen las CDRs de LC precedentes y las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de cadena pesada (HC): (i) una CDR1 de HC con la SEQ ID NO: 226; (ii) una CDR2 de HC con la SEQ ID NO: 227; y (iii) una CDR3 de HC con la SEQ ID NO: 228.
- 15

- Anticuerpos o fragmentos de este tipo se pueden unir específicamente a un polipéptido DKK1. Ciertos anticuerpos o fragmentos incluyen las seis de las CDRs anteriores.
- 20

Ciertos otros anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan incluyen (a) una región variable de cadena ligera (VL) con la SEQ ID NO: 94; (b) una región variable de cadena pesada (VH) con la SEQ ID NO: 96.

- También se describen anticuerpos aislados o unos fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que específicamente se unen a una proteína DKK1 humana madura expresada de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1, en donde dicho anticuerpo se une a un epítipo que comprende dos bucles, estando formados dichos bucles por enlaces disulfuro entre los aminoácidos 220 y 237 de la SEQ ID NO: 2 y entre los residuos cisteína 245 y 263 de la SEQ ID NO: 2.
- 25

- Otros anticuerpos o fragmentos que se describen compiten con un anticuerpo tal como los descritos arriba para la unión específica a un polipéptido DKK1. Por ejemplo, algunos anticuerpos y fragmentos compiten con un anticuerpo que consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, en donde las cadenas pesadas comprenden la SEQ ID NO: 42 y las cadenas ligeras comprenden la SEQ ID NO: 44.
- 30

- Los diversos anticuerpos y fragmentos que se proporcionan pueden incluir una cadena ligera y/o pesada sencilla o un dominio ligero variable sencillo y/o un dominio pesado variable sencillo. Otros anticuerpos y fragmentos incluyen dos cadenas ligeras y/o dos cadenas pesadas. En aquellos casos en la cual el anticuerpo o fragmento incluye dos cadenas ligeras y/o pesadas, las dos cadenas ligeras en algunos casos son idénticas entre sí; asimismo, las dos cadenas pesadas en algunos casos son idénticas. Los anticuerpos que se proporcionan pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los fragmentos inmunológicamente funcionales pueden incluir, pero no se limitan a un scFv, un Fab, un Fab', un F(ab')<sub>2</sub> o un anticuerpo de dominio. En ciertos casos, el anticuerpo o fragmento se disocia de un polipéptido DKK1 con una K<sub>d</sub> (K<sub>inactiva</sub>) de 5x10<sup>-4</sup> o menos.
- 35
- 40

- También se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente activos anteriores. Composiciones de este tipo también incluyen típicamente una solución tampón, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un portador, un solubilizante, un emulsionante o un conservante. También se proporciona el uso de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente activos anteriores en la preparación de una composición farmacéutica o un medicamento.
- 45

- También se proporciona una diversidad de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anteriores. Algunos ácidos nucleicos, por ejemplo, codifican (a) una CDR de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 93; y/o (b) una CDR de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 95, de manera que la(s) CDR(s) codificada(s) codifica(n) un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo que puede unirse específicamente a un polipéptido DKK1. Ciertos otros ácidos nucleicos comprenden o consisten en una secuencia que codifica una región ligera variable (VL) y/o una región pesada variable (VH) de un
- 50

anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo, en donde la VL tiene la SEQ ID NO: 93 y la VH tiene la SEQ ID NO: 95. Algunos de los ácidos nucleicos incluyen una secuencia que codifica una VL que comprende o consiste en las SEQ ID NO: 93 y/o una secuencia que codifica una VH que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 95. También se describen en la presente vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos anteriores, como son células (p. ej., células CHO) que comprenden vectores de expresión de este tipo. También se describen métodos para producir un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo al cultivar células que contienen vectores de expresión de este tipo.

Se proporcionan en la presente anticuerpos DKK1 novedosos que son efectivos al tratar afecciones que requieren una formación del hueso incrementada, por ejemplo, reparación de fracturas o pérdida ósea asociada con afecciones patológicas, tales como mieloma múltiple. Además, se proporcionan en la presente combinaciones de agentes que incrementan anabolismo óseo, incluyendo combinaciones de DKK1 e inhibidores de esclerostina. Estas combinaciones pueden usarse para el tratamiento de, por ejemplo, osteoporosis, para incrementar la tasa de curación de fracturas y cualquier número de afecciones que requieren un incremento en la tasa de la formación de huesos. El agente terapéutico de combinación puede adoptar la forma de dos inhibidores separados, por ejemplo, un anticuerpo anti-esclerostina y un anticuerpo anti-DKK1, o pueden ser una entidad molecular pequeña, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Como se usa en la presente, un anticuerpo biespecífico enlaza un antígeno en uno de sus dos brazos de unión, y une un antígeno diferente en su segundo brazo. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de unión a antígeno distintos y es monovalente para cada antígeno a que se une. Anticuerpos DKK1 biespecíficos y bifuncionales pueden incluir una o más CDRs o una o más regiones variables como se describe arriba. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional en algunos casos es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos diferentes pares de cadena pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Estos anticuerpos biespecíficos pueden producirse por una diversidad de métodos, incluyendo, pero no limitados a fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véase, p. ej., Songsivilai y Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553.

Moléculas biespecíficas también pueden crearse de acuerdo con la invención por fusión. En un ejemplo, un anticuerpo de la invención puede enlazarse (p. ej., al expresar proteínas condensadas, enlace químico, asociación no covalente de alta afinidad o similares) a una o más de otras moléculas de unión. Ejemplos de moléculas de unión de este tipo incluyen, pero no se limitan a otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que resulta una molécula biespecífica.

Moléculas biespecíficas también pueden comprender una primera especificidad de unión para esclerostina y una segunda especificidad de unión para un segundo objetivo. Por ejemplo, el segundo objetivo puede ser otro epítipo de esclerostina diferente del primer epítipo. Otro ejemplo es una molécula biespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión para esclerostina y una segunda especificidad de unión para un epítipo dentro de DKK1. Otro ejemplo es una molécula biespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión para esclerostina y una segunda especificidad de unión para un epítipo dentro de LRP4. Adicionalmente, en los casos en los que la molécula biespecífica es multi-específica, la molécula puede incluir, además, una tercera especificidad de unión, además del primer y segundo epítipo objetivo.

En un aspecto, las moléculas biespecíficas comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, o un Fv de cadena sencilla de una secuencia de anticuerpo anti-DKK1 novedosa proporcionada en la presente. También puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla como se describe en Ladner et al. Patente de EE.UU. N° 4.946.778.

Moléculas biespecíficas pueden prepararse al conjugar químicamente las porciones de unión usando métodos conocidos en la técnica. Cuando las porciones de unión son proteínas o péptidos, puede usarse una diversidad de agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Ejemplos incluyen proteína A, carbodiimida, tioacetato de N-succinimidil-S-acetilo (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) o-fenilendimaleimida (oPDM), 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véase, p. ej., Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-1 32; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83, y Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375. Agentes de conjugación incluyen SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Cuando las porciones de unión son anticuerpos, pueden conjugarse por enlace de sulfhidrilo de las regiones de bisagra de las dos cadenas pesadas. En un aspecto, la región de bisagra se modifica para contener un número impar de residuos de sulfhidrilo, de manera que existe un grupo de sulfhidrilo libre que no ha formado un enlace disulfuro con una contraparte de cadena ligera o pesada correspondiente.

Moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Ejemplos no limitantes de métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen en diversas publicaciones de patente, incluyendo en la

Patente de EE.UU. Número 5.260.203; Patente de EE.UU. Número 5.455.030; Patente de EE.UU. Número 4.881.175; Patente de EE.UU. Número 5.132.405; Patente de EE.UU. Número 5.091.513; Patente de EE.UU. Número 5.476.786; Patente de EE.UU. Número 5.013.653; Patente de EE.UU. Número 5.258.498; Patente de EE.UU. Número 5.482.858; y Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 2010/0076178.

5 Ejemplos de participantes para cualquier terapia de combinación con inhibidores de DKK1 o moléculas bi- o multi-específicas que incluyen porciones de unión a DKK1 incluyen anticuerpos de esclerostina o fragmentos de unión que reconocen específicamente las proteínas esclerostina. Esclerostina se ha descrito previamente como que está implicada en regular la densidad ósea a través de trayectorias de señalización Wnt (documento PCT WO 06/119107).

10 Existe un informe de una combinación de un anticuerpo DKK1 y un anticuerpo de esclerostina en el que se sugiere que esta combinación puede incrementar la densidad mineral ósea del hueso trabecular o esponjoso más que uno solo en los animales modelo (documento PCT WO 09/047356) y mejorar el incremento en el contenido mineral óseo total, densidad y grosor cortical. Sin embargo, en aquellos ejemplos se usó hueso intacto, no hueso fracturado.

15 Los informes indican que la expresión de DKK1 es elevada en modelos de fractura de no uniones (Bajada, et al., 2009 Bone; 45(4):726-35). Asimismo, el hueso sano expresa niveles bajos de DKK1, ayudando a explicar el efecto limitado de los anticuerpos DKK1 solos en la BMD en hueso intacto (véase el Ejemplo 15). Por lo tanto, combinaciones de esclerostina e inhibidores de DKK1 para tratar fracturas son particularmente útiles dando la respuesta de curación sorprendentemente fuerte, incluyendo el incremento importante en la carga pico en un periodo relativamente corto.

20 Aminoácidos que se presentan de forma natural pueden dividirse en clases basadas en las propiedades de cadena lateral comunes: [0149] 1) hidrofóbicas: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; [0150] 2) hidrofílicas neutras: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; [0151] 3) de carácter ácido: Asp, Glu; [0152] 4) de carácter básico: His, Lys, Arg; [0153] 5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y [0154] 6) aromáticas: Trp, Tyr, Phe. Sustituciones de aminoácidos conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con otro miembro de la misma clase. Sustituciones de aminoácidos conservativas pueden abarcar residuos de aminoácido que no se presentan de forma natural, que se incorporan típicamente por síntesis de péptidos químicos en vez de síntesis en sistema biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácidos.

25 Sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de las clases de arriba por un miembro de otra clase. Residuos sustituidos de este tipo pueden introducirse en regiones del anticuerpo que son homólogas con anticuerpos humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

30 Al hacer este tipo de cambios, de acuerdo con ciertas realizaciones, se puede considerar el índice hidropático de aminoácidos. El perfil hidropático de una proteína se calcula al asignar a cada aminoácido un valor numérico ("índice de hidropatía") y luego promediar repetitivamente estos valores a lo largo de la cadena peptídica. A cada aminoácido se ha asignado un índice hidropático en base a su hidrofobicidad y características de carga. Existen: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptófano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5).

35 La importancia del perfil hidropático al conferir la función biológica interactiva en una proteína se entiende en la técnica (véase, por ejemplo, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). Se conoce que ciertos aminoácidos pueden sustituirse con otros aminoácidos que tienen un índice o una puntuación hidropática similar y todavía conservan una actividad biológica similar. Al hacer cambios en base al índice hidropático, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos, cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ . En algunos aspectos de la invención, se incluyen aquellos que están dentro de  $\pm 1$ , y en otros aspectos de la invención, se incluyen aquellos dentro de  $\pm 0.5$ .

40 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse efectivamente sobre la base de la hidrofiliidad, particularmente en los casos en los que el péptido o la proteína biológicamente funcional creada con ello está destinada al uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. En ciertas realizaciones, la hidrofiliidad promedio local mayor de una proteína, como se gobierna por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y unión a antígeno o inmunogenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

45 Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0  $\pm$  1); glutamato (+3.0  $\pm$  1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5  $\pm$  1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5) y triptófano (-3.4). Al hacer cambios en base a valores de hidrofiliidad similares, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de  $\pm 2$ , en

otras realizaciones, se incluyen aquellos que están dentro de  $\pm 1$ , y en todavía otras realizaciones, se incluyen aquellas dentro de  $\pm 0.5$ . En algunos casos, alguien también puede identificar epítomos de secuencias de aminoácidos primarias en base a la hidrofiliidad. A estas regiones también se las alude como “región de núcleo epitópicas”.

Un técnico experimentado será capaz de determinar variantes adecuadas de los polipéptidos como se establecen en la presente usando técnicas bien conocidas. Un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad al fijar como objetivo regiones no consideradas importantes para la actividad. El técnico experimentado también será capaz de identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En realizaciones adicionales, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura de polipéptido.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar los estudios de estructura-función identificando los residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. A la vista de una comparación de este tipo, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponde a los residuos de aminoácido importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácido químicamente similares para residuos de aminoácido importantes predichos de este tipo.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. A la vista de esa información, un experto en la técnica puede predecir el alineamiento de residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. Un experto en la técnica puede elegir no hacer cambios radicales a residuos de aminoácidos predichos para estar en la superficie de la proteína, ya que residuos de este tipo pueden implicarse en interacciones importantes con otras moléculas. Por otro lado, un experto en la técnica puede generar variantes de ensayo que contengan una sustitución de un solo aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Estas variantes luego pueden rastrearse usando ensayos para la actividad neutralizante de DKK1 (véanse los Ejemplos más adelante), proporcionando por lo tanto información con respecto a la cual los aminoácidos pueden cambiarse y cuáles no deben cambiarse. En otras palabras, en base a la información reunida de experimentos de rutina de este tipo, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las posiciones de aminoácido en donde deberían evitarse sustituciones adicionales, ya sea solas o en combinación otras mutaciones.

Un número de publicaciones específicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moulton, 1996, Curr. Op. in Biotech. 7:422-427; Chou et al., 1974, Biochemistry 13:222-245; Chou et al., 1974, Biochemistry 113:211-222; Chou et al., 1978, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47:45-148; Chou et al., 1979, Ann. Rev. Biochem. 47:251-276; y Chou et al., 1979, Biophys. J. 26:367-384. Además de ello, los programas de computadora están actualmente disponibles para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un método de predecir la estructura secundaria es en base al modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia mayor que 30%, o una similitud mayor que 40% tienen a menudo topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de proteínas (PDB) ha proporcionado una predictibilidad potenciada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de pliegues dentro de una estructura de polipéptido o proteína. Véase Holm et al., 1999, Nucl. Acid. Res. 27:244-247. Se ha sugerido (Brenner et al., 1997, Curr. Op. Struct. Biol. 7:369-376) que existe un número limitado de pliegues en un polipéptido o proteína dado y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá drásticamente más exacta.

Métodos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen “reconocimiento del plegamiento” (Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377-87; Sippl et al., 1996, Structure 4:15-19), “análisis del perfil” (Bowie et al., 1991, Science 253:164-170; Gribskov et al., 1990, Meth. Enzym. 183:146-159; Gribskov et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. 84:4355-4358), y “enlace evolutivo” (Véase Holm, 1999, supra; y Brenner, 1997, supra).

En algunos aspectos, se hacen sustituciones de aminoácido que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión del antígeno o ligando, y/o (4) confieren o modifican otras propiedades físico-químicas o funcionales en polipéptidos de este tipo. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido sencillas o múltiples (en ciertas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) pueden hacerse en la secuencia que se presenta de forma natural. Las sustituciones pueden hacerse en la porción del anticuerpo que se encuentra fuera del o de los dominios que forman el o los contactos intermoleculares. En aspectos de este tipo, pueden usarse las sustituciones de aminoácido conservativas que no cambian sustancialmente las características estructurales de la secuencia precursora (p. ej., uno o más aminoácidos de reemplazo que no interrumpen la estructura secundaria que caracteriza el anticuerpo precursor o nativo). Ejemplos de las estructuras secundarias y terciarias de polipéptido reconocidas en la técnica se describen en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed.), 1984, W. H. New York: Freeman and Company; Introduction to Protein Structure (Branden y Tooze, eds.), 1991, New York: Garland Publishing; y Thornton et al., 1991, Nature 354: 105.



Se describen variantes de glicosilación de los anticuerpos inventivos en donde el número y/o tipo de sitios de glicosilación se ha alterado comparado con las secuencias de aminoácidos del polipéptido precursor. En ciertos aspectos, las variantes de proteína del anticuerpo comprenden un número mayor o uno menor de sitios de glicosilación ligados a N que el anticuerpo nativo. Un sitio de glicosilación ligado a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido, excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácido para crear esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidratos enlazada a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan o alteran esta secuencia prevendrán la adición de una cadena de carbohidratos enlazada a N presente en el polipéptido nativo. Por ejemplo, la glicosilación puede reducirse por la delección de un Asn o al sustituir el Asn con un aminoácido diferente. En otras realizaciones, se crean uno o más nuevos sitios enlazados a N. Los anticuerpos tienen típicamente un sitio de glicosilación enlazado a N en la región Fc.

Variantes de anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína, en donde uno o más residuos de cisteína en la secuencia de aminoácidos precursora o nativa se eliminan de o se sustituyen con otro aminoácido (p. ej., serina). Las variantes de cisteína son útiles, entre otros, cuando los anticuerpos deben replegarse en una conformación biológicamente activa. Variantes de cisteína pueden tener menos residuos de cisteína que el anticuerpo nativo, y típicamente tienen un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas no apareadas.

Las cadenas pesadas y ligeras, dominios de regiones variables y CDRs que se describen pueden usarse para preparar polipéptidos que contienen una región de unión al antígeno que puede unirse específicamente a un polipéptido DKK1. Por ejemplo, una o más de las CDRs enumeradas en la Tabla 1 pueden incorporarse en una molécula (p. ej., un polipéptido) de forma covalente o no covalente para hacer una inmuno adhesión. Una inmuno adhesión puede incorporar la o las CDRs como parte de una cadena polipeptídica más larga, puede ligar covalentemente la o las CDRs a otra cadena polipeptídica, o puede incorporar la o las CDRs de forma no covalente. La o las CDRs permiten la inmuno adhesión para unirse específicamente a un antígeno particular de interés (p. ej., un polipéptido DKK1 o epítopo del mismo).

También se proporcionan miméticos (p. ej., "miméticos de péptido" o "peptidomiméticos") en base a los dominios de región variable y CDRs que se describen en la presente. Estos análogos pueden ser péptidos, no péptidos o combinaciones regiones de péptido y de no péptido. Fauchere, 1986, Adv. Drug Res. 15: 29; Veber y Freidinger, 1985, TINS pág. 392; y Evans et al., 1987, J. Med. Chem. 30: 1229. Los miméticos de péptido que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto profiláctico o terapéutico similar. Compuestos de este tipo se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular computarizado. Generalmente, los peptidomiméticos de la invención son proteínas que son estructuralmente similares a un anticuerpo que exhibe una actividad biológica deseada, tal como aquí la capacidad de unirse específicamente a DKK1, pero tienen uno o más enlaces de péptidos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionada de: --CH<sub>2</sub>NH--, --CH<sub>2</sub>S--, --CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--, --CH--CH (cis y trans), --COCH<sub>2</sub>--, --CH(OH)CH<sub>2</sub>-- y --CH<sub>2</sub>SO--, por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse en ciertas realizaciones de la invención para generar proteínas más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden generarse por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61: 387), por ejemplo, al agregar residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

También se proporcionan derivados de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se describen en la presente. El anticuerpo o fragmento derivatizado puede comprender cualquier molécula o sustancia que imparte una propiedad deseada para el anticuerpo o fragmento, tal como semivida incrementada en un uso particular. El anticuerpo derivatizado puede comprender, por ejemplo, un resto detectable (o de marcaje) (p. ej., una molécula radiactiva, colorimétrica, antigénica o enzimática, una perla detectable (tal como una perla magnética o electrodensa (p. ej., oro)), o una molécula que se une a otra molécula (p. ej., biotina o estreptavidina)), un resto terapéutico o de diagnóstico (p. ej., un resto radiactivo, citotóxico o farmacéuticamente activo), o una molécula que incrementa la idoneidad del anticuerpo para un uso particular (p. ej., administración a un sujeto, tal como un sujeto humano, u otros usos in vivo o in vitro). Ejemplos de moléculas que pueden usarse para derivatizar un anticuerpo incluyen albúmina (p. ej., albúmina de suero humana) y polietilenglicol (PEG). Derivados enlazados a albúmina y PEGilados de anticuerpos pueden prepararse usando técnicas bien conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo está conjugado o enlazado de otra manera a transtiretina (TTR) o una variante de TTR. La TTR o variante de TTR puede modificarse químicamente con, por ejemplo, un compuesto químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(n-vinil pirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxi etilados y poli(alcoholes vinílicos).

Otros derivados incluyen conjugados covalentes o agregativos de anticuerpos anti-DKK1, o fragmentos de los mismos, con otras proteínas o polipéptidos, tales como por expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos condensados al extremo N o al extremo C de un polipéptido de anticuerpo anti-DKK1. Por

ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido de señal heteróloga (o conductor), p. ej., el conductor de factor alfa de levadura, o un péptido tal como una etiqueta de epítipo. Proteínas de fusión que contienen el anticuerpo anti-DKK1 pueden comprender péptidos agregados para facilitar la purificación o identificación del anticuerpo anti-DKK1 (p. ej., poli-His). Un polipéptido del anticuerpo anti-DKK1 también puede enlazarse al péptido FLAG tal como se describe en Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988, y Patente de EE.UU. N° 5.011.912. El péptido FLAG es altamente antigénico y proporciona un epítipo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal (mAb) específico, que permite el ensayo rápido y la purificación fácil de la proteína recombinante expresada. Reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las cuales el péptido FLAG está condensado a un polipéptido dado están comercialmente disponibles (Sigma, St. Louis, Mo.).

Oligómeros que contienen uno o más polipéptidos de anticuerpo anti-DKK1 pueden emplearse como antagonistas de DKK1. Los oligómeros pueden estar en forma de dímeros, trímeros o superiores enlazados de forma covalente o enlazados de forma no covalente. Oligómeros que comprenden dos o más polipéptidos del anticuerpo anti-DKK1 se contemplan para uso, siendo un ejemplo un homodímero. Otros oligómeros incluyen heterodímeros, homotrímeros, heterotrímeros, homotetrámeros, heterotetrámeros, etc.

Una realización se dirige a oligómeros que comprenden múltiples polipéptidos de anticuerpo anti-DKK1 unidos por medio de interacciones covalentes o no covalentes entre los restos de péptido condensados a los polipéptidos de anticuerpo anti-DKK1. Péptidos de este tipo pueden ser enlazadores (espaciadores) de péptidos, o péptidos que tienen la propiedad de fomentar la oligomerización. Cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de los anticuerpos están entre los péptidos que pueden fomentar la oligomerización de los polipéptidos de anticuerpo anti-DKK1 fijados a los mismos, como se describe con más detalle más adelante.

En realizaciones particulares, los oligómeros comprenden desde dos a cuatro polipéptidos de anticuerpo anti-DKK1. Los restos del anticuerpo anti-DKK1 del oligómero pueden estar en cualquiera de las formas descritas arriba, p. ej., variantes o fragmentos. Preferiblemente, los oligómeros comprenden los polipéptidos de anticuerpo anti-DKK1 que tienen actividad de unión a DKK1.

En una realización, se prepara un oligómero usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. Se ha descrito la preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpo (incluyendo el dominio Fc), p. ej., por Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA* 88:10535; Byrn et al., 1990, *Nature* 344:677; y Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulina Fusion Proteins", en *Current Protocols in Immunology*, Supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11.

Un aspecto de la presente divulgación se dirige a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas al fusionar un fragmento de unión a DKK1 de un anticuerpo anti-DKK1 a la región Fc de un anticuerpo. El dímero puede hacerse al insertar, por ejemplo, una fusión de gen que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, que expresa la fusión de gen en células huéspedes transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitiendo que la proteína de fusión expresada se ensamble tanto como moléculas de anticuerpo, después de lo cual los enlaces disulfuro entre cadenas se forman entre los restos Fc para proporcionar el dímero.

La expresión "polipéptido Fc", tal como se usa en la presente, incluye formas nativas y de muteína de los polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen formas truncadas de polipéptidos de este tipo que contienen la región de bisagra que fomenta la dimerización. Proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y oligómeros formados a partir de los mismos) ofrecen la ventaja de una purificación fácil por cromatografía de afinidad sobre las columnas de la Proteína A o Proteína G.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151 y las Patentes de EE.UU. N°s 5.426.048 y 5.262.522, es un polipéptido de cadena sencilla que se extiende de la región de bisagra del extremo N al extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente de EE.UU. N° 5.457.035 y en Baum et al., 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe afinidad reducida por los receptores Fc.

En otras realizaciones, la porción variable de las cadenas pesadas y/o ligeras de un anticuerpo anti-DKK1 tal como se describe en la presente puede sustituirse con la porción variable de una cadena pesada y/o ligera de anticuerpo.

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples polipéptidos de anticuerpo anti-DKK1, con o sin enlazadores de péptidos (péptidos espaciadores). Entre los enlazadores de péptido adecuados se encuentran los descritos en las Patentes de EE.UU. N°s 4.751.180 y 4.935.233.

Otro método para preparar derivados de anticuerpo anti-DKK1 oligoméricos implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de la cremallera de leucina son péptidos que fomentan la oligomerización de las proteínas en las cuales se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), y ya se han encontrado en una diversidad de diferentes proteínas. Entre las cremalleras de leucina conocidas están péptidos que se presentan de forma natural y derivados de los mismos que se dimerizan o trimerizan. Ejemplos de dominios de la cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína D del tensoactivo de pulmón (SPD) descrita en Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga condensada a la misma se describe en Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinante que comprenden un fragmento de anticuerpo anti-DKK1 o derivado condensado a un péptido de la cremallera de leucina se expresan en células huéspedes adecuadas, y los fragmentos de anticuerpo anti-DKK1 oligoméricos solubles o derivados que forman se recuperan del sobrenadante del cultivo.

Algunos anticuerpos que se proporcionan tienen una afinidad de enlace ( $K_a$ ) para DKK1 de al menos  $10^4$  o  $10^5/M \times$  segundos medida, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos que figuran más adelante. Otros anticuerpos tienen una  $K_a$  de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  o  $10^9/M \times$  segundos. Ciertos anticuerpos que se proporcionan tienen una tasa de disociación baja. Algunos anticuerpos, por ejemplo, tienen una  $K_{inactiva}$  de  $1 \times 10^{-4}s^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-5}s^{-1}$  o inferior.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-DKK1 que tiene una semivida de al menos un día in vitro o in vivo (p. ej., cuando se administra a un sujeto humano). En una realización, el anticuerpo tiene una semivida de al menos tres días. En otra realización, el anticuerpo o porción del mismo tiene una semivida de cuatro días o más larga. En otra realización, el anticuerpo o porción del mismo tiene una semivida de ocho días o más larga. En otra modalidad, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo se derivatiza o modifica de manera que tiene una semivida media más larga en comparación con el anticuerpo no derivatizado o no modificado. En otra realización, el anticuerpo contiene mutaciones puntuales para incrementar la semivida en suero, tal como se describe en el documento WO 00/09560.

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una o ambas cadenas de un anticuerpo de la invención, o un fragmento, derivado, muteína o variante del mismo, polinucleótidos suficientes para uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de la secuenciación para identificar, analizar, mutar o amplificar un polinucleótido que codifica un polipéptido, ácidos nucleicos anti-sentido para inhibir la expresión de un polinucleótido y secuencias complementarias de lo anterior. Los ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud. Pueden ser, por ejemplo, de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1,000, 1,500, 3,000, 5,000 o más nucleótidos de longitud, y/o pueden comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias reguladoras, y/o pueden ser parte de un ácido nucleico más grande, por ejemplo, un vector. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble y pueden comprender nucleótidos de ARN y/o ADN, y variantes artificiales de los mismos (p. ej., ácidos nucleicos de péptidos).

Se describen ácidos nucleicos que codifican el epítipo al cual se unen ciertos de los anticuerpos proporcionados en la presente y codifican los aminoácidos 221-229 y/o 246-253 de la SEQ ID NO: 2, como son ácidos nucleicos que codifican aminoácidos 221-236 y/o 246-262 de la SEQ ID NO: 2 y aquellos que codifican los aminoácidos 221 a 262 de la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos 221-253 de la SEQ ID NO: 2. También se describen ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que incluyen estos péptidos.

Polipéptidos de anticuerpo que codifican el ADN (p. ej., cadena pesada o ligera, dominio variable único, o longitud completa) pueden aislarse de células B de ratones que han sido inmunizados con DKK1 o un fragmento inmunogénico del mismo. El ADN puede aislarse por procedimientos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La expresión en fagos es otro ejemplo de una técnica conocida, con lo que pueden prepararse derivados de anticuerpos. En un enfoque, los polipéptidos que son componentes de un anticuerpo de interés se expresan en cualquier sistema de expresión recombinante adecuado, y se deja que los polipéptidos expresados se ensamblen para formar moléculas de anticuerpo.

Ácidos nucleicos ejemplares que codifican las cadenas ligeras y pesadas, regiones variables y CDRs de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan se enumeran en la Tabla 1 de arriba. Debido a la degeneración del código genético, cada una de las secuencias polipeptídicas enumeradas en la Tabla 1 también son codificadas por un número grande de otras secuencias de ácidos nucleicos además de las enumeradas en la Tablas 1. La presente divulgación proporciona cada una de las secuencias de nucleótidos degeneradas que codifican cada uno de los anticuerpos de la invención.

Se describen ácidos nucleicos que se hibridan a otros ácidos nucleicos (p. ej., ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótido enumerada en las Tablas 1-3) bajo condiciones de hibridación particulares. Métodos para hibridar

ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Como se define en la presente, una condición de hibridación moderadamente rigurosa usa una solución de prelavado que contiene 5 veces cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC), SDS al 0.5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de alrededor de 50% de formamida, 6 veces de SSC, y una temperatura de hibridación de 55°C (u otras soluciones de hibridación similares, tal como una que contiene alrededor de 50% de formamida, con una temperatura de hibridación de 42 grados C), y condiciones de lavado de 60°C, en 0,5x SSC, SDS al 0,1%. Una condición de hibridación rigurosa se hibrida en 6x SSC a 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,1x SSC, SDS al 0.2% a 68°C. Adicionalmente, un experto en la técnica puede manipular las condiciones de hibridación y/o lavado para incrementar o disminuir la rigurosidad de hibridación, de manera que los ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótido que son al menos 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 o 99% idénticas entre sí típicamente permanecen hibridadas una con otra.

Los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y de guía para diseñar condiciones adecuadas se establecen, por ejemplo, por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11; y Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4), y pueden fácilmente determinarse por aquellos que tienen una experiencia ordinaria en la técnica en base, por ejemplo, a la longitud y/o composición base del ADN.

Pueden introducirse cambios por mutación en un ácido nucleico, conduciendo con ello a cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (p. ej., un anticuerpo o derivado de anticuerpo de la invención) que lo codifica. Pueden introducirse mutaciones usando cualquier técnica conocida en la técnica. En una realización, se cambian uno o más residuos de aminoácidos particulares usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis dirigida al sitio. En otra realización, se cambian uno o más residuos seleccionados aleatoriamente usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis aleatoria. Sin embargo si esto se hace, un polipéptido mutante puede expresarse y rastrearse en cuanto a una propiedad deseada.

En un ácido nucleico pueden introducirse mutaciones sin alterar significativamente la actividad biológica de un polipéptido que lo codifica. Por ejemplo, se puede hacer sustituciones de nucleótido que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos no esenciales. Alternativamente, una o más mutaciones pueden introducirse en un ácido nucleico que cambia selectivamente la actividad biológica de un polipéptido que lo codifica. Por ejemplo, la mutación puede cambiar cuantitativa o cualitativamente la actividad biológica. Ejemplos de cambios cuantitativos incluyen incrementar, reducir o eliminar la actividad. Ejemplos de cambios cualitativos incluyen cambiar la especificidad del antígeno de un anticuerpo.

Se describen moléculas de ácido nucleico que son adecuadas para uso como cebadores o sondas de hibridación para la detección de secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Una molécula de ácido nucleico puede comprender solo una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa de la invención, por ejemplo, un fragmento que puede usarse como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una porción activa (p. ej., una porción de unión a DKK1) de un polipéptido de la invención.

Sondas basadas en la secuencia de un ácido nucleico pueden usarse para detectar el ácido nucleico o ácidos nucleicos similares, por ejemplo, transcritos que codifican un polipéptido de la invención. La sonda puede comprender un grupo de marcaje, p. ej., un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un co-factor de enzima. Sondeas de este tipo pueden usarse para identificar una célula que expresa.

Se describen vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o una porción del mismo (p. ej., un fragmento que contiene una o más CDRs o uno o más dominios de región variable). Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a plásmidos, vectores víricos, vectores de mamíferos no episomales y vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender un ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células huéspedes a usar para la expresión, que está operativamente enlazada a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huéspedes (p. ej., potenciador del gen temprano SV40, promotor del virus del sarcoma de Rous y promotor de citomegalovirus), aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células huéspedes (p. ej., secuencias reguladoras específicas para el tejido, véase Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis et al., 1987, Science 236:1237), y las que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en respuesta al tratamiento o a la afección particular (p. ej., el promotor de metalotionina en células de mamífero y el promotor que responde a tet y/o que responde a estreptomycin en sistemas tanto procarióticos como eucarióticos (véase id.)). Se apreciará por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión

pueden introducirse en células huéspedes para producir con ello proteínas o péptidos, incluyendo proteínas de fusión o péptidos, codificados por ácidos nucleicos como se describe en la presente.

Se describen células huéspedes en las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante. Una célula huésped puede ser cualquier célula procariótica (por ejemplo, *E. coli*) o célula eucariótica (por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero (p. ej., células CHO)). El ADN del vector puede introducirse en células procarióticas o eucarióticas por medio de técnicas de transformación o transfección convencionales. Para una transfección estable de células de mamífero se conoce que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección usados, solo una fracción pequeña de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con objeto de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (p. ej., para resistencia a los antibióticos) se introduce generalmente en las células huéspedes junto con el gen de interés. Marcadores seleccionables preferidos incluyen los que confieren resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Células establemente transfectadas con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármaco (p. ej., células que tienen incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán), entre otros métodos.

Los anticuerpos no humanos que se proporcionan pueden derivarse, por ejemplo, de cualquier animal productor de anticuerpos, tal como ratón, rata, conejo, cabra, burro o primate no humano (tal como mono (p. ej., mono cynomolgus o rhesus) o simio (p. ej., chimpancé)). Pueden usarse anticuerpos no humanos, por ejemplo, en aplicaciones basadas en cultivo celular in vitro y en cultivo celular, o cualquier otra aplicación en la que una respuesta inmunitaria para el anticuerpo no se produce o es insignificante, puede prevenirse, no es una preocupación o se desea. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden producirse al inmunizar con DKK1 de longitud completa o con la mitad carboxi-terminal de DKK1. Alternativamente, los ciertos anticuerpos no humanos pueden producirse al inmunizar con aminoácidos 221-236 y/o aminoácidos 246-262 de la SEQ ID NO: 2, que son segmentos de DKK1 humana que forman parte del epítipo al cual se unen ciertos anticuerpos proporcionados en la presente (p. ej., el 11H10, véase la FIG. 1). Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales o pueden sintetizarse en células huéspedes al expresar ADN recombinante.

Anticuerpos completamente humanos pueden prepararse como se describe arriba al inmunizar animales transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana o al seleccionar una colección de expresión en fagos que expresa un repertorio de anticuerpos humanos.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la invención pueden producirse por una diversidad de técnicas, incluyendo metodología de anticuerpo monoclonal convencional, p. ej., la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256: 495. Alternativamente, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B. Un sistema animal adecuado para preparar hibridomas es el sistema murino, que es un procedimiento muy bien establecido. Técnicas y protocolos de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. Para procedimientos de este tipo, células B de ratones inmunizados se fusionan con un participante en la fusión inmortalizado adecuado, tal como una línea celular de mieloma de murino. Si se desea, las ratas u otros mamíferos pueden inmunizarse además en lugar de los ratones y células B de estos animales pueden fusionarse con la línea celular de mieloma de murino para formar hibridomas. Alternativamente, puede usarse una línea celular de mieloma de una fuente diferente de ratón. Procedimientos de fusión para hacer hibridomas también son bien conocidos.

Los anticuerpos de cadena sencilla que se proporcionan pueden formarse al enlazar fragmentos del dominio variable de cadena ligera y pesada (región Fv) (véase, p. ej., la Tabla 1) por medio de un puente de aminoácido (enlazador de péptido corto), resultando una cadena polipeptídica sencilla. Fvs de cadena sencilla (scFvs) de este tipo pueden prepararse al fusionar ADN que codifica un enlazador de péptido entre ADNs que codifican los dos polipéptidos de dominio variable (VL y VH). Los polipéptidos resultantes pueden plegarse de nuevo por sí mismos para formar monómeros de unión a antígeno, o pueden formar multímeros (p. ej., dímeros, trímeros, o tetrámeros), dependiendo de la longitud de un enlazador flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al., 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108). Al combinar diferentes polipéptidos que comprenden VL y VH se pueden formar scFvs multiméricos que se unen a diferentes epítopos (Kriangkum et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40). Técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en la Patente de EE.UU. Nº 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879; Ward et al., 1989, *Nature* 334:544, de Graaf et al., 2002, *Methods Mol Biol.* 178:379-87.

Anticuerpos proporcionados en la presente, que son de una subclase, pueden cambiarse a anticuerpos de una diferente subclase usando métodos de intercambio de subclases. Por ejemplo, los dominios variables representados en la Tabla 1 pueden unirse a dominios constantes de cualquier subtipo de Ig deseado. Técnicas de este tipo permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo precursor), pero también exhiben propiedades biológicas asociadas con un isotipo o una subclase de anticuerpo diferente de aquel del anticuerpo precursor. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinantes. Polipéptidos de anticuerpo particulares que

codifican el ADN clonado pueden emplearse en procedimientos de este tipo, p. ej., ADN que codifica el dominio constante de un anticuerpo del isotipo deseado. Véase, p. ej., Lantto et al., 2002, *Methods Mol. Biol.* 178:303-16.

En consecuencia, los anticuerpos que se proporcionan incluyen un isotipo deseado (por ejemplo, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE e IgD) así como fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub> de los mismos. Además, si se desea un IgG4, también puede desearse introducir una mutación puntual en la región de bisagra como se describe en Bloom et al., 1997, *Protein Science* 6:407) para aliviar una tendencia para formar enlaces disulfuro de cadena intra-H que pueden conducir a una heterogeneidad en los anticuerpos IgG4.

Además, también se conocen técnicas para derivar anticuerpos que tienen propiedades diferentes (es decir, afinidades variadas para el antígeno al cual se unen). Una técnica de este tipo, a la que se alude como transposición de la cadena, implica exponer repertorios de gen de dominio variable de inmunoglobulina en la superficie de bacteriófago filamentosos, a menudo referida como expresión en fagos. La transposición de la cadena se ha usado para preparar anticuerpos de alta afinidad para la haptén 2-feniloxazol-5-ona, como se describe por Marks et al., 1992, *BioTechnology*, 10:779.

Pueden hacerse modificaciones conservadoras a las cadenas pesada y ligera descritas en la Tabla 1 (y modificaciones correspondientes para los ácidos nucleicos codificantes) para producir un anticuerpo anti-DKK1 que tiene características funcionales y bioquímicas. Métodos para alcanzar modificaciones de este tipo se describen anteriormente.

Anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos de acuerdo con la invención pueden modificarse además de diversas maneras. Por ejemplo, si estos se han de usar para fines terapéuticos, pueden conjugarse con polietilenglicol (pegilado) para prolongar la semivida en suero o para potenciar el suministro de proteínas. Alternativamente, la región V de los anticuerpos objeto o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con la región Fc de una molécula de anticuerpo diferente. La región Fc usada para este propósito puede modificarse de manera que no une el complemento, reduciendo por lo tanto la probabilidad de inducir una lisis celular en el paciente cuando se usa la proteína de fusión como un agente terapéutico. Además, los anticuerpos objeto o fragmentos funcionales de los mismos pueden conjugarse con albúmina de suero humano para aumentar la semivida en suero del anticuerpo o fragmento del mismo. Otro participante en la fusión útil para los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos es transtiretina (TTR). TTR tiene la capacidad de formar un tetrámero, por lo tanto una proteína de fusión anticuerpo-TTR puede formar un anticuerpo multivalente que puede incrementar la avidez de unión.

Alternativamente, modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o bioquímicas de los anticuerpos y fragmentos descritos en la presente pueden alcanzarse al crear sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren significativamente en su efecto en mantener (a) la estructura de la columna molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo o (c) el volumen de la cadena lateral. Una "sustitución de aminoácido conservativa" puede implicar la sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo no nativo que tiene poco o ningún efecto en la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Adicionalmente, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede ser sustituido con alanina, como se ha descrito previamente para la mutagénesis de rastreo de alanina.

Sustituciones de aminoácidos (ya sean conservativas o no conservativas) de los anticuerpos objeto pueden implementarse por los expertos en la técnica al aplicar técnicas de rutina. Las sustituciones de aminoácido pueden usarse para identificar residuos importantes de los anticuerpos proporcionados en la presente, o para incrementar o reducir la afinidad de estos anticuerpos para DKK1 humana o para modificar la afinidad de unión de otros anticuerpos anti-DKK1 descritos en la presente.

Los anticuerpos anti-DKK1 y fragmentos funcionales inmunológicos pueden prepararse por cualquiera de un cierto número de técnicas convencionales. Por ejemplo, anticuerpos anti-DKK1 pueden producirse por sistemas de expresión recombinantes, usando cualquier técnica conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.) Plenum Press, New York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse en líneas celulares de hibridoma o en líneas celulares distintas de hibridoma. Las construcciones de expresión que codifican los anticuerpos pueden usarse para transformar una célula huésped de mamífero, insecto o microbiana. La transformación puede realizarse usando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, empaquetamiento del polinucleótido en un virus o bacteriófago y transducción de una célula huésped con la construcción por procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica por las Patentes de EE.UU. N°s 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. El procedimiento de transformación óptimo usado dependerá de qué tipo de célula huésped se esté transformando. Métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a transfección mediada por dextrano, precipitación de fosfato de calcio,

transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del o de los polinucleótidos en liposomas, mezcla de ácido nucleico con lípidos cargados de forma positiva y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Construcciones de expresión recombinante de la invención comprenden típicamente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende uno o más de los siguientes: una región constante de cadena pesada (p. ej., CH1, CH2 y/o CH3); una región variable de cadena pesada; una región constante de cadena ligera; una región variable de cadena ligera; una o más CDRs de la cadena ligera o pesada del anticuerpo anti-DKK1. Estas secuencias de ácidos nucleicos se insertan en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento estándares. En una realización, la región constante de cadena pesada o ligera de 11H10 se anexa al extremo C de la región variable de cadena pesada o ligera específica para DKK-1 y se liga en un vector de expresión. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped, lo que permite que pueda producirse la amplificación y/o expresión del gen). En algunas realizaciones, se usan vectores que emplean ensayos de complementación proteína-fragmento usando informadores de proteínas, tal como dihidrofolato reductasa (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 6.270.964). Vectores de expresión apropiados pueden adquirirse, por ejemplo, de Invitrogen Life Technologies o BD Biosciences (anteriormente "Clontech"). Otros vectores útiles para clonar y expresar los anticuerpos y fragmentos de la invención incluyen los descritos en Bianchi y McGrew, *Biotech Bioeng* 84(4):439-44 (2003). Vectores de expresión apropiados adicionales se comentan, por ejemplo, en *Methods Enzymol*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press.

Típicamente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células huéspedes contienen secuencias para el mantenimiento de plásmidos o virus y para clonar y expresar secuencias de nucleótidos exógenas. Secuencias de este tipo, a las que se alude colectivamente como "secuencias flanqueantes" incluyen típicamente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos enlazadas operativamente: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme de donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia conductora para la secreción de polipéptido, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de poli-enlazador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar y un elemento marcador seleccionable.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de "etiqueta", esto es, una molécula de oligonucleótido localizada en el extremo 5' o 3' de la secuencia de codificante, la secuencia de oligonucleótido que codifica polyHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" para la que existen anticuerpos comercialmente disponibles, tal como FLAG<sup>®</sup>, HA (hemaglutinina del virus de influenza) o myc. La etiqueta típicamente se fusiona a la proteína de anticuerpo tras la expresión, y puede servir como un medio para la purificación por afinidad del anticuerpo de la célula huésped. La purificación por afinidad puede realizarse, por ejemplo, por cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente del polipéptido de anticuerpo purificado por diversos medios tal como usando ciertas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes en el vector de expresión pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heteróloga (es decir, de una especie diferente de la especie o cepa de la célula huésped), híbrida (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintética o nativa. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismos procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, con la condición de que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda activarse por la maquinaria de la célula huésped.

Secuencias flanqueantes útiles en los vectores pueden obtenerse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en la presente tendrán que identificarse previamente por mapeo y/o por digestión de endonucleasa de restricción y, por lo tanto, pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótido completa de una secuencia flanqueante. Aquí, la secuencia flanqueante puede sintetizarse usando los métodos descritos en la presente para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

En los casos en los que se conoce toda o solo una parte de la secuencia flanqueante, ésta puede obtenerse usando PCR y/o por selección de una colección genómica con una secuencia de oligonucleótidos y/o flanqueante apropiada de la misma u otra especie. En los casos en los que no se conoce la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante de un trozo más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede realizarse por digestión de endonucleasa de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado, seguido por aislamiento usando la purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen<sup>™</sup> (Chatsworth, Calif.), u otros métodos conocidos por el técnico experto. La selección de enzimas apropiadas para conseguir este propósito resultará fácilmente aparente para los expertos en la técnica.



Un origen de replicación es, típicamente, una parte de vectores de expresión procarióticos, particularmente los adquiridos comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector en la célula huésped. Si el vector de elección no contiene un origen del sitio de replicación, se puede sintetizar químicamente en base a una secuencia conocida, y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, Mass.) es apropiado para la mayoría de bacterias gram-negativas y diversos orígenes (p. ej., SV40, polioma, adenovirus, virus de estomatitis vesicular (VSV) o virus del papiloma tal como HPV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, no se necesita un origen de replicación de mamífero para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen SV40 a menudo se usa solo debido a que contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación contendrán típicamente un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se enlaza operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-DKK1 o fragmento inmunológicamente funcional del mismo. Los promotores son secuencias no transcritas localizadas aguas arriba (es decir, 5') al codón de inicio de un gen estructural (generalmente con alrededor de 100 hasta 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles incrementados de la transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otro lado, inician la producción continua de producto génico; esto es, hay poco o ningún control experimental sobre la expresión del gen. Son bien conocidos un gran número de promotores, reconocidos por una diversidad de células huéspedes potenciales. Un promotor apropiado está enlazado operativamente al anticuerpo anti-DKK1 que codifica el ADN al eliminar el promotor del ADN fuente por digestión de enzima de restricción o amplificando el promotor por reacción de cadena de la polimerasa e insertar la secuencia de promotor deseada en el vector.

Promotores apropiados para uso con huéspedes de levadura también son bien conocidos en la técnica. Los potenciadores de levadura se usan ventajosamente con promotores de levadura. Promotores apropiados para uso con células huéspedes de mamífero son bien conocidos e incluyen, pero no se limitan a los obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de influenza aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y, lo más preferiblemente, Virus 40 de Simio (SV40). Otros promotores de mamífero apropiados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque de calor y el promotor de actina.

Promotores particulares útiles en la práctica de los vectores de expresión recombinantes de la invención incluyen, pero no se limitan a: la región de promotor temprano SV40 (Bemoist y Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); el promotor de CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., 1980, *Cell* 22: 787-97); el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444-45); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster et al., 1982, *Nature* 296: 39-42); vectores de expresión procarióticos, tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 3727-31); o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 21-25). También están disponibles para uso las siguientes regiones de control de la transcripción animal, que exhiben especificidad para el tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I que es activo en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, *Cell* 38: 63946; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); la región de control del gen de insulina que es activo en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); la región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activo en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45: 485-95); la región de control del gen de albúmina que es activo en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1: 268-76); la región de control de gen de proteína alfa-feto que es activo en el hígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-48; Hammer et al., 1987, *Science* 235: 53-58); la región de control del gen alfa 1-antitripsina que es activo en el hígado (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1: 161-71); la región de control del gen beta-globina que es activo en células mieloides (Mogram et al., 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias et al., 1986, *Cell* 46: 89-94); la región de control del gen de proteína básica de mielina que es activo en células de oligodendrocitos en el cerebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48: 703-12); la región de control del gen de cadena 1 ligera de miosina que es activo en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); la región de control del gen de hormona de liberación gonadotrófica que es activo en el hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234: 1372-78); y más particularmente la región de control del gen de inmunoglobulina que es activo en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38: 647-58; Adames et al., 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell Biol.* 7: 1436-44).

Una secuencia potenciadora puede insertarse en el vector para incrementar la transcripción en eucariotas superiores de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-DKK1 o fragmento inmunológicamente funcional del mismo de la presente invención. Los potenciadores son elementos de acción cis de ADN, usualmente alrededor de 10-300 pb de longitud, que actúan en los promotores para incrementar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y posición. Se han encontrado 5' y 3' con respecto a la unidad de transcripción. Varias secuencias potenciadoras disponibles de los genes de mamíferos son conocidas (p. ej., globina, elastasa, albumina, alfa-feto-proteína e insulina). También puede usarse una secuencia potenciadora de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del

promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma y potenciadores de adenovirus son ejemplos de elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. Si bien un potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a una molécula de ácido nucleico, se coloca típicamente en un sitio 5' con respecto al promotor.

- 5 En vectores de expresión, una secuencia de terminación de la transcripción se ubica típicamente 3' con respecto al extremo de una región codificante de polipéptidos y sirve para terminar la transcripción. Una secuencia de terminación de la transcripción usada para la expresión en células procarióticas es típicamente un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia poli-T. Mientras que la secuencia se clona fácilmente de una colección o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también puede ser fácilmente sintetizada usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos  
10 como los descritos en la presente.

- Un elemento seleccionable de gen marcador codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped que se cultiva en un medio de cultivo selectivo. Genes típicos de marcador de selección usados en vectores de expresión codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células huéspedes procarióticas; (b) complementan deficiencias auxotróficas de las células; o (c)  
15 suministran nutrientes críticos no disponibles del medio de complejo. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. Un gen bacteriano de resistencia a la neomicina también puede usarse para selección en células huéspedes tanto procarióticas como eucarióticas.

- Otra selección de genes puede usarse para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es un proceso por el cual los genes que no pueden ser expresados en copia sencilla a niveles lo suficientemente altos como para permitir la supervivencia y el crecimiento de las células bajo ciertas condiciones de selección se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Ejemplos de marcadores seleccionables amplificables adecuados para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa sin promotor. En el uso de estos marcadores los transformantes de células de mamífero se colocan bajo presión de selección, en donde solo los transformantes están excepcionalmente adaptados para sobrevivir en virtud del gen de selección presente en el vector. La presión de selección es impuesta cultivando las células transformadas bajo condiciones en las cuales la concentración del agente de selección en el medio se incrementa sucesivamente, permitiendo con ello la supervivencia de solo aquellas células en las cuales el gen de selección ha sido amplificado. Bajo estas circunstancias, el ADN adyacente al gen de selección, tal como ADN codificante de un anticuerpo de la invención, es co-amplificado con el gen de selección. Como resultado, las cantidades incrementadas de polipéptido anti-DKK1 se sintetizan a partir del ADN amplificado.  
20  
25  
30

Un sitio de unión al ribosoma es usualmente necesario para el inicio de la traducción de ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento está típicamente localizado 3' con respecto al promotor y 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido a expresar.

- En algunos casos, por ejemplo cuando se desea la glicosilación en un sistema de expresión de células huéspedes eucariótico, pueden manipularse varias presecuencias para mejorar la glicosilación o producción. Por ejemplo, el sitio de escisión de peptidasa de un péptido señal particular puede alterarse, o agregarse pro-secuencias, que también pueden afectar a la glicosilación. El producto final de la proteína puede tener, en la posición -1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentes para la expresión, que pueden no haber sido totalmente eliminados. Por ejemplo, el producto final de la proteína puede tener uno o dos residuos de aminoácidos encontrados en el sitio de escisión de peptidasa, adjunto al extremo amino. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión de la enzima puede resultar en una forma ligeramente truncada, pero activa, del polipéptido deseado, si la enzima corta en esa zona dentro del polipéptido maduro.  
35  
40

- En los casos en los que un vector de expresión comercialmente disponible carece de algunas de las secuencias flanqueantes deseadas como se describe arriba, el vector puede ser modificado ligando individualmente estas secuencias en el vector. Después de que el vector ha sido seleccionado y modificado como se desea, una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-DKK1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo se inserta en el sitio apropiado del vector.  
45

- El vector completado que contiene secuencias que codifican el anticuerpo de la invención o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo se inserta en una célula huésped adecuada para la amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un fragmento inmunológicamente funcional de anticuerpo anti-DKK1 del mismo en una célula huésped seleccionada puede lograrse por medio de métodos bien conocidos, incluyendo métodos tales como transfección, infección, cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, método de DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por las personas expertas.  
50

La célula huésped transformada, cuando se cultiva bajo condiciones apropiadas, sintetiza un anticuerpo anti-DKK1 o fragmento funcional del mismo que puede ser subsecuentemente recolectado del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta en el medio) o directamente desde la célula huésped que lo produce (si no lo secreta). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de diversos factores, tal como los niveles de expresión deseados, las modificaciones de polipéptidos que sean deseables o necesarias para la actividad (tal como glicosilación o fosforilación) y fáciles de plegar en una molécula biológicamente activa.

Líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC), tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de ratón (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2) y un cierto número de otras líneas celulares. En ciertas realizaciones, la mejor línea celular para expresar una construcción de ADN particular puede seleccionarse probando diversas líneas celulares para determinar cuales tienen los niveles más altos de niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a DKK1.

En ciertas realizaciones, la invención también proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos anti-DKK1 objeto o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos junto con uno o más de lo siguiente: un diluyente farmacéuticamente aceptable; un portador; un solubilizante, un emulsionante; un conservante; y/o un adyuvante. Composiciones de este tipo pueden contener una cantidad efectiva del anticuerpo anti-DKK1 o fragmento inmunológicamente funcional del mismo. Por lo tanto, también se incluye el uso de los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente activos que se proporcionan en la presente en la preparación de una composición farmacéutica o medicamento. Composiciones de este tipo pueden usarse en el tratamiento de una diversidad de enfermedades como se enumeran a continuación en la sección de utilidades ejemplares.

Componentes aceptables de la formulación para preparaciones farmacéuticas son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Además, para los anticuerpos y fragmentos inmunológicamente funcionales que se proporcionan, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener componentes para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, viscosidad, claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, estabilidad, la tasa de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. Materiales adecuados para formular composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio); tampones (tal como acetato, borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes conferidores de consistencia (tal como manitol o glicina); agentes quelantes (tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albumina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, agentes saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (tal como polivinilpirrolidona); polipéptidos de peso molecular bajo; contraiones de formación de sales (tal como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerol, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; surfactantes o agentes de humectación (tal como pluronics, PEG, ésteres de sorbitan, polisorbato, tales como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tal como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de suministro; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, (A. R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company).

El vehículo primario o portador en una composición farmacéutica puede ser acuoso o no acuoso por naturaleza. Vehículos o portadores adecuados para composiciones de este tipo incluyen agua para inyección, solución salina fisiológica o fluido cerebroespinal artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para la administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o salina mezclada con albumina de suero son vehículos ejemplares adicionales. Composiciones que comprenden anticuerpos anti-DKK1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos pueden prepararse para el almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, los anticuerpos anti-DKK1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos pueden formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tal como sacarosa.

Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Tampones se usan ventajosamente para mantener la composición en un pH fisiológico o en un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de desde alrededor de 4,0 a alrededor de 8,5 o, alternativamente, entre alrededor

de 5,0 y 8,0. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender tampón TRIS de alrededor de pH 6,5-8,5, o tampón acetato de alrededor de pH 4,0-5,5, que puede además incluir sorbitol o un sustituto idóneo para ello.

Una composición farmacéutica puede implicar una cantidad efectiva de anticuerpos anti-DKK1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de tabletas. Disolviendo las tabletas en agua estéril u otro vehículo apropiado, las soluciones pueden prepararse en forma de dosis unitaria. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a materiales inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes de unión, tales como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Composiciones farmacéuticas adicionales están en forma de formulaciones de suministro sostenido o controlado. Pueden usarse técnicas para formular una diversidad de otros medios de suministro controlado o sostenido, tales como portadores de liposomas, micropartículas bio-erosionables o lechos de perlas porosas e inyecciones de depósito (véase, p. ej., el documento PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de composiciones farmacéuticas). Preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas, o microcápsulas, poliésteres, hidrogeles, polilactidas (Patente de EE.UU. N° 3.773.919 y documento EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma etilo (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 22: 547-556), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., 1981, *J Biomed Mater Res* 15: 167-277) y Langer, 1982, *Chem Tech* 12: 98-105), etileno y acetato de vinilo (Langer et al., *ibid.*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por cualesquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-3692; documentos EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La composición farmacéutica a usar para la administración in vivo típicamente es estéril. La esterilización puede lograrse por filtración a través de membranas de filtración estériles. Si la composición es liofilizada, la esterilización puede efectuarse antes de o a continuación de la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. En ciertas realizaciones, las composiciones parenterales se colocan en un recipiente que tiene una lumbrera de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica, o una jeringa estéril pre-llenada lista para usarse para inyección.

Una vez que la composición farmacéutica de la invención ha sido formulada, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. Formulaciones de este tipo pueden almacenarse ya sea en una forma lista para usarse o en una forma (p. ej., liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

Los componentes usados para formular las composiciones farmacéuticas son preferiblemente de pureza alta y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente dañinos (p. ej., al menos una calidad de la National Food (NF), generalmente al menos calidad analítica y más típicamente al menos una calidad farmacéutica). Además, las composiciones destinadas para uso in vivo son usualmente estériles. En la medida en que un compuesto dado debe sintetizarse antes de su uso, el producto resultante está típicamente sustancialmente libre de cualquiera de los agentes potencialmente tóxicos, particularmente cualquiera de las endotoxinas, que puedan estar presentes durante el proceso de síntesis o purificación. Composiciones para la administración parental también son estériles, sustancialmente isotónicas y hechas bajo condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP).

La presente divulgación proporciona kits para producir unidades de administración multi-dosis o de dosis única. Por ejemplo, kits de acuerdo con la invención pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tenga una proteína secada como un segundo recipiente que tenga un diluyente acuoso, incluyendo por ejemplo jeringas pre-llenas de una sola cámara y de múltiples cámaras (p. ej., jeringas líquidas, liojeringas o jeringas libres de aguja).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden suministrarse por vía parental, típicamente por inyección. Las inyecciones pueden ser intraoculares, intraperitoneales, intraportales, intramusculares, intravenosas, intratecales, intracerebrales (intra-parenquimales), intracerebroventriculares, intraarteriales, intralesionales, perilesionales o subcutáneas. Las gotas para ojos pueden usarse para la administración intraocular. En algunos casos, las inyecciones pueden localizarse en las inmediaciones de un hueso o huesos particulares a los cuales está dirigido el tratamiento. Para la administración parental, los anticuerpos pueden administrarse en una solución acuosa apirógena, parenteralmente aceptable, que comprende los anticuerpos anti-DKK1 deseados o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es agua destilada estéril, en la cual los anticuerpos anti-DKK1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos se formulan como una solución estéril, isotónica, apropiadamente preservada.

Composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-DKK1 objeto y fragmentos funcionales de los mismos pueden administrarse por inyección de bolo o continuamente por infusión, mediante dispositivo de implantación, sistemas de liberación sostenida u otros medios para lograr una liberación prolongada. La composición farmacéutica también puede administrarse localmente por medio de implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado en el cual la molécula deseada ha sido absorbida o encapsulada. En los casos en los que se use un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser por medio de difusión, bolo de liberación sincronizada o liberación continua. La preparación puede formularse con agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (tal como ácido poliláctico; ácido poliglicólico; o ácido copoli(láctico/glicólico) (PLGA), lechos de perlas o liposomas, que puedan proporcionar una liberación sostenida o controlada del producto que entonces puede ser suministrado por medio de una inyección de depósito. La formulación con ácido hialurónico tiene el efecto de fomentar una duración sostenida en la circulación.

Las composiciones objeto que comprenden un anticuerpo anti-DKK1 o fragmento funcional del mismo pueden formularse para inhalación. En estas realizaciones, un anticuerpo anti-DKK1 se formula como un polvo seco para inhalación, o soluciones de inhalación de anticuerpo anti-DKK1 también pueden formularse con un propulsor para suministro por aerosol, tal como nebulización. La administración pulmonar se describe, además, en el documento PCT/US94/001875, que describe el suministro pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

Ciertas composiciones farmacéuticas de la invención pueden suministrarse a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. Los anticuerpos anti-DKK1 objeto o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos que se administran de esta manera pueden formularse con o sin los portadores habitualmente usados en la mezcla de formas de dosificación sólida tal como tabletas y cápsulas. Una cápsula puede diseñarse para liberar la porción activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal cuando la biodisponibilidad se maximiza y la degradación pre-sistémica se minimiza. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo anti-DKK1 o fragmento funcional del mismo. Para la administración oral, los aminoácidos modificados pueden usarse para conferir resistencia a enzimas digestivas. También pueden emplearse diluyentes, saborizantes, ceras de punto de fusión bajo, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de tabletas, y aglutinantes.

Las composiciones objeto que comprenden anticuerpos anti-DKK1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos también pueden usarse ex vivo. En tales casos, células, tejidos u órganos que han sido eliminados del paciente se exponen a o se cultivan con el anticuerpo anti-DKK1. Las células cultivadas pueden entonces implantarse de nuevo en el paciente o un paciente diferente o usarse para otros fines.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-DKK1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos pueden suministrarse implantando ciertas células que han sido genéticamente modificadas, usando métodos tales como los descritos en la presente, para expresar y secretar el polipéptido. Células de este tipo pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas, o pueden ser inmortalizadas. Con el fin de disminuir la probabilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente biocompatibles, envolturas o membranas poliméricas semi-permeables que permiten la liberación del o de los productos de la proteína, pero que evitan la destrucción de las células por medio del sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

#### Dosificación

Las composiciones farmacéuticas que se proporcionan pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Una "cantidad efectiva" se refiere generalmente a una cantidad que es una cantidad suficiente, pero no tóxica, del ingrediente activo (es decir, un anticuerpo anti-DKK1 o fragmento inmunológicamente funcional del mismo) para lograr el efecto deseado, que es una reducción o eliminación en la gravedad y/o frecuencia de los síntomas y/o mejoría o remedio del daño. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad que es suficiente para remediar un estado o síntomas de enfermedad, o de otro modo prevenir, detener, retrasar o invertir la progresión de una enfermedad o cualquier otro síntoma no deseado. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad que es efectiva para prevenir, impedir o retrasar la aparición de un estado o síntoma de enfermedad.

En general, la toxicidad y la eficacia terapéutica del anticuerpo o fragmento pueden determinarse de acuerdo con procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares y/o animales experimentales, incluyendo, por ejemplo, determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) and la DE50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Se prefieren las composiciones que exhiben índices terapéuticos grandes.

Los datos obtenidos del cultivo celular y/o estudios con animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para seres humanos. La dosificación del ingrediente activo se alinea típicamente dentro de un intervalo de

concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada.

La cantidad efectiva de la composición farmacéutica que comprende anticuerpos anti-DKK1 o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos a emplear terapéutica o profilácticamente dependerá del, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles apropiados de dosificación para el tratamiento, de acuerdo con ciertas realizaciones, variará, por lo tanto, dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación para la cual el anticuerpo anti-DKK1 está siendo usado, la ruta de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y la salud en general) del paciente. Un médico puede valorar la dosificación y modificar la ruta de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Dosificaciones típicas varían de desde alrededor de 0,1 µg/kg a alrededor de 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, la dosificación puede variar de desde alrededor de 0,1 µg/kg a alrededor de 150 mg/kg; o 1 µg/kg a alrededor de 100 mg/kg; o 5 µg/kg a alrededor de 50 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo anti-DKK1 o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo en la formulación. Por ejemplo, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden o no pueden contener la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua por medio de un dispositivo de implantación o catéter. El tratamiento puede ser continuo a lo largo del tiempo o intermitente. El refinamiento adicional de la dosificación apropiada se hace rutinariamente por los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de tareas rutinariamente realizadas por ellos. Las dosificaciones apropiadas pueden ser comprobadas a través del uso de datos apropiados de dosis-respuesta.

Para tratar un trastorno médico al fijar como objetivo DKK1, una composición que comprende los anticuerpos anti-DKK1 objeto o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos puede administrarse al paciente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejoría sostenida en al menos un indicador que refleja la gravedad del trastorno. Una mejoría se considera "sostenida" si el paciente exhibe la mejoría en al menos dos ocasiones separadas por al menos de uno a siete días o, en algunos ejemplos, de una a seis semanas. El intervalo apropiado dependerá hasta cierto punto de qué condición de la enfermedad esté siendo tratado; está dentro del ámbito del médico experto determinar el intervalo apropiado para determinar si la mejoría es sostenida. El grado de mejora se determina basándose en señales o síntomas, y también pueden emplearse cuestionarios que se administren al paciente, tal como cuestionarios de calidad de vida.

Pueden evaluarse diversos indicadores que reflejan el grado de enfermedad del paciente para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. El valor de referencia para el indicador o los indicadores seleccionados es establecido por el examen del paciente previo a la administración de la primera dosis de anticuerpo. Preferiblemente, el examen del valor de referencia se hace dentro de alrededor de 60 días de administrar la primera dosis. Si el anticuerpo está siendo administrado para tratar síntomas agudos, tal como por ejemplo para tratar huesos rotos, la primera dosis se administra tan pronto como prácticamente sea posible después haber ocurrido la lesión.

La mejoría es inducida al administrar los anticuerpos anti-DKK1 objeto o fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos hasta que el paciente manifieste una mejoría sobre el valor de referencia para el indicador o los indicadores seleccionados. En el tratamiento de afecciones crónicas, este grado de mejoría se obtiene administrando repetidamente este medicamento a lo largo de un periodo de tiempo de al menos un mes o más, p. ej., durante uno, dos o tres meses o más, o indefinidamente. Un periodo de una a seis semanas, o incluso una dosis única, frecuentemente es suficiente para tratar afecciones agudas. Para lesiones o afecciones agudas, una dosis única puede ser suficiente.

Aunque el grado de la enfermedad del paciente después del tratamiento puede parecer mejorado de acuerdo con uno o más indicadores, el tratamiento puede continuarse indefinidamente al mismo nivel o a una dosis o frecuencia reducida. Una vez que el tratamiento ha sido reducido o interrumpido, puede reanudarse posteriormente en el nivel original si los síntomas aparecen.

Los anticuerpos anti-DKK1 objeto y fragmentos inmunológicamente funcionales de los mismos pueden usarse para detectar DKK1 en muestras biológicas. Tales usos permiten la identificación de células o tejidos que producen la proteína o sirven como un diagnóstico para detectar condiciones patológicas en las cuales DKK1 es sobre-producido o sub-producido. Los anticuerpos y fragmentos que se proporcionan también pueden usarse en métodos para rastrear una molécula que se une a DKK1. Por ejemplo, se puede usar una diversidad de métodos de rastreo competitivos. En algunos métodos, una molécula de DKK1 o fragmento de la misma a la cual se une un anticuerpo anti-DKK1, se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento descrito en la presente junto con otra molécula (es decir, una molécula candidato). Una reducción en la unión entre el anticuerpo o fragmento y DKK1 es una indicación de que la molécula se une a DKK1. La unión del anticuerpo o fragmento puede detectarse usando una diversidad de métodos, p. ej., un ELISA. La detección de

unión entre el anticuerpo anti-DKK1 o fragmento a DKK1 puede simplificarse marcando de modo detectable al anticuerpo. En algunos métodos, una molécula que exhibe unión en el rastreo inicial se analiza adicionalmente para determinar si inhibe una actividad de DKK1 (p. ej., si la molécula activa la señalización Wnt).

La actividad de un inhibidor DKK1 o un inhibidor de esclerostina o combinaciones (p. ej., agentes de unión respectivos) puede medirse en una diversidad de formas. Los incrementos mediados por el agente de unión en el contenido mineral del hueso o densidad del hueso pueden medirse usando absorciometría de rayos X de energía dual y sencilla, ultrasonidos, tomografía computarizada, radiografía y formación de imágenes de 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)). Los animales y modelos particulares de animales se usan en la técnica para probar el efecto de las composiciones farmacéuticas y métodos en, por ejemplo, parámetros de pérdida de hueso, resorción ósea, formación de huesos, resistencia de huesos o mineralización de los huesos que imitan las condiciones de la enfermedad humana, tal como osteoporosis y osteopenia. Ejemplos de modelos de este tipo 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 descritos en la presente también pueden usarse para determinar la eficacia de otros inhibidores.

En seres humanos, la densidad mineral de los huesos puede determinarse clínicamente usando la absorciometría de rayos x dual de, por ejemplo, la cadera y la columna vertebral. Otras técnicas incluyen tomografía computarizada cuantitativa (QCT), ultrasonografía, absorciometría de rayos x de energía simple (SXA) y absorciometría radiográfica. Los sitios comunes del esqueleto central para la medición incluyen la columna vertebral y la cadena; sitios periféricos incluyen el antebrazo, los dedos, la muñeca y el talón. Excepto para ultrasonografía, la Asociación Médica Americana señala que las técnicas BMD implican típicamente el uso de rayos x y se basan en el principio de que la atenuación de la radiación depende del grosor y de la composición de los tejidos en la vía de radiación. Todas las técnicas implican la comparación de los resultados para una base de datos normativa.

Alternativamente, una respuesta fisiológica a uno o más agentes de unión puede calibrarse vigilando los niveles del marcador de huesos. Los marcadores de huesos son productos creados durante el proceso de remodelación de hueso y son liberados por el hueso, los osteoblastos y/o los osteoclastos. Fluctuaciones en los niveles de resorción ósea y/o "marcador" de formación de huesos implica cambios en el remodelado/modelado de los huesos. La Fundación Internacional de Osteoporosis (IOF) recomienda usar marcadores de huesos para vigilar las terapias de densidad ósea (véase, p. ej., Delmas et al., *Osteoporos Int.*, Supl. 6:S2-17 (2000)). Marcadores indicativos de resorción ósea (o actividad de osteoclasto) incluyen, por ejemplo, telopéptido C (p. ej., telopéptido C terminal de colágeno tipo 1 (CTX) o telopéptido C reticulado en suero), telopéptido N (telopéptido N terminal del colágeno de tipo 1 (NTX)), desoxipiridinolina (DPD), piridinolina, hidroxipiridinolina urinaria, galactosil hidroxilisina y fosfatasa ácida resistente al tartrato (p. ej., isoforma 5b de fosfatasa ácida resistente al tartrato en suero). Los marcadores de formación/mineralización ósea incluyen, pero no se limitan a fosfatasa alcalina específica de huesos (BSAP), péptidos liberados de extensión N-terminal y C-terminal de procólgeno de tipo I (P1NP, P1CP) y osteocalcina (OstCa). Varios kits están comercialmente disponibles para detectar y cuantificar los marcadores en muestras clínicas, tal como orina y sangre.

Tras la administración, un agente terapéutico preferiblemente reduce el nivel de uno o más marcadores de la resorción ósea, tal como el nivel de suero de telopéptido C de colágeno de tipo I (CTX). En consecuencia, la invención proporciona, además, un método para vigilar la terapia, es decir, la respuesta fisiológica para un agente de unión a esclerostina u otro inhibidor de esclerostina. El método comprende administrar un agente terapéutico, y después medir el nivel de uno o más marcadores de la resorción ósea. Además, el método puede comprender medir el nivel de uno o más marcadores de formación ósea antes de la administración. El nivel de marcador de resorción ósea durante y/o después del tratamiento puede compararse con un nivel de pre-tratamiento o, alternativamente, puede ser comparado con un intervalo estándar típico de la población de pacientes. Una persona ordinaria experta en la técnica puede fácilmente determinar un intervalo estándar adecuado probando un número representativo de pacientes de edad similar, sexo, nivel de la enfermedad y/u otras características de la población de pacientes. El nivel del marcador de resorción ósea puede reducirse en al menos alrededor de 5% (p. ej., alrededor de 10%, alrededor de 20% o alrededor de 30%) por una dosis única de agente terapéutico. En algunas realizaciones, la dosis del agente terapéutico reduce el nivel del marcador de resorción ósea al menos alrededor de 40% (p. ej., alrededor de 50%, alrededor de 60% o alrededor de 70%) comparado con el nivel del marcador de resorción ósea antes de la administración. Además, el nivel del marcador de resorción ósea puede reducirse durante al menos alrededor de 3 días (p. ej., alrededor de 7 días, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 1 mes, alrededor de 5 semanas, alrededor de 6 semanas, alrededor de 7 semanas, alrededor de 2 meses, alrededor de 9 semanas, alrededor de 10 semanas, alrededor de 11 semanas o alrededor de 3 meses) después de la administración de una dosis única.

Además para disminuir el nivel de marcadores de resorción ósea, la cantidad administrada de agente terapéutico a un paciente también puede incrementar el nivel de uno o más marcadores de formación ósea, tal como el nivel de suero de



BSAP, el nivel de suero de P1NP y/o el nivel de suero de OstCa. Una dosis única de agente terapéutico puede incrementar el nivel de un marcador de formación ósea, por ejemplo, en al menos alrededor de 5% (p. ej., alrededor de 10%, alrededor de 20% o alrededor de 30%). En algunas realizaciones, la dosis de agente terapéutico eleva el nivel de un marcador de formación ósea al menos alrededor de 40% (p. ej., alrededor de 50%, alrededor de 60% o alrededor de 70%). En otras realizaciones, la dosis de agente terapéutico incrementa el nivel de uno o más marcadores de formación ósea en al menos alrededor de 75% (p. ej., alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 100% o alrededor de 110%). Aún en otras realizaciones, la dosis de agente terapéutico incrementa el nivel de un marcador de formación ósea en al menos alrededor de 120% (p. ej., alrededor de 130%, alrededor de 140%, alrededor de 150%, alrededor de 160% o alrededor de 170%). En realizaciones alternativas, el agente terapéutico incrementa el nivel de marcador de formación ósea en al menos alrededor de 180% (p. ej., alrededor de 190% o alrededor de 200%). Los niveles de marcador de formación ósea se mantienen idealmente elevados (comparados con los niveles de marcador de formación ósea de un al pre-tratamiento o con un intervalo estándar típico de esa población de pacientes) en al menos alrededor de 3 días (p. ej., alrededor de 7 días, alrededor de 2 semanas, alrededor de 3 semanas, alrededor de 1 mes, alrededor de 5 semanas, alrededor de 6 semanas, alrededor de 7 semanas, alrededor de 2 meses, alrededor de 9 semanas, alrededor de 10 semanas, alrededor de 11 semanas o alrededor de 3 meses) después de la administración de una dosis única del agente terapéutico.

Típicamente, la BMD puede ser medida como "cuerpo total" (p. ej., cabeza, tronco, brazos y piernas) o en la cadera (p. ej., cadera total y/o cuello femoral), columna vertebral (p. ej., columna vertebral lumbar), muñeca, dedo, hueso de la espinilla y/o talón. En el diagnóstico de la osteoporosis, una BMD del paciente se compara con una densidad pico de un adulto sano de 30 años de edad (es decir, un "adulto joven"), creando la denominada "calificación T". Una BMD del paciente también puede compararse con una densidad ósea de hueso "emparejado con la edad" (véase, p. ej., "Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group" (Grupo Científico de la Organización Mundial de la Salud para la Prevención y Gestión de la Osteoporosis) WHO Technical Report Series; 921, Ginebra, Suiza (2000)). A la diferencia entre una BMD del paciente y la de un adulto joven sano se la alude convencionalmente en términos de la múltiple "desviación estándar", que típicamente es igual a alrededor del 10% a alrededor del 12% de disminución en densidad ósea. La Organización Mundial de la Salud propuso cuatro categorías de diagnóstico basándose en calificaciones T de la BMD. Un valor de la BMD dentro de 1 desviación estándar de la media de referencia del adulto joven (calificación  $T \geq -1$ ) es "normal". La masa ósea baja (osteopenia se indica por un valor BMD mayor que 1 desviación estándar debajo de la media del adulto joven, pero menos de 2 desviaciones estándar (calificación  $T < -1$  y  $> -2,5$ ). Una calificación T de más de 2,5 desviaciones estándar debajo de la norma apoya un diagnóstico de osteoporosis. Si un paciente padece adicionalmente una o más fracturas de fragilidad, el paciente es calificado como que tiene osteoporosis severa.

El producto terapéutico puede administrarse a un paciente para mejorar la densidad mineral ósea independientemente de la calificación T del paciente. El producto terapéutico puede administrarse en una dosis y durante un periodo de tiempo efectivo para incrementar la BMD en el paciente en al menos alrededor de 1% (alrededor de 2%, alrededor de 3%, alrededor de 4%, alrededor de 5% o alrededor de 6%). En algunas realizaciones, la BMD se incrementa en al menos alrededor de 8% (p. ej., al menos alrededor de 10%, alrededor de 12%, alrededor de 15% o alrededor de 18%). En otras realizaciones, la BMD se incrementa por el producto terapéutico en al menos alrededor de 20% (p. ej., al menos alrededor de 22%, alrededor de 25% o alrededor de 28%) en la cadera, columna vertebral, muñeca, dedo, hueso de la espinilla, y/o talón. Aún en otras realizaciones, la BMD se incrementa al menos alrededor de 30% (p. ej., al menos alrededor de 32%, alrededor de 35%, alrededor de 38% o alrededor de 40%). En otras palabras, la BMD puede incrementarse a un intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 2,5 desviaciones estándar (preferiblemente un intervalo de alrededor de 0 a alrededor de 1 desviación estándar) por debajo de la BMD normal de un adulto joven sano.

Las alteraciones en el remodelado o modelado óseo conducir a fluctuaciones en concentraciones minerales por todo el cuerpo. El hueso es uno de los principales reguladores de niveles de calcio en el torrente sanguíneo. La resorción ósea mediada por osteoclastos libera el calcio almacenado en la circulación sistemática, mientras que la formación de hueso mediada de osteoblastos elimina calcio de la circulación para incorporarlo en el tejido óseo. En el modelado/remodelado óseo normal, estos procesos ciclan para mantener el hueso fuerte y sano y mantener los niveles de calcio libre a alrededor de 8,5 mg/dL a alrededor de 10,5 mg/dL (p. ej., alrededor de 2,2 mmol/L a alrededor de 2,6 mmol/L). Los trastornos de huesos, otras enfermedades, e incluso ciertas terapias pueden interrumpir niveles de calcio sistemáticos con consecuencias terribles. La hipercalcemia se asocia con niveles altos de calcio en la sangre (p. ej., mayor que 12 mg/dL o 3 mmol/L). Niveles extraordinariamente altos de calcio conducen, por ejemplo, a fatiga, confusión, estreñimiento, apetito disminuido, micción frecuente, problemas cardíacos y dolor de huesos. La hipocalcemia es un desequilibrio electrolítico indicado por un nivel anormalmente bajo de calcio en la sangre (p. ej., menos de alrededor de 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 por síntomas clínicos.

## Medios para el Tratamiento y Usos

La invención es útil para tratar o prevenir trastornos relacionados con los huesos, tales como trastornos relacionados con los huesos asociados con una actividad anormal de los osteoblastos u osteoclastos. En efecto, los productos terapéuticos de la presente invención pueden administrarse a un ser humano que padece un trastorno relacionado con los huesos, seleccionado del grupo que consiste de acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, hipofosfatemia, raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X, síndrome de Marfan, exotosis hereditaria múltiple, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, pseudoartrosis, osteomielitis piógena, enfermedad periodontal, pérdida de hueso inducida por fármacos anti-epilépticos, hiperparatiroidismo primario y secundario, síndromes de hiperparatiroidismo familiar, pérdida de hueso inducida por ingravidez, osteoporosis en los hombres, pérdida de hueso después de la menopausia, fusión vertebral, osteoartritis, osteodistrofia renal, trastornos infiltrantes de huesos, pérdida de hueso oral, osteonecrosis de la mandíbula, enfermedad de Paget juvenil, melorreostosis, enfermedades metabólicas de los huesos, mastocitosis, anemia/enfermedad de células falciformes, pérdida ósea relacionada con el trasplante de órganos, pérdida ósea 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 Perthes, escoliosis idiopática del adolescente, enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio infantil, síndrome de Winchester, enfermedad de Menkes, enfermedad de Wilson, enfermedad isquémica de los huesos (tales como la enfermedad de Legg-Calve-Perthes y la osteoporosis migratoria regional), estados anémicos, afecciones causadas por esteroides, pérdida ósea inducida por glucocorticoides, pérdida ósea inducida por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis, osteopenia, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, 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 de la tiroides, trastornos de paratiroides, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpático refleja, osteoporosis regional, osteomalacia, pérdida ósea asociada con el reemplazo de articulaciones, pérdida ósea asociada con el VIH, pérdida ósea asociada con la pérdida de la hormona del crecimiento, pérdida ósea asociada con la fibrosis quística, pérdida ósea asociada con la quimioterapia, pérdida ósea inducida por tumores, pérdida ósea relacionada con el cáncer, pérdida ósea ablativa hormonal, mieloma múltiple, pérdida ósea inducida por fármacos, anorexia nerviosa, pérdida ósea facial asociada con la enfermedad, pérdida ósea craneal asociada con la enfermedad, pérdida ósea asociada con la enfermedad del hueso de la mandíbula, pérdida ósea asociada con la enfermedad del hueso del cráneo, pérdida ósea asociada con el envejecimiento, pérdida ósea facial asociada con el envejecimiento, pérdida ósea craneal asociada con el envejecimiento, pérdida ósea de la mandíbula asociada con el envejecimiento, pérdida ósea del cráneo asociada con el envejecimiento y pérdida ósea asociada con el viaje espacial.

La invención necesita no curar al paciente del trastorno o protegerle completamente contra la aparición de un trastorno relacionado con los huesos para lograr una respuesta biológica beneficiosa. La invención puede usarse también profilácticamente, lo que significa proteger, por completo o en parte, contra un trastorno o síntoma del mismo relacionado con los huesos. La invención también puede usarse terapéuticamente para aliviar, por completo o en parte, un trastorno o síntoma del mismo relacionado con los huesos, o para proteger, por completo o en parte, contra la progresión adicional de un trastorno o síntoma del mismo relacionado con los huesos. En efecto, los materiales y métodos de la invención son particularmente útiles para incrementar la densidad mineral ósea y mantener la BMD incrementada a lo largo de un periodo de tiempo. En este sentido, la invención proporciona tratar un trastorno relacionado con los huesos, método que comprende (a) administrar una o más cantidades de un agente de unión a esclerostina efectivo para incrementar la BMD medida para el cuerpo total (p. ej., cabeza, tronco, brazos y piernas) o en la cadera (p. ej., cadera total y/o cuello femoral), columna vertebral (p. ej., columna vertebral lumbar), muñeca, dedo, hueso de la espinilla y/o talón en alrededor de 1%, alrededor de 2%, alrededor de 3%, alrededor de 6%, alrededor de 8%, alrededor de 10%, alrededor de 12%, alrededor de 15%, alrededor de 18%, alrededor de 20%, alrededor de 25%, o 30% o más. Una o más administraciones de una composición farmacéutica que comprende el agente de unión a esclerostina pueden llevarse a cabo a lo largo de un periodo de tiempo terapéutico, por ejemplo, alrededor de 1 mes a alrededor de 18 meses (p. ej., alrededor de 2 meses, alrededor de 3 meses, alrededor de 4 meses, alrededor de 5 meses, alrededor de 6 meses, alrededor de 7 meses, alrededor de 8 meses, alrededor de 9 meses, alrededor de 10 meses o alrededor de 11 meses). La invención incluye, además, (b) administrar subsecuentemente una o más cantidades de un agente de unión a esclerostina efectivo para mantener la densidad mineral ósea. Por "mantener la densidad mineral ósea" se entiende que la BMD incrementada resultante de la etapa (a) no cae más de alrededor de 1% a alrededor de 5% a lo largo del transcurso de la etapa (b) (p. ej., alrededor de 6 meses, alrededor de 9 meses, alrededor de 1 año, alrededor de 18 meses, alrededor de 2 años, o a lo largo del transcurso de la vida del paciente). Se apreciará que un paciente pueda requerir fases alternas de tratamiento para incrementar la densidad ósea y mantener la densidad ósea.

Se contempla que el uso terapéutico de inhibidores de DKK1, como se describe en la presente, solo o en combinación con otro agente anabólico, p. ej., un inhibidor de la esclerostina tal como un anticuerpo neutralizante, sea beneficioso para cualquier afección que requiera de reparación del hueso si se agrava por una condición de pérdida ósea subyacente o no. Ejemplos particulares de la reparación del hueso que no siempre están asociados con la pérdida ósea incluyen reparación de fractura, tal como cicatrización retrasada o cicatrización sin unión. Por lo tanto, un experto en la técnica entenderá que

ciertas indicaciones descritas en la presente pueden o no pueden ser exacerbadas por pérdida ósea asociada con, por ejemplo, osteoporosis, o cualquier otra afección de pérdida ósea descrita en la presente. Por lo tanto, en realizaciones adicionales se contempla que composiciones de la presente invención sean útiles para mejorar los resultados en procedimientos ortopédicos, enfermedades periodontales, pérdida ósea oral, procedimientos dentales, implantes dentales, cirugía de implante, reemplazo de articulaciones, injerto óseo, cirugía cosmética del hueso y reparación ósea, tales como la curación de fracturas, fusión de la columna vertebral, fijación de los implantes (p. ej., reemplazo de unión tal como de cadera o rodilla), cicatrización sin unión, cicatrización retrasada de unión y reconstrucción facial. Una o más composiciones pueden administrarse antes, durante y/o después del procedimiento, reemplazo, injerto, cirugía o reparación.

Se ha demostrado que inhibidores de esclerostina, p. ej., agentes de unión a esclerostina, fomentan la formación ósea e inhiben (o hacen más lenta) la resorción ósea con fluctuaciones mínimas en niveles sistémicos de calcio (p. ej., los niveles de calcio fluctúan 10% o menos de niveles de calcio de suero del valor de referencia). Así se presenta por sí mismo cómo un posible producto terapéutico participante con los inhibidores DKK1 presentados en la presente para incrementar la sensibilidad terapéutica.

Muchas enfermedades y terapias farmacéuticas alteran los niveles de calcio del sistema y, con ello, impactan la densidad ósea de modo negativo y productos terapéuticos de este tipo de la presente invención son útiles, incluyendo combinaciones de los mismos, para tratar la pérdida ósea en estas afecciones. La hipercalcemia e hipocalcemia pueden resultar de, por ejemplo, enfermedad crónica del riñón, enfermedades renales, insuficiencia renal, hiperparatiroidismo primario y secundario, pseudohiperparatiroidismo, hipoparatiroidismo, pseudohipoparatiroidismo, agotamiento de magnesio, alcoholismo, terapia con bisfosfonato, hipermagnesemia severa, deficiencia de vitamina D, hiperfosfatemia, pancreatitis aguda, síndrome del hueso hambriento, quelación, metástasis osteoblástica, sepsis, cirugía, quimioterapia, síndrome de neoplasia, hipercalcemia hipocalciúrica familiar, sarcoidosis, tuberculosis, beriliosis, histoplasmosis, candidiasis, coccidioidomicosis, histiocitosis X, enfermedad de linfoma de Hodgkin o no Hodgkin, enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener, leucemia, neumonía, granulomas inducidos por silicona, inmovilización o terapia con medicamentos, tales como la administración de diuréticos tiazídicos, litio, estrógenos, fluoruros e insulina. Además, las fluctuaciones de calcio de suero son un efecto secundario de muchas terapias existentes relacionadas con los huesos, tales como terapia con bisfosfonato y terapia con hormona paratiroidea. Debido a las consecuencias potencialmente amenazantes para la vida del desequilibrio de calcio, los pacientes susceptibles a hipocalcemia o hipercalcemia pueden necesitar experimentar ciertas opciones de terapia.

Por consiguiente, los materiales de la invención, particularmente combinaciones, son ventajosos en el tratamiento de pacientes que son susceptibles o sensibles a niveles inestables de calcio. La cantidad de agente de enlace a esclerostina administrada a un ser humano en el contexto de este aspecto de la invención es una cantidad que no resulta en hipocalcemia o hipercalcemia (p. ej., hipocalcemia o hipercalcemia clínicamente importantes). Además, la invención proporciona tratar un trastorno relacionado con los huesos en un ser humano que padece o está en riesgo de padecer hipocalcemia o hipercalcemia o un ser humano en cuyo tratamiento con bisfosfonato está contraindicada una hormona paratiroidea, o análogo de hormona paratiroidea. Esto comprende administrar al ser humano una cantidad efectiva de agente de unión a esclerostina para incrementar el nivel de un marcador de formación ósea, tal como niveles en suero de BSAP, P1NP y/u OstCa y/o reducir el nivel de un marcador de resorción ósea, tal como CTX.

Además se proporcionan en la presente medios para tratar o prevenir la pérdida de masa ósea, que comprenden administrar a un paciente que necesite de los mismos una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que comprende una región variable seleccionada de SEQ ID NOs: 94 y 96, o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo como se describe en la presente (p. ej., un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional que comprende al menos una CDR de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 223 a 228. En un aspecto de esta realización, el paciente es uno que padece cáncer que metastatiza al hueso, y en otro aspecto, el paciente es uno que padece mieloma múltiple. Un experto en la técnica apreciará que estas composiciones, solas o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, pueden usarse para la formulación de un medicamento. Anticuerpos de la presente invención son adecuados para el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos. El anticuerpo según se reivindica es adecuado para su uso en el tratamiento de fractura ósea. El anticuerpo según se reivindica es adecuado para su uso en el tratamiento de defectos de unión de hueso. El anticuerpo según se reivindica, en combinación con un anticuerpo de esclerostina inhibitorio, es adecuado para su uso en el tratamiento de fractura ósea. El anticuerpo según se reivindica, en combinación con un anticuerpo de esclerostina inhibitorio, es adecuado para su uso en el tratamiento de defectos de unión de hueso. Se entiende que la expresión 'fractura ósea' se refiere a incluir una o más fracturas en un paciente que necesite tratamiento.

Afecciones particulares que pueden ser tratadas por las composiciones de la presente invención incluyen displasias, en donde el crecimiento o desarrollo del hueso es anormal. Ejemplos representativos de afecciones de este tipo incluyen acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, síndrome de Marfan,

exotosis múltiple hereditaria, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, pseudoartrosis y osteomielitis plógena.

Otras afecciones que pueden tratarse o prevenirse incluyen una amplia diversidad de casos de osteopenia, osteoporosis y pérdida ósea. Ejemplos representativos de afecciones de este tipo incluyen enfermedad periodontal, pérdida ósea inducida por fármacos anti-epilépticos, hiperparatiroidismo primario y secundario, síndromes de hiperparatiroidismo familiar, pérdida ósea inducida por ingravidez, osteoporosis en los hombres, pérdida ósea después de la menopausia, osteoartritis, osteodistrofia renal, trastornos infiltrantes de huesos, pérdida ósea oral, osteonecrosis de la mandíbula, enfermedad de Paget juvenil, melorreostosis, enfermedades metabólicas de los huesos, mastocitosis, enfermedad de células falciformes, enfermedad isquémica de los huesos (tal como la enfermedad de Legg-Calve-Perthes, osteoporosis migratoria regional), estados anémicos, afecciones causadas por esteroides, pérdida de hueso inducida por glucocorticoides, pérdida de hueso inducida por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, malnutrición, deficiencia de calcio, osteopenia idiopática u osteoporosis, osteopenia u osteoporosis congénita, alcoholismo, enfermedad crónica del hígado, estado posmenopáusico, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, colitis inflamatoria, enfermedad de Crohn, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, trastornos de la tiroides, trastornos de paratiroides, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o desuso, síndrome de distrofia simpático refleja, osteoporosis regional, osteomalacia, pérdida ósea asociada con el reemplazo de articulaciones, pérdida ósea asociada con el VIH, pérdida ósea asociada con la pérdida de la hormona del crecimiento, pérdida ósea asociada con la fibrosis quística, displasia fibrosa, pérdida ósea asociada con la quimioterapia, pérdida ósea inducida por tumores, pérdida ósea relacionada con el cáncer, pérdida ósea ablativa hormonal, mieloma múltiple, pérdida ósea inducida por fármacos, anorexia nerviosa, pérdida ósea facial asociada con la enfermedad, pérdida ósea craneal asociada con la enfermedad, pérdida ósea asociada con la enfermedad del hueso de la mandíbula, pérdida ósea asociada con la enfermedad del hueso del cráneo y pérdida ósea asociada con el viaje espacial. Afecciones adicionales se refieren a la pérdida de hueso asociada con el envejecimiento, incluyendo la pérdida ósea facial asociada con el envejecimiento, pérdida ósea craneal asociada con el envejecimiento, pérdida del hueso de mandíbula asociada con el envejecimiento y la pérdida ósea craneal asociada con el envejecimiento.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### Preparación del inmunógeno DKK1 humano (huDKK1)

La clonación de DKK1 humana fue como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.344.541 con las siguientes modificaciones. Dos diferentes versiones etiquetadas de epítipo de DKK1 humana se usaron como un inmunógeno, una contenía el epítipo FLAG y la otra era una molécula de fusión fc. Ambas etiquetas de epítipo se adjuntaron al extremo carboxi de DKK1 humana usando técnicas de biología molecular estándar obvias para los expertos en la técnica.

Las versiones etiquetadas de epítipo de DKK1 humana se clonaron en un vector de expresión para la expresión en células CHO. Variantes de DKK1 humana que contienen los epítipos ya sea FLAG o Fc se purificaron del medio acondicionado para uso como un antígeno para generar anticuerpos anti-huDKK1. huDKK1 etiquetada con epítipo se purificó del medio acondicionado concentrado (CM). También pueden usarse otros procedimientos de producción y purificación de proteínas conocidos por los expertos en la técnica.

### EJEMPLO 2

#### Inmunización y titulación

Se usaron como antígenos DKK1 humana etiquetada con FLAG recombinante (FLAG-DKK1) y DKK1 humana etiquetada con Fc recombinante (DKK1-fc). Los anticuerpos monoclonales contra DKK1 se desarrollaron inmunizando secuencialmente ratones XenoMouse® (Abgenix, Inc. Fremont, CA) (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos de América Nº 7.435.871 y la descripción en ella). Animales XenoMouse se inmunizaron por medio de una ruta en la almohadilla plantar para todas las inyecciones. Se determinaron los títulos de anticuerpo anti-DKK en el suero de ratones XenoMouse inmunizados por ELISA.

### EJEMPLO 3

#### Recuperación de linfocitos, aislados de célula B, fusiones y generación de hibridomas

Se recogieron y se agruparon ganglios linfáticos de cada cohorte. El efluente total se recogió como la fracción CD90-negativa (se esperó que la mayoría de estas células fueran células B). Se realizó la fusión al mezclar células B enriquecidas

lavadas de antes y células P3X63Ag8.653 de mieloma no secretor adquiridas de ATCC, catálogo CRL 1580 (Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) en una relación de 1:1. Se realizó la fusión electro-célula (ECF) usando un generador de fusión, modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA. El tamaño de la cámara de fusión usada fue de 2,0 mL.

Después de la ECF, las suspensiones celulares se retiraron cuidadosamente de la cámara de fusión bajo condiciones estériles y se transfirieron a un tubo estéril que contenía el mismo volumen de Medio de Cultivo de Hibridoma (DMEM (JRH Biosciences)). Las células se incubaron y luego centrifugaron. Las células se volvieron a suspender en un volumen pequeño de Medio de Selección de Hibridoma (Medio de Cultivo de Hibridoma complementado con 0,5x HA (Sigma, catálogo A9666)), y el volumen se ajustó apropiadamente con más Medio de Selección de Hibridoma. Las células se mezclaron suavemente y se pipetearon en placas de 96 pocillos y se les permite crecer.

#### EJEMPLO 4

Después del cultivo suficiente, se rastrearon los sobrenadantes de hibridoma para anticuerpos monoclonales específicos para DKK1. En el rastreo primario, las placas ELISA se cubrieron con 50 µL/pocillo de rhDKK1 etiquetado con Flag (2 µg/mL) y luego se incubaron a 4°C durante la noche. Después de la incubación, las placas se lavaron con Tampón de Lavado tres veces y luego se agregaron 200 µL/pocillo de Tampón de Bloqueo y las placas se incubaron a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron con Tampón de Lavado tres veces. Se agregaron alícuotas (50 µL/pocillo) de sobrenadantes de hibridoma y controles negativo y positivo, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h.

Después de la incubación, las placas se lavaron con tampón de lavado. Se agregaron cincuenta µL/pocillo de anticuerpo de detección y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con Tampón de Lavado y luego se agregaron 50 µL/pocillo de TMB, y se dejó que las placas se desarrollaran durante aproximadamente 10 minutos (hasta que los pocillos de control negativo apenas comienzan a mostrar color). Se agregaron entonces 50 µL/pocillo de solución de parada y las placas se leyeron en un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 650 nm. Se estableció el punto de corte OD dos veces por encima del OD del control negativo.

Los sobrenadantes del cultivo viejo de los pocillos en los que crecen células de hibridoma positivas, basados en el rastreo primario, se retiraron completamente y las células de hibridoma DKK1 positivas se suspendieron con medio de cultivo de hibridoma reciente y se transfirieron a placas de 24 pocillos. Después de 2 días, se realizó un rastreo de confirmación secundario en donde los hibridomas positivos en el primer rastreo se confirmaron en ELISA cubierto con rhDKK1 etiquetada con Flag (descrito como arriba) y ELISA cubierto con antígeno irrelevante etiquetado con Flag. Tres conjuntos de sistema de detección para ELISA cubierto con antígeno, un conjunto para detección hIgG, un conjunto para detección de cadena ligera Ig kappa humana y el otro conjunto para detección de cadena ligera lambda humana con objeto de demostrar la composición completamente humana tanto para IgG como para Ig kappa o IgG e Ig lambda o IgG e Ig kappa más lambda. Solo se usó la detección hIgG para ELISA cubierto con antígeno irrelevante. Los tres conjuntos de procedimientos ELISA cubiertos con antígeno fueron idénticos a las descripciones anteriores, excepto que se usaron de manera separada los tres anticuerpos de detección diferentes. La selección final se basó en una señal positiva en antígeno y una señal negativa en antígeno irrelevante.

Los anticuerpos monoclonales específicos para DKK1 IgG/kappa o IgG/lambda generados se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2

Cohorte	Cepa XenoMouse (Isotipo Humano)	Inmunógeno	Abs IgG anti-DKK1 Humanos	IgGκ	IgGλ
1	XMG4 (IgG4)	FLAG-DKK1	5	5	N.A.
2	XMG2 (IgG2)	FLAG-DKK1	42	42	N.A.
3	XMG2-KL (IgG2)	FLAG-DKK1	7	0	7
4	XMG2-KL (IgG2)	DKK1-fc	6	1	5
5	XMG4-KL (IgG4)	FLAG-DKK1	85	43	42
6	XMG2-KL (IgG2)	FLAG-DKK1	158	91	68
7	XmG4-KL (IgG4)	FLAG-DKK1	41	19	23

Anticuerpos que secretan hibridomas considerados de interés funcional eran de células sencillas clonados por dilución limitada. El rastreo de hibridomas clonados de células sencillas para anticuerpo DKK1 se realizó por ELISA como se describe anteriormente. Se cultivaron los clones de hibridoma en Medio de Cultivo de Hibridoma y se expandieron usando

técnicas de cultivo de tejido estándares para producir sobrenadante de cultivo exhausto que contiene anticuerpo monoclonal secretado. También se generaron materiales de congelación de clones de hibridoma.

## EJEMPLO 5

### Selección de anticuerpos neutralizantes que producen hibridomas para DKK1 humana por bioactividad

5 Los hibridomas obtenidos como se describe en el Ejemplo 2 se probaron utilizando una construcción informadora de TCF/lef-luciferasa en la cual la expresión de luciferasa está bajo el control de la trayectoria Wnt canónica. Cuando las células transfectadas con esta construcción se exponen a Wnt biológicamente activo, se induce la actividad de luciferasa. La actividad de luciferasa inducida por Wnt puede suprimirse al agregar proteína DKK1 recombinante a las células que contienen esta construcción. Para los presentes experimentos, tanto Wnt3a como DKK1 se agregaron primero a las células en cantidades optimizadas para suprimir alrededor del 80% de la expresión de luciferasa dependiente de Wnt. Se espera que la adición adicional de un anticuerpo anti-DKK1 con actividad neutralizante a estas mismas células restaure la actividad Wnt, resultando por lo tanto una expresión de luciferasa incrementada. Los sobrenadantes de los hibridomas se probaron de esta manera para determinar si estos fueron capaces de restaurar la expresión de luciferasa en células transfectadas con la construcción de Wnt/luciferasa. Se cuantificó la actividad de luciferasa como se describe más adelante.

15 El día cero se sembraron células 293T recientemente tripsinizadas en placas de 96 pocillos recubiertas con fibronectina. Las células se co-transfectaron entonces con ADN que codifica luciferasa de luciérnaga y ADN que codifica luciferasa de renilla. El día 1, para cada pocillo, se mezclaron ADN de TCF/lef-luciferasa y 1 ng de ADN de luciferasa de renilla en 30 µl de DMEM con Polyfect Transfection Reagent™ (Qiagen 301107) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de un complejo PolyFect-ADN. Después de esta incubación, se agregaron al pocillo 20 100 µl de medio de crecimiento. Entonces se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pocillos y el complejo en el medio de crecimiento se agregó al pocillo. El medio de crecimiento en los pocillos se retiró tres horas más tarde y se reemplazó por medio acondicionado que contenía Wnt3a, DKK1 humana recombinante y medio acondicionado con hibridoma anti-DKK1.

Después de tres días, las células se lavaron una vez con PBS, y a cada uno de los pocillos se agregó tampón de lisis pasiva. Las placas se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para inducir la lisis. Se usaron 10 µl de lisado por ensayo para realizar el ensayo en placas blancas de 96 pocillos de acuerdo con el protocolo del fabricante. Señales luminiscentes de luciferasas de luciérnaga y renilla se registraron ambas y la relación de esas señales se usó para determinar la CE50 y para representar las curvas de dosis-respuesta. Primero, el sustrato de luciferasa de luciérnaga se inyectó en un pocillo con lisado celular y se registró la señal luminiscente; luego el sustrato de luciferasa de renilla se inyectó en el mismo pocillo y se registró la segunda señal luminiscente resultante.

La línea celular del estroma ST2, derivada de médula ósea de ratón, se usó como un rastreo adicional para aislar anticuerpos anti-DKK1 con actividad neutralizante. En respuesta a la señalización Wnt3a, las células ST2 se diferencian en osteoblastos que expresan la proteína marcadora de osteoblastos de fosfatasa alcalina (ALP). La inducción de ALP por Wnt3a en estas células puede bloquearse al agregar el inhibidor Wnt de DKK1 al medio de cultivo. Puede restaurarse la expresión de ALP bajo estas condiciones al exponer las células a un agente capaz de neutralizar la actividad DKK1, tal como un anticuerpo anti-DKK1 neutralizante.

En resumen, de los hibridomas que se rastrearon en el ensayo ELISA, 344 se unían a DKK1 en los ensayos ELISA y 25 fueron positivos en uno o ambos de los ensayos de neutralización (ensayo informador TCR/lef o ensayo de células ST2). Los hibridomas que exhiben la mejor actividad de cada una de las tres campañas se muestran en la tabla 3. Como puede verse de las actividades celulares de estos anticuerpos, los derivados de la segunda (5.X.x) y tercera (6.X.x) campañas, es decir, los generados en los ratones KL, exhibían en general mejores actividades basadas en células como es evidente de las CE50s más bajas que los generados en la primera (2.X.x) campaña con el Xenomouse.

Tabla 3

Anticuerpo	TCF CE50 (nM)	ST2 CE50 (nM)
2.20.1	10,67	34,67
2.37.1	40,18	145,33
2.4.1	38,59	17,2
2.40.1	1,28	2,47
2.41.1	32,07	89,07
2.47.1	60,7	ND

Anticuerpo	TCF CE50 (nM)	ST2 CE50 (nM)
5.17.1	3,48	8,24
5.23.1	1,01	4,29
5.25.1	1,88	5,96
5.31.1	5,29	10,38
5.32.1	1,01	3,48
5.40.1	3,75	7,24
5.65.1	4,21	5,87
5.76.1	2,55	4,09
5.77.1	2,14	6,23
5.78.1	3,75	5,70
5.80.1	3,22	5,03
5.85.1	4,53	10,55
6.116.6	4,69	2,77
6.139.5	9,78	3,93
6.147.4	3,95	2,57
6.37.5	6,57	3,98

## EJEMPLO 6

### Clonación y análisis de la secuencia de anticuerpo

- 5 Se preparó ARN total a partir de líneas celulares de hibridoma anti-DKK1. Las secuencias de ADN fueron proporcionadas por Abgenix u obtenidas al secuenciar los productos RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) clonados.

## EJEMPLO 7

### Expresión y purificación de anticuerpos anti-huDKK1 humanos en células CHO

- 10 Se crearon líneas celulares anti DKK1 al transfectar células huéspedes de CHO con los plásmidos de expresión pDC323-anti DKK1 kappa y pDC324 [anti-DKK1-IgG2] para 2.40.3, 6.35.5, 6.116.6 HC-IgG2 y LC-kappa usando un procedimiento de electroporación estándar. Después de la transfección de la línea celular huésped con los plásmidos de expresión, las células se hicieron crecer en medio de selección –GHT que contenía suero de bovino fetal dializado al 4% (ds o dfFBS) durante 2-3 semanas para permitir la selección del plásmido y recuperar las células. Se retiró entonces el suero del medio y las células se hicieron crecer en medio selectivo GHT hasta que alcanzaron > 85% de viabilidad. Esta agrupación de
- 15 células transfectadas se cultivó entonces en medio que contenía MTX [150-300] nM seguido de medio que contenía MTX 500-1000nM para seleccionar células de expresión superior.

- 20 Líneas celulares que expresan el anticuerpo anti-huDKK1-1 se expandieron usando técnicas de cultivo celular asépticas. Las células se inocularon en un biorreactor tras la expansión y el cultivo se alimentó según fuese necesario. En la recogida, las células se centrifugaron y se filtró el medio acondicionado. Anticuerpos anti-huDKK1 humanos se purificaron del medio acondicionado en Protein A sepharose. Anticuerpo DKK1 purificado se intercambió en tampón por el tampón de elección.

## EJEMPLO 8

### Ensayo de bloqueo cruzado basado en ELISA

- 25 Los volúmenes líquidos usados en este ejemplo fueron los usados típicamente en los ELISAs de placa de 96 pocillos (p. ej. 50-200 ul/pocillo). Se supuso que Ab-X y Ab-Y, en este ejemplo, tenían pesos moleculares de alrededor de 145 Kd y tenían 2 sitios de unión a DKK1 por molécula de anticuerpo. Se recubrió un anticuerpo anti-DKK1 (Ab-X) (p. ej. 50 ul de 1 ug/ml) en una placa ELISA de 96 pocillos durante al menos una hora. Después de esta etapa de recubrimiento se retiró la solución de anticuerpo, la placa se lavó con esta solución de lavado y luego se bloqueó usando una solución de bloqueo apropiada y procedimientos conocidos en la técnica. La solución de bloqueo se retiró de la placa ELISA y un segundo anticuerpo anti-DKK1 (Ab-Y), que se probó en cuanto a su capacidad de bloquear de forma cruzada el anticuerpo



recubierto se agregó en exceso (p. ej. 50 ul de 10 ug/ml) en solución de bloqueo a los pocillos apropiados de la placa ELISA.

Después de esto, se agregó entonces una cantidad limitada (p. ej. 50 ul de 10 ng/ml) de huDKK1 en solución de bloqueo a los pocillos apropiados y la placa se incubó durante al menos una hora a temperatura ambiente mientras se agita y se lavó entonces la placa. Se agregó una cantidad apropiada de un reactivo de detección de DKK1 en solución de bloqueo a la placa ELISA y se incubó durante al menos una hora a temperatura ambiente.

La placa se lavó entonces con solución de lavado y se desarrolló con un reactivo apropiado. La señal de fondo para el ensayo se definió como la señal obtenida en los pocillos con el anticuerpo recubierto (en este caso Ab-X), segundo anticuerpo en fase de solución (en este caso Ab-Y), solo tampón DKK1 (es decir, sin DKK1) y reactivos de detección de DKK1. La señal de control positivo para el ensayo se definió como la señal obtenida en los pocillos con el anticuerpo recubierto (en este caso Ab-X), solo segundo tampón de anticuerpo en fase de solución (es decir, sin segundo anticuerpo en fase de solución), DKK1 y reactivos de detección de DKK1. El ensayo ELISA necesita realizarse de tal manera que para tener la señal de control positivo tenga al menos 6 veces la señal de fondo.

Ab-X y Ab-Y se definen como de bloqueo cruzado si, ya sea en el formato 1 o en el formato 2, el anticuerpo anti-DKK1 en fase de solución fue capaz de causar una reducción de entre 60% y 100%, específicamente entre 70% y 100%, y más específicamente entre 80% y 100%, de la señal de detección de DKK1 (es decir la cantidad de DKK1 unido por el anticuerpo recubierto) en comparación con la señal de detección de DKK1 obtenida en ausencia del anticuerpo anti-DKK1 en fase de solución (es decir los pocillos de control positivo). Se entenderá por experto en la técnica que la expresión 'bloqueo cruzado' no pretende abarcar solo el bloqueo completo de la unión de la molécula de prueba, al contrario puede incluir un intervalo de unión reducida de menos de 100% como se describe aquí. En un ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo aislado que bloquea de manera cruzada la unión del anticuerpo descrito en SEQ ID NOs: 42 y 44 a DKK1 humana y/o bloquea de manera cruzada de la unión a DKK1 humana por el anticuerpo representado en SEQ ID NOs: 42 y 44. Los anticuerpos que se bloquean de manera cruzada de la unión a DKK1 humana por la unión del anticuerpo descrito en SEQ ID NOs: 42 y 44 incluyen los que tienen un 60% de reducción en la unión a DKK1 humana, 70% de reducción en la unión a DKK1 humana, 80% de reducción en la unión a DKK1 humana, 90% de reducción en la unión a DKK1 humana o 95% de reducción en la unión a DKK1 humana. Los anticuerpos que bloquean de manera cruzada la unión de DKK1 humana por la unión del anticuerpo descrito en SEQ ID NOs: 42 y 44 incluyen los que tienen una reducción del 60% en la unión a DKK1 humana, una reducción del 70% en la unión a DKK1 humana, una reducción del 80% en la unión a DKK1 humana, una reducción del 90% en la unión a DKK1 humana o una reducción del 95% en la unión a DKK1 humana. A los anticuerpos que fueron capaces de bloquear de manera cruzada uno al otro se aluden en la presente como que están en el mismo intervalo.

En el caso de que se use una versión etiquetada de DKK1 en el ELISA, tal como DKK1 etiquetada con His en posición N-terminal (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.; 2005 número de catálogo 1406-ST-025) entonces un tipo apropiado de reactivo de detección de DKK1 incluiría un anticuerpo anti-His marcado con HRP. Además de usar DKK1 etiquetada con His en posición N-terminal, también podría usarse DKK1 etiquetada con His en posición C-terminal. Adicionalmente, varias otras etiquetas y combinaciones de proteína de unión a etiquetas que se conocen en la técnica podrían usarse en este ensayo de bloqueo cruzado basado en ELISA (p. ej. etiqueta HA con anticuerpos anti-HA; etiqueta FLAG con anticuerpos anti-FLAG; etiqueta biotina con estreptavidina).

Los anticuerpos neutralizantes anti-huDKK1 humanos descritos en la presente reconocen dos epítomos distintos como evidentes por la incapacidad de los anticuerpos de bloquearse de forma cruzada uno al otro. Al primer epítomo se le alude como 11H10 que se ha descrito previamente (Patente de los Estados Unidos de América N° 7.709.611). El segundo epítomo se describe más adelante y se le alude como 5.25.1 (SEQ ID NOs: 42 y 44).

## EJEMPLO 9

### Caracterización de epítomos DKK1 humanos que se unen al anticuerpo 5.25.1

DKK1 humana contiene dos dominios ricos en disulfuro localizados cerca del extremo N y en el extremo del extremo C, a los que se alude aquí como los dominios disulfuro N- y C-terminales. El dominio de disulfuro N-terminal (de aquí en adelante, "dominio de disulfuro 1" o "D1") contiene 55 residuos de aminoácidos (aminoácidos 85-139 de SEQ ID NO: 2) y tiene 10 cisteínas que forman 5 enlaces disulfuro intramoleculares. El dominio de disulfuro C-terminal (de aquí en adelante, "dominio de disulfuro 2" o "D2") contiene 75 aminoácidos (aminoácidos 189-263 de SEQ ID NO:2) y contiene 10 cisteínas que también forman 5 puentes disulfuro intramoleculares. Estos dos dominios disulfuro están separados por un tramo de alrededor de 50 aminoácidos. Se ha propuesto que el dominio de disulfuro 2 (D2) de DKK1 tiene una estructura molecular similar al pliegue de copilasa canónico, de la cual se ha determinado la estructura de cristal usando colipasa porcina

(Aravind, A. y Koonin, E.V., Current Biology 8:R477-479 (1998)). Recientemente se ha determinado los enlaces disulfuro intramoleculares entre los 10 residuos de cisteína en el dominio D1 N terminal de la molécula de DKK.

El tratamiento con un agente reductor erradicó la capacidad de DKK1 de unir 5.25.1, indicando por lo tanto que el epítipo fijado como objetivo por este anticuerpo es conformacional (o discontinuo) y requiere el mantenimiento de enlaces disulfuro intactos en los dominios D1 y D2. Para caracterizar este epítipo conformacional, se empleó una estrategia que implicaba fragmentar DKK1 humana con bromuro de cianógeno (CNBr) y varias proteasas diferentes, analizar luego los fragmentos y probarlos en cuanto a su capacidad de unirse al anticuerpo. También se realizó la digestión en presencia de 5.25.1 para detectar aquellos residuos de aminoácidos o regiones de secuencia que están protegidos de proteólisis debido a la unión al anticuerpo. Los datos resultantes permitió elucidar la localización del o de los epítopos. En esencia, la digestión proteolítica de DKK1 se llevó a cabo en ausencia o en presencia del anticuerpo 5.25.1 y luego se sometió a mapeo del péptido por HPLC. Puede observarse una reducción parcial o completa en la altura de un pico HPLC y/o la detección de un pico recientemente generado en la muestra expuesta al anticuerpo.

Después de cada digestión de péptido, los productos de la reacción se separaron por HPLC, se recogieron los picos individuales y los péptidos se identificaron y mapearon por secuenciación N-terminal. Para determinar si los péptidos se podrían unir a 5.25.1, estos se sometieron a ensayos de interacción bioespecífica en tiempo real con una estación de trabajo BiaCore, usando una superficie de sensograma unida covalentemente con HuDKK1 como un biosensor para la unión. Se realizó el mapeo de péptidos por HPLC bajo condiciones estándar.

#### Digestión con CNBr

La escisión con CNBr de hDKK1 generó dos fragmentos grandes. Estos fueron CNBr1 y CNBr2, que representaban, respectivamente, dominios disulfuro D2 y D1. CNBr1 consistía en dos péptidos (aminoácidos 179-206 de SEQ ID NO: 2 y aminoácidos 207-266 [o 274 si se incluye el péptido flag C-terminal agregado] de SEQ ID NO: 2) mantenidos juntos por 5 enlaces disulfuro. CNBr2 consistía similarmente en dos péptidos (aminoácidos 32-122 de SEQ ID NO: 2 y aminoácidos 127-178 de SEQ ID NO: 2), también mantenidos juntos por 5 enlaces disulfuro (Tabla 4). Los resultados del análisis BiaCore indicaron que 5.25.1 fue capaz de unirse significativamente a CNBr2, pero no a unirse a CNBr1. Por lo tanto, se concluyó que 5.25.1 se une a una región de epítipo localizada en el dominio disulfuro D1 de HuDKK1.

#### Digestión de tripsina

DKK1 humana se digirió a continuación con tripsina, que escinde después los residuos ARG y LYS. Alrededor de 200 µg de DKK1 a 0,5-1,0 mg/ml se incubaron en PBS (pH 7,2) durante 20 h a 37°C con 8 µg de una o la otra de estas proteasas para lograr la digestión completa de DKK1.

La cromatografía HPLC de digestiones tripticas proporcionó múltiples picos, que se recogieron, secaron y reconstituyeron en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2. La Tabla 4 describe fragmentos de péptido DKK1 que contienen el dominio disulfuro N-terminal D1 derivado de la escisión de CNBr y digestiones proteolíticas.

Tabla 4

Fragmento	Número de péptidos	Posiciones de secuencia con referencia a SEQ ID NO: 2
CNBr2	2	32-122 y 127-178
T2 (o T3) <sup>1</sup>	5	74-102, 103-115, 121-123, 124-134, y 135-147
T4 <sup>2</sup>	1	74-147
AspN1 (AspN2)	2	78-104 y 105-141
<sup>1</sup> Se derivaron péptidos de digestión de tripsina de HuDKK1 sola.		
<sup>2</sup> Se derivó el péptido de digestión de tripsina de HuDKK1 en presencia de anticuerpo 5.25.1.		

El análisis de la secuencia se realizó en los picos de péptido recuperados de HPLC después de digestión de tripsina. Los picos de péptido que contenían secuencias de péptido sin enlaces disulfuro también se confirmaron por análisis LC-MS/MS. La masa molecular de los fragmentos que contenían múltiples péptidos enlazados a disulfuro se confirmó por análisis espectrométrico de masa de desorción por láser asistida por matriz (MALDI-MS). Se confirmó que dos picos, T2 (tiempo de retención 40,7 min usando columna de 1 mm de d.i. o 43,5 minutos usando columna de 2.1 mm) y T3 (tiempo

de retención 41,9 min usando columna de 1 mm de d.i. o 44,7 minutos usando columna de 2,1 mm), contenían secuencias que mapearon al dominio disulfuro 1, mientras que el péptido T1 (tiempo de retención 35 min en columna C18 de 1 mm o 36,5 min en columna C4 de 2.1) mapeó al dominio disulfuro D2. Ninguno de T1, T2 y T3 se unía a 5.25.1 cuando se probó por experimentos de unión BiaCore. T2 y T3 son fragmentos de péptido grandes que consisten en cinco péptido pequeños (de 3 a 13 aminoácidos de longitud) mantenidos juntos por los cinco enlaces disulfuro en el dominio D1 con los aminoácidos 74-102, 103-115, 121-123, 124-134, 135-147 de SEQ ID:2 (Tabla 4). Un segmento pequeño de la secuencia en el dominio disulfuro 1 se perdió de T2 y T3. Esta secuencia perdida que contienen todos los Lys y Arg fue los aminoácidos 116-120 (secuencia de ARG-ARG-LYS-ARG) de SEQ ID NO: 2.

DKK1 humana también se incubó con 5.25.1 en una relación molar de 1:1 a 1:3 en tampón PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se digirió entonces la alícuota del complejo DKK1/anticuerpo por tripsina bajo condiciones como se describe arriba. El perfil de mapeo del péptido por HPLC de la digestión trípica es completamente idéntico al que se obtiene de la digestión de DKK1 en ausencia del anticuerpo 5.25.1, excepto que los picos T2 y T3 desaparecen y se volvió detectable un nuevo pico T4 (tiempo de retención 41,3 minutos usando columna de 1 mm o 44,3 minutos usando columna de 2,1 mm de d.i.). T4 es también el péptido de dominio D1 N-terminal, pero sólo contiene una secuencia de aminoácidos sencilla con los aminoácidos 74-147 de la secuencia ID NO: 2 (Tabla 4). En el ensayo de unión Biacore, T4 se une a 5.25.1 y puede competir por la unión a 5.25.1 con DKK1 unida a la superficie del Sensorchip.

#### Digestión con AspN

Para delinear además el epítipo de unión a 5.25.1, HuDKK1 se digirió con proteasa AspN y los fragmentos resultantes analizados como se describe arriba. De los picos HPLC principales generados por digestión con AspN, los picos que se unen al anticuerpo 5.25.1 fueron AspN1, AspN2 y AspN3. El análisis de la secuencia indicó que AspN1 y AspN2 se derivaron del dominio disulfuro D1. AspN1 y AspN2 fueron idénticos en la secuencia de aminoácidos y cada uno de ellos consistía en dos péptidos mantenidos juntos por cinco enlaces disulfuro en el dominio disulfuro D1. Estos dos péptidos consistían en los aminoácidos 78-104 y 105-141 de SEQ ID NO: 2 (véase la Tabla 4). AspN3 es un producto de digestión parcial, cuya secuencia contiene ambas secuencias de Dominios D1 y D2. Otros dos picos, AspN4 y AspN5, también se aislaron y confirmaron que eran péptidos enlazados por disulfuro en el dominio D2, AspN4 o AspN5 no compete con DKK1 por la unión a 5.25.1.

#### Análisis de los resultados de la digestión

Los resultados anteriores indican que 5.25.1 se une a epítopos no lineales de DKK1 humana localizados en el dominio disulfuro D1. Como se ejemplifica en la Figura 1, las regiones de epítipo se deducen con las observaciones descritas en lo siguiente:

La escisión de tripsina (R en la posición 102, y RKRRKR entre las posiciones 115 y 120 y K en la posición 134 en la Figura 1) genera cinco péptidos enlazados por disulfuros. Esta fracción de péptido trípico del dominio D1 pierde su actividad de unión a 5.25.1.

El anticuerpo 5.25.1 puede unirse a DKK1 para proteger todos los sitios de escisión en el dominio D1 de la proteólisis de tripsina (R en la posición 99, y RKRRKR entre las posiciones 115 y 120 y K en la posición 134). El fragmento trípico D1 obtenido, recuperado en un tiempo de retención distinto, es una cadena polipeptídica sencilla, lo que indica que todos los Arg y Lys en D1 se protegen de la proteólisis y, por lo tanto, se localizan próximos en la región de epítipo o se implican en la unión al epítipo. La actividad de unión se mantiene en los fragmentos D1 que generan escisión AspN o CNBr. Para mantener la actividad de unión, el tamaño de fragmento mínimo observado para el dominio D1 es aminoácidos 78-141, excepto que Asp-N había recortado el enlace péptido entre Gly 105 y Asp en la posición 105, dejando este bucle disulfuro grande (formado entre Cys 97 y Cys 111) no conectado en conjunto.

La escisión CNBr para la eliminación de los aminoácidos 123-126 (secuencia de ARG-HIS-ALA-MET) y escisión AspN del enlace péptido Gly114-Asp115 no tiene influencia en los fragmentos CNBr2 y AspN1 (o AspN2) de la unión a 5.25.1, por lo tanto, las secuencias en esta región no están en el epítipo. Una región altamente cargada de forma negativa (aminoácidos 83-91) en D1 es resistente a la digestión con GluC y AspN en ausencia de Ab (anticuerpo), lo que indica que esta región no es accesible para la proteólisis (puede deberse a impedimento estérico) y también es inaccesible a 5.25.1.

En resumen, los epítopos que residen en HuDKK1 para la unión a 5.25.1 incluyen secuencias discontinuas en el dominio disulfuro D1 N-terminal: aminoácidos 98-104, 107-121 y 129-140 de SEQ ID NO: 2. Y los enlaces disulfuro de dominio D1 se han mantenido intactos para mantener una conformación correcta o estructura tridimensional para unirse a 5.25.1.

**EJEMPLO 10**Afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales contra DKK1

Se realizaron análisis para estudiar la unión de anticuerpos anti-huDKK1 humanos a DKK1 usando BiaCore 2000 (BIACORE, Uppsala, Suecia). BiaCore permitió determinar la  $k_d$  de los anticuerpos seleccionados. Aquellos anticuerpos con una  $k_d$  más baja son más deseables que los que unen hDKK1 más tiempo que aquellos con una  $k_d$  más grande y, por lo tanto, es más probable que engendren una respuesta mayor. Se analizaron los sensogramas de unión y se resumen los datos a continuación.

Tabla 5

Anticuerpo	$k_d$ (1/s)
2.20.1	2,40E-04
2.37.1	2,40E-03
2.4.1	6,00E-04
2.40.1	6,27E-05
2.41.1	1,30E-03
2.47.1	9,20E-04
5.17.1	3,03E-04
5.23.1	1,81E-04
5.25.1	< 2e-5
5.31.1	1,05E-04
5.32.1	1,91E-04
5.40.1	2,81E-04
5.65.1	5,25E-04
5.76.1	2,41E-04
5.77.1	< 2e-5
5.78.1	1,91E-04
5.80.1	< 2e-5
6.116.6	2,00E-05
6.139.5	2,09E-04
6.147.4	2,51E-04
6.37.5	4,00E-05

Además de la constante de disociación, otros parámetros tales como  $k_a$  (constante de asociación),  $K_D$  (afinidad), actividad basada en células e in vivo, también son factores que tienen influencia en la selección general de productos terapéuticos. Los datos en la tabla 5 también indican que los anticuerpos derivados de las últimas inmunizaciones de los ratones KL proporcionaron anticuerpos con  $K_d$ 's más deseables. La unión a huDkk4 también se probó para varios de los anticuerpos para determinar la especificidad y se determinó que los anticuerpos anti-huDKK1 humanos tienen al menos una especificidad 50 veces mayor hacia DKK1 que hacía a Dkk4, no exhibiendo 5.25.1 y 5.32.1 unión detectable a Dkk4.

Curiosamente, cuando se analizaron los sensogramas generados del análisis BiaCore de anticuerpos de la segunda campaña, que contenían anticuerpos tanto en los intervalos 11H10 como 5.25.1, resultó evidente que existen diferencias entre los intervalos. Los anticuerpos del intervalo 11H10, a una concentración de anticuerpos dada, dio una señal de unión más alta que la que daban los anticuerpos del intervalo 5.25.1. Se observa una señal máxima incrementada de los anticuerpos del intervalo 11H10 (2.40.2 y 5.80.2 y 5.80.3).

A partir de los resultados del BiaCore resultó evidente que los anticuerpos anti-huDKK1 humanos varían en afinidad para DKK1, y que la afinidad para varios de estos para DKK1 humana excede los límites de sensibilidad del ensayo BiaCore. En consecuencia, la afinidad de varios de estos anticuerpos para DKK1 se evaluó además por un análisis de unión en equilibrio usando KinExA<sup>™</sup> 3000 más sensible. Para estas mediciones, se recubrieron perlas Reacti-Gel 6x (Pierce, Rockford, IL) con DKK1 humana, de cynomolgus o de ratón y se bloqueó con BSA. Se mezclaron cien pM, 300 pM o 1000 pM del anticuerpo con diversas concentraciones de DKK1 humana, de ratón

o de cyno, oscilando en concentración de 1 pM a 50 nM, y se equilibraron a temperatura ambiente durante 8 horas. Las mezclas se hicieron pasar entonces sobre las perlas recubiertas con DKK1. Se cuantificó la cantidad de anticuerpo anti-DKK1 unido a las perlas usando anticuerpo IgG anti-humano de cabra marcado con una etiqueta fluorescente (Cy5; Jackson Immuno Research, West Grove, PA). La cantidad de señal fluorescente medida fue proporcional a la concentración de anticuerpo anti-DKK1 libre en cada mezcla de reacción en equilibrio. La constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se obtuvo a partir de la regresión no lineal de las curvas de competencia usando un modelo de unión homogénea de un sitio de curva doble usando el software KinExA. Los resultados de los ensayos KinExA para los anticuerpos seleccionados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

Anticuerpo	$K_D$ humano (pM)	$K_D$ ratón (pM)	$K_D$ cyno (pM)
2.40.1	220	480	220
5.25.1	3	150	
5.32.1	3	40	
5.77.1	8	140	
5.80.1	60	25	
6.116.6	25	40	40
6.139.5	110		
6.147.4	125		
6.37.5	30	50	35

#### EJEMPLO 11

Sólo anticuerpos de intervalo 11H10 que bloquean el enlace de huDKK1 a LRP6 y Kremin2

La capacidad de la agrupación de anticuerpos 11H10 y 5.25.1 de bloquear la unión de DKK1 al co-receptor LRP6 de Wnt o a Kremin2 se examinó usando procedimientos de co-inmunoprecipitación. Se pre-incubaron LRP6-His y rhDKK1-Flag de ratón recombinantes o kremen2-his y hDKK1-flag de ser humano recombinantes con o sin el anticuerpo anti-DKK1 en solución salina equilibrada de HANKs con agitación durante la noche para permitir la formación de complejo.

En la figura 2A, rhDKK1-flag se incubó con LRP6-His y 5  $\mu$ g de uno de los anticuerpos DKK1 neutralizantes de la agrupación de 11H10 (5.80.1, 6.37.5 o r11H10) o la agrupación de 5.25.1 (5.25.1, 5.77.1). La mezcla se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-his que se uniría a LRP6 etiquetado con his y desplegaría el DKK1 asociado. El inmunoprecipitado se sometió entonces a análisis de transferencia Western usando un anticuerpo anti-flag que reconocía rhDKK1. De esta manera, pudo medirse DKK1 asociada con LRP6 en solución y la capacidad de los anticuerpos DKK1 neutralizantes de competir por la unión de DKK1 a LRP6, y por la inferencia a LRP5. En la pista 1 solo se incluye LRP6-His; pista 2 rhDKK1-Flag; pista 3 hLRP6-His + hDKK1-Flag; pista 4 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5.80.1; pista 5 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 6.37.5; pista 6 hLRP6-His + hDKK1-Flag + r11H10; pista 7 hLRP6-His+hDKK1-Flag + 5.25.1; pista 8 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5.77.1. Los datos indicaron que la agrupación de los tres anticuerpos 11H10, pero no la agrupación de los anticuerpos 5.25.1, pueden bloquear la interacción de DKK1 a LRP6.

De una manera similar se determinó la capacidad de los mismos anticuerpos anteriormente mencionados de bloquear la unión de DKK1 a Kremin2, y por inferencia a Kremin1, (Figura 2B). En la pista 1 solo se incluye LRP6-His; pista 2 rhDKK1-Flag; pista 3 hLRP6-His + hDKK1-Flag; pista 4 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 0,5  $\mu$ g de 5.80.1; pista 5 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5  $\mu$ g de 5.80.1; pista 6 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 0,5  $\mu$ g de 6.37.5; pista 7 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5  $\mu$ g de 6.37.5; pista 8 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 0,5  $\mu$ g de r11H10; pista 9 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5  $\mu$ g de r11H10; pista 10 hLRP6-His+hDKK1-Flag + 5  $\mu$ g de 5.25.1; pista 11 hLRP6-His + hDKK1-Flag + 5  $\mu$ g de 5.77.1.

Los datos indicaron que las agrupaciones de anticuerpos 11H10, pero no las agrupaciones de anticuerpos 5.25.1 pueden bloquear la interacción de DKK1 con Kremin2. Los datos presentados en este experimento sugieren que las dos agrupaciones diferentes de anticuerpos exhiben mecanismos de acción diferentes en la capacidad de neutralizar la actividad de DKK1 en la señalización Wnt.

**EJEMPLO 12**Actividad in vivo de anticuerpos seleccionados

Se realizaron experimentos para determinar si la neutralización de DKK1 en un modelo animal de ratón podría causar un incremento en la densidad mineral ósea (BMD) y en la osteocalcina en suero, un marcador para la formación ósea. Los anticuerpos probados fueron 2.40.2, 5.32.5, 5.80, 6.37.5, 6.116.6 y se purificaron como se describe arriba.

En el primer experimento, se inyectaron a ratones BDF-1 macho de cuatro semanas de edad (APR 233757, Charles River) por vía subcutánea a lo largo de un periodo de tres semanas una de tres dosis del anticuerpo monoclonal 2.40.2 purificado (5, 10 o 20 mg/kg). Se usaron cinco ratones por grupo. A ratones de control negativos se les inyectó vehículo (PBS) y a ratones de control positivos se les inyectó hormona paratiroidea (aminoácidos 1-34), que se conoce por estimular una densidad ósea incrementada en estos ratones (Dempster et al., Endocrine Reviews 14(6):690-709 (1993)). Se usaron cien µg/kg de PTH (1-34) por inyección. Los resultados para cambio porcentual en la densidad mineral ósea de tibia en tres semanas se muestran más adelante en la Figura 3.

Para comparar la eficacia in vivo de dos agrupaciones de anticuerpo diferentes, se seleccionaron anticuerpos representativos para cada una de las agrupaciones. Los anticuerpos seleccionados fueron 5.32.1 de la agrupación 5.25.1 y 5.80.1 de la agrupación 11H10. Ambos de estos anticuerpos se unen a DKK1 de ratón con afinidades similares. A ratones BDF-1 macho de ocho semanas de edad (APR 233757, Charles River) se les inyectó por vía subcutánea a lo largo de un periodo de dos semanas una de tres dosis del anticuerpo monoclonal purificado (3, 10 o 30 mg/kg). Se usaron seis ratones por grupo. A ratones de control negativo se les inyectó vehículo (PBS). Los datos se presentan en la Figura 4 como un cambio porcentual del valor de referencia en densidad mineral ósea de las vértebras lumbares e indica que la agrupación de anticuerpos 11H10 (5.80.1) exhibe actividad de construcción ósea superior que la agrupación de anticuerpos 5.25.1 (5.32.1).

En otro experimento, dos anticuerpos adicionales de la agrupación 11H10 se inyectaron a ratones BDF-1 macho de 8 semanas de edad. A estos ratones se les inyectó por vía subcutánea dos veces por semana durante tres semanas 25 mg/kg de los anticuerpos respectivos (6.37.5 y 6.116.6). Se usaron diez ratones por grupo. A los grupos de control se les inyectó vehículo (dos veces por semana) o PTH (100 µg/kg cinco veces por semana). Los datos se presentan más adelante en la Figura 5 como un cambio porcentual del valor de referencia en la densidad mineral ósea de las vértebras lumbares y se indica que estos anticuerpos incrementan la densidad ósea hasta un grado similar a PTH.

Se realizó un estudio similar con la agrupación de anticuerpos 11H10 de rata en un modelo de curación de fractura cerrada en rata. Se utilizó la agrupación de anticuerpos 11H10 completamente de rata r11H10 en este estudio como una molécula sustituta para los anticuerpos completamente humanos descritos en la presente. La duración de este estudio descartó el uso de los anticuerpos DKK1 completamente humanos debido a la respuesta inmunitaria del roedor dirigida contra los anticuerpos humanos. Brevemente, se generó una fractura en el fémur de ratas macho de 7-7,5 meses de edad (véase la metodología en el Ejemplo 14). Se estabilizó el fémur por inserción de una aguja fina (18G) en el espacio de médula del fémur antes de la fractura. Los animales fueron tratados entonces con vehículo o r11H10 (25 mg/kg dos veces por semana). Se dejó que curaran las fracturas durante siete semanas. Al completar el estudio, el fémur fracturado se analizó en cuanto a la densidad mineral ósea, resistencia biomecánica y puentes. Los animales tratados con anti-DKK1 mostraron una mejora importante en todos estos parámetros, lo que indica que la terapia con Anti-DKK1 será útil para el tratamiento de curación de fracturas, y otras indicaciones en las que se necesita la regeneración ósea. La Figura 6 muestra la mejora en carga máxima y BMD alcanzadas con tratamiento Anti-DKK1 en el callo de la fractura, lo que indica la aceleración de la curación de la fractura.

**EJEMPLO 13**Detección de DKK1 en muestras de suero y tejido de modelo humano y animal

Los anticuerpos descritos en la presente se han usado para detectar niveles de DKK1 en muestras de seres humanos, que incluyen pero no se limitan a suero. Para desarrollar este tipo de ensayo, fue importante que se seleccionaran dos anticuerpos que no reconocían el mismo epítipo, tal como los dos epítopos distintos descritos en la presente. Para evaluar la DKK1 en suero humano u otros tejidos, se estableció primero una curva patrón usando huDKK1 recombinante. Fue preferible que esta curva patrón se estableciera en suero humano que carece o contiene niveles bajos de huDKK1. Típicamente, el intervalo de la curva patrón que los autores de la invención usan para suero está entre 25 pg/ml y 10 ng/ml de huDKK1, aunque este intervalo puede necesitar ajustarse dependiendo de los valores mínimo y máximo de huDKK1 que se obtiene en las muestras que se están analizando. Un ejemplo del protocolo usado es como sigue, pero pueden hacerse modificaciones obvias para los expertos en la técnica dependiendo de los anticuerpos y muestras específicos utilizados.

Primero, el suero humano a analizar se cargó en una placa de media área de no unión. Una cantidad predeterminada de anticuerpo biotinilado del epítipo X (tal como 11H10) y una cantidad predeterminada de anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) del epítipo Y (tal como 5.25.1) se agregó al pocillo con 50 mg/ml de IgG de conejo

en tampón de bloqueo I para alcanzar un volumen total en el pocillo, incluyendo el suero, de 60 µl. Esta mezcla se dispuso en un agitador durante 30 minutos y luego se incubó a 4°C durante la noche.

Después de la incubación durante la noche, se transfirieron 50 µl de la solución a una placa de 396 pocillos. Esta placa se incubó entonces durante 1 hora a temperatura ambiente con mezclas. El pocillo se lavó con PBS y se agregó una solución de detección. La placa se analizó entonces en un lector apropiado. Este ensayo se realizó por duplicado y la concentración de DKK1 en suero se determinó por la comparación con la curva patrón. Los datos son útiles para determinar si los pacientes tienen niveles de DKK1 alterados en la muestra de tejido o suero que se está analizando.

Además de usar los anticuerpos descritos en la presente para la detección de DKK1 humana en suero humano, los anticuerpos también pueden usarse para detectar DKK1 en suero aislado de modelos animales de enfermedad. Como un ejemplo no inclusivo, se usó el protocolo como se describe anteriormente para detectar niveles de DKK1 en un modelo de enfermedad renal crónica en rata (CKD). Se prepararon un extracto de riñones enfermos y de control y se determinó el nivel de proteína DKK1 de rata. Los datos se muestran en la Figura 7 y demuestran que los niveles de proteína DKK1 son aproximadamente cinco veces elevados a las 3 semanas después de la inducción de daño renal con el agente farmacológico. Estos resultados indican que DKK1 está implicado en el progreso de la enfermedad renal y sugiere que esa modulación farmacológica de DKK1 es de utilidad terapéutica en la enfermedad renal. Similarmente, los métodos descritos en este ejemplo pueden usarse para identificar otros estados de enfermedad en donde la modulación de DKK1 puede tener utilidad terapéutica.

#### EJEMPLO 14

La esclerostina y DKK1 son reguladores negativos de la formación ósea. La inhibición de esclerostina por el tratamiento sistémico con un anticuerpo monoclonal de esclerostina (Scl-Ab) incrementa significativamente la formación ósea, la masa ósea y la resistencia ósea en modelos animales de osteoporosis (Li XD, et al. J Bone Miner Res 2009; 24:578). Adicionalmente, el tratamiento con Scl-Ab potenció la curación de la fractura en modelos animales de reparación ósea (Ke HZ, et al. Trans ORS 2009; 34:22; Ominsky M, et al., resumen ASBMR septiembre de 2009; Denver, CO). Similarmente, la neutralización de DKK1 por administración sistémica del anticuerpo monoclonal r11H10 (DKK1-Ab) incrementa la densidad mineral ósea (BMD) y la resistencia en modelos de sitios de fractura de ratón (Komatsu DE, et al. J Orthop Res 2010; DOI 10.1002/JOR.21078) y fractura de rata. Los autores de la invención hipotizaron que la combinación de Scl-Ab y DKK1-Ab puede tener un efecto sinérgico en estimular la formación ósea e incrementar la resistencia ósea en hueso fracturado y no fracturado en un modelo de rata adulta.

Diseño del estudio: Ratas Sprague-Dawley (SD) de siete a 7,5 meses de edad (peso corporal medio 580 g) experimentaron fractura diafisaria media femoral cerrada unilateral como se informó previamente (Bonnarens F, et al. J Orthop Res 1984; 2: 97-101). Brevemente, se insertó una jeringa de calibre 18 en el canal medular a través de los cóndilos femorales, y sirvió como una fijación interna. El fémur experimentó entonces una fractura transversal por medio de impacto directo cargado en el aspecto anterior (lateral) del muslo. Un día después de la fractura, se inyectaron por vía subcutánea a los animales (n = 14-18/grupo) ya sea vehículo salino o Scl-Ab, o DKK1-Ab (r11H10) o una combinación de Scl-Ab y DKK1-Ab (Combinación). Tanto Scl-Ab como DKK1-Ab se dieron por inyección subcutánea a razón de 25 mg/kg dos veces por semana. A las 7 semanas después de la fractura se les aplicó la eutanasia a los animales; se recogieron los fémures fracturado e intacto, contralaterales (CL) para la densitometría y biomecánica. Este estudio fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Institución Amgen.

Densitometría: Se rastrearon los fémures ex vivo por DXA (GE Lunar PIXImus II) en la región de la fractura (media 30% del fémur fracturado) o la región correspondiente en el fémur CL para determinar la densidad mineral ósea (BMD) del área. También se rastrearon ambos fémures usando un sistema micro-CT de escritorio (eXplore Locus SP, GE Healthcare, Londres, Ontario, Canadá) y se reconstruyeron hasta una resolución de 30 µm. Se evaluaron el contenido mineral óseo (BMC, umbral de 800 mg/cm<sup>3</sup>) de 1 mm del centro del callo fracturado después de substraer de la corteza original como se describe previamente (Taylor DK, et al. J Bone Miner Res 2009; 24:1043-1054). Se cuantificó el volumen óseo del callo como un porcentaje del volumen total (BV/TV) usando un umbral variable (570 mg/cm<sup>3</sup> para vehículo, Scl-Ab y DKK1-Ab; 615 mg/cm<sup>3</sup> para la Combinación). Para el fémur CL intacto se examinaron regiones que abarcan el 10% de la altura del fémur en la diáfisis (umbral 800 mg/cm<sup>3</sup>) para el hueso cortical y el hueso trabecular del fémur distal (umbral 450 mg/cm<sup>3</sup> para vehículo y DKK1-Ab, 550 mg/cm<sup>3</sup> para Scl-Ab y 600 mg/cm<sup>3</sup> para combinación). Se evaluaron el área ósea cortical promedio y la fracción de volumen óseo callosa (BV/TV) en estos sitios, respectivamente.

Biomecánicas: Se probaron los fémures en doblado de 3 puntos en cuanto al fallo en el centro de los callos fracturados o en la diáfisis del fémur contralateral, y se evaluaron los parámetros de resistencia ósea (MTS 858 Mini Bionix II; longitud del espacio = 20 mm; relación de desplazamiento = 0,1 mm/s).

Análisis estadístico: Se usó GraphPad Prism (v. 5.01) para realizar el análisis estadístico. Se compararon las varianzas de grupo por la prueba F. si las varianzas de grupo fueron significativamente heterogéneas ( $p \leq 0,05$ ), los datos se transforman log y se vuelve a enviar la evaluación de varianza. Cuando las diferencias entre las varianzas del grupo no fueron importantes, se usó un test t no pareado para realizar las comparaciones medias del grupo entre el vehículo y Scl-Ab o DKK1-Ab. Cuando las varianzas del grupo se mantenían heterogéneas ( $p \leq 0,05$ ), entonces se realizó la comparación usando la prueba de Mann Whitney. Los datos reseñados como Media + SE, y  $p < 0,05$  se consideran importantes.

RESULTADOS: Fémures fracturados: tanto Scl-Ab como DKK1-Ab mostraron una mejora similar de la masa ósea y resistencia ósea en callos fracturados, como se demuestra por un incremento del 11% en la BMD de la diáfisis por DXA, y un incremento del 24-26% en la BMC por  $\mu$ CT y un incremento del 40-60% en BV/TV por  $\mu$ CT en 1 mm central del callo fracturado; y un incremento del 76-122% en la carga pico del hueso fracturado, respectivamente, comparado con el vehículo. El tratamiento de combinación de Scl-Ab y DKK1-Ab potenció grandemente la masa ósea y la resistencia ósea en el callo fracturado, hasta niveles significativamente mayores que cualquiera solo. Comparado con vehículo, hubo un incremento del 39%, 60% y 93% en la BMD, BMC y BV/TV de la diáfisis en 1 mm central del callo fracturado, respectivamente, en el grupo de Combinación. Estos cambios condujeron a un incremento del 230% en la carga pico en el grupo de Combinación comparado con vehículo. Además, BMD, BMC y BV/TV, y la carga pico fueron significativamente más altos en el grupo de Combinación comparado con grupos de Scl-Ab solo o DKK1-Ab solo.

Fémures contralaterales intactos:

DKK1-Ab no afectó significativamente la BMD de la diáfisis, el área ósea cortical y BV/TV óseo calloso y la resistencia ósea en fémures contralaterales intactos. Sin embargo, Scl-Ab incrementó significativamente la BMD ósea cortical de la diáfisis media en un 6% y el área ósea cortical en un 10%, y el BV/TV óseo calloso de fémur distal en un 43%, respectivamente, comparado con vehículo. Estos incrementos en la masa ósea en sitios óseos tanto cortical como calloso bajo tratamientos Scl-Ab se asocian con un incremento del 17% en la carga pico comparada con vehículo.

De manera similar al hueso fracturado, la combinación de Scl-Ab y DKK1-Ab incrementó significativamente la BMD de la diáfisis media femoral contralateral en un 12%, el área ósea cortical en un 17% y BV/TV óseo calloso del fémur distal en un 107%, y la carga pico en un 27% comparado con vehículo. Los valores medios para la BMD de la diáfisis y BV/TV calloso de fémur distal en el grupo de Combinación fueron significativamente mayores que los observados por los grupos Scl-Ab y DKK1-Ab solos, mientras que el área cortical y la carga pico en el grupo de Combinación fueron significativamente mayores en un 15% y 21% que el grupo DKK1-Ab solo, respectivamente.

Listado de secuencias

<110> Amgen Inc.

<120> ANTICUERPOS DKK1 Y MÉTODOS DE USO

<130> EP87688IHV163pau

<140> aún no asignado

<141> 27-10-2011

<150> 11779531.0

<151> 27-10-2011

<150> PCT/US2011/058025

<151> 27-10-2011

<150> 61/407.128

<151> 27-10-2010

<160> 244

<170> PatentIn version 3.5



# ES 2 863 626 T3

<210> 1  
 < 211> 798  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 1  
 atgatggctc tgggcgcagc gggagctacc cgggtctttg tcgcgatggt agcggcggct 60  
 ctcggcggcc accctctgct gggagtgagc gccaccttga actcggttct caattccaac 120  
 gctatcaaga acctgcccc accgctgggc ggcgctgcgg ggcacccagg ctctgcagtc 180  
 agcgcgcgcg cgggaatcct gtacccgggc gggaataagt accagaccat tgacaactac 240  
 cagccgtacc cgtgcgcaga ggacgaggag tgcggcactg atgagtactg cgctagtccc 300  
 acccgcgagc gggagcgcag cgtgcaaact tgtctcgcct gcaggaagcg ccgaaaacgc 360  
 tgcattgcgc acgctatgtg ctgccccggg aattactgca aaaatggaat atgtgtgtct 420  
 tctgatcaaa atcatttccg aggagaaatt gaggaacca tctactgaaag ctttggtaat 480  
 gatcatagca ccttgcatgg gtattccaga agaaccacct tgtcttcaa aatgtatcac 540  
 accaaaggac aagaagggtc tgtttgtctc aggtcatcag actgtgcctc aggatttgtt 600  
 tgtgatagac acttctggtc caagatctgt aaacctgtcc tgaaagaagg tcaagtgtgt 660  
 accaagcata ggagaaaagg ctctcatgga ctagaatat tccagcgttg ttactgtgga 720  
 gaaggctctg cttgccggat acagaaagat caccatcaag ccagtaattc ttctaggctt 780  
 cacacttgtc agagacac 798

<210> 2  
 < 211> 266  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10

# ES 2 863 626 T3

<400> 2

Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Arg Val Phe Val Ala Met  
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Leu Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Val Ser Ala Thr  
20 25 30

Leu Asn Ser Val Leu Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro Pro  
35 40 45

Leu Gly Gly Ala Ala Gly His Pro Gly Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro  
50 55 60

Gly Ile Leu Tyr Pro Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Ile Asp Asn Tyr  
65 70 75 80

Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr  
85 90 95

Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu  
100 105 110

Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys  
115 120 125

Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn  
130 135 140

His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn  
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 863 626 T3

<210> 3  
 < 211> 816  
 < 212> ADN  
 < 213> Mus musculus

5 <400> 3  
 atgatggttg tgtgtgcagc ggcagctgtc cggttcttgg ccgtgtttac aatgatggct 60  
 ctctgcagcc tccctctgct aggagccagt gccaccttga actcagttct catcaattcc 120  
 aacgcgatca agaacctgcc cccaccgctg ggtgggtgctg gggggcagcc gggctctgct 180  
 gtcagtgtgg cgccgggagt tctctatgag ggcgggaaca agtaccagac tcttgacaac 240  
 taccagccct acccttgccg tgaagatgag gagtgcggct ctgacgagta ctgctccagc 300  
 cccagcccg gggcagccgg cgtcggaggt gtacagatct gtctggcttg ccgaaagcgc 360  
 aggaagcgt gcatgaggca cgctatgtgc tgccccggga actactgcaa aaatggaata 420  
 tgcattgccct ctgaccacag ccattttcct cgaggggaga ttgaggaaag catcattgaa 480  
 aaccttggtg atgaccacaa cgccgccgg ggggatggat atcccagaag aaccacactg 540  
 acttcaaaaa tatatcacac caaaggacaa gaaggctccg tctgcctccg atcatcagac 600  
 tgtgccgcag ggctgtgttg tgcaagacac ttctgggtcca agatctgtaa acctgtcctt 660  
 aaagaaggtc aggtgtgcac caagcacaaa cggaaaggct cccacgggct ggagatatcc 720  
 cagcgctgtt actgcgggga aggcctggct tgcaggatac agaaagatca ccatcaagcc 780  
 agcaattctt ctaggctcca cacctgccag agacac 816

<210> 4  
 < 211> 272  
 < 212> PRT  
 < 213> Mus musculus

10 <400> 4  
 Met Met Val Val Cys Ala Ala Ala Val Arg Phe Leu Ala Val Phe  
 1 5 10 15  
 Thr Met Met Ala Leu Cys Ser Leu Pro Leu Leu Gly Ala Ser Ala Thr  
 20 25 30  
 Leu Asn Ser Val Leu Ile Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro  
 35 40 45  
 Pro Leu Gly Gly Ala Gly Gly Gln Pro Gly Ser Ala Val Ser Val Ala

# ES 2 863 626 T3

50                      55                      60  
 Pro Gly Val Leu Tyr Glu Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Leu Asp Asn  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Ser Asp Glu  
 85                      90                      95  
 Tyr Cys Ser Ser Pro Ser Arg Gly Ala Ala Gly Val Gly Gly Val Gln  
 100                      105                      110  
 Ile Cys Leu Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala  
 115                      120                      125  
 Met Cys Cys Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Met Pro Ser  
 130                      135                      140  
 Asp His Ser His Phe Pro Arg Gly Glu Ile Glu Glu Ser Ile Ile Glu  
 145                      150                      155                      160  
 Asn Leu Gly Asn Asp His Asn Ala Ala Ala Gly Asp Gly Tyr Pro Arg  
 165                      170                      175  
 Arg Thr Thr Leu Thr Ser Lys Ile Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly  
 180                      185                      190  
 Ser Val Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ala Ala Gly Leu Cys Cys Ala  
 195                      200                      205  
 Arg His Phe Trp Ser Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln  
 210                      215                      220  
 Val Cys Thr Lys His Lys Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe  
 225                      230                      235                      240  
 Gln Arg Cys Tyr Cys Gly Glu Gly Leu Ala Cys Arg Ile Gln Lys Asp  
 245                      250                      255  
 His His Gln Ala Ser Asn Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His  
 260                      265                      270  
 <210> 5  
 <211> 810  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 5  
 atgacggttg tgcgtgcagt ggcagctgtc cggttcttgg tcgtgcttac aacgatggct

60

ctctgcagcc tccctccgct cggagtcagc gccactttga actcagttct catcaattcc 120  
aacgcgatca agaacctgcc cccaccgctg ggtggtgctg gggggcagcc gggctctgct 180  
gtcagcgtgg cgcgccgagt cctctatgag ggcgggaaca agtaccagac tcttgacaac 240  
taccagccct acccttgccg ggaggatgag gattgctgca ctgacgagta ctgctccagt 300  
cccagccgcg gggcagcccg cgtgggaggt gtacaaatct gcctggcttg ccgaaagcgc 360  
aggaaacgct gcatgaggca cgctatgtgc tgccccggga attactgcaa aaacggaata 420  
tgcatgccct ctgaccacag ccatttacct cgaggggaaa tcgaggaagg catcattgaa 480  
aaccttgcca atgaccacgg tgccggggat ggatatccca gaagaaccac actgacttca 540  
aaaatatatc acaccaaagg gcaagaaggc tctgtctgcc tccgatcatc agactgcgcc 600  
acagggctgt gttgtgcaag acatttctgg tccaagatct gtaaacctgt ccttaaagaa 660  
ggtcaggatg gcaccaagca cagaaggaaa ggctcccacg ggctggagat attccagcgc 720  
tgttactgtg gggaaggctc ggcttgacag atacagaaag atcaccatca aaccagcaat 780  
tcttccaggc tccacacctg ccagagacac 810

<210> 6  
<211> 270  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus

<400> 6  
Met Thr Val Val Arg Ala Val Ala Ala Val Arg Phe Leu Val Val Leu  
1 5 10 15  
  
Thr Thr Met Ala Leu Cys Ser Leu Pro Pro Leu Gly Val Ser Ala Thr  
20 25 30  
  
Leu Asn Ser Val Leu Ile Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro  
35 40 45  
  
Pro Leu Gly Gly Ala Gly Gly Gln Pro Gly Ser Ala Val Ser Val Ala  
50 55 60  
  
Pro Gly Val Leu Tyr Glu Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Leu Asp Asn  
65 70 75 80  
  
Tyr Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu  
85 90 95  
  
Tyr Cys Ser Ser Pro Ser Arg Gly Ala Ala Gly Val Gly Gly Val Gln  
100 105 110  
  
Ile Cys Leu Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala

# ES 2 863 626 T3

115	120	125
Met Cys Cys Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Met Pro Ser		
130	135	140
Asp His Ser His Leu Pro Arg Gly Glu Ile Glu Glu Gly Ile Ile Glu		
145	150	155
Asn Leu Gly Asn Asp His Gly Ala Gly Asp Gly Tyr Pro Arg Arg Thr		
165	170	175
Thr Leu Thr Ser Lys Ile Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val		
180	185	190
Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ala Thr Gly Leu Cys Cys Ala Arg His		
195	200	205
Phe Trp Ser Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys		
210	215	220
Thr Lys His Arg Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg		
225	230	235
Cys Tyr Cys Gly Glu Gly Leu Ala Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His		
245	250	255
Gln Thr Ser Asn Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His		
260	265	270

<210> 7  
 <211> 798  
 <212> ADN  
 <213> Macaca fascicularis

<400> 7	
atgatggctc tgggcgcagc aggagctgcc cgggtcttgg tcgcgctggt agcggcggt	60
cttggcggcc accctctgct gggagtgagc gccacctga actcggttct caattccaac	120
gcgatcaaga acctgcccc accgctgggc ggcgctgcgg ggcacccagg ctctgcagtc	180
agcgccgcgc caggaattct gtaccgggc ggaataagt accagaccat tgacaactac	240
cagccgtacc cttgcgcaga ggatgaggag tgcggcactg atgagtactg cgctagtccc	300
accgcgggag gggacgcggg cgtgcaaato tgtctgcct gcaggaagcg ccgaaaacgc	360
tgcattgcgtc acgctatgtg ctgccccggg aattactgca aaaatggaat atgtgtgtct	420
tctgatcaaa ataatttccg aggggaaatt gaggaacca ttactgaaag ctttgtaaat	480
gatcatagca ctttggtatg gtattccaga agaacaacat tgtcttcaaa aatgtatcac	540

# ES 2 863 626 T3

agcaaaggac aagaagggttc tgtgtgtctc cggatcatcag actgtgccac aggactgtgt 600  
 tgtgctagac acttctggtc caagatctgt aaacctgtcc tcaaagaagg tcaagtgtgt 660  
 accaagcata gaagaaaagg ctctcatggg ctagaaatat tccagcgttg ttactgcgga 720  
 gaaggtctgt cttgccggat acagaaagat caccatcaag ccagtaattc ttctaggctt 780  
 cacacttgtc agagacac 798

<210> 8  
 <211> 266  
 <212> PRT  
 <213> Macaca fascicularis

<400> 8  
 Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Ala Arg Val Leu Val Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Val Ala Ala Ala Leu Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Val Ser Ala Thr  
 20 25 30  
 Leu Asn Ser Val Leu Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro Pro  
 35 40 45  
 Leu Gly Gly Ala Ala Gly His Pro Gly Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro  
 50 55 60  
 Gly Ile Leu Tyr Pro Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Ile Asp Asn Tyr  
 65 70 75 80  
 Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu  
 100 105 110  
 Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys  
 115 120 125  
 Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn  
 130 135 140  
 Asn Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Lys Met Tyr His Ser Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser

# ES 2 863 626 T3

180

185

190

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

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

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

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

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

<210> 9  
< 211> 321  
< 212> ADN  
< 213> Homo sapiens

5

<400> 9  
gacatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga gatgatttag gctgggttca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatacagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240  
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtgcag ttttggccag 300  
gggaccaagc tggagttcaa a 321

<210> 10  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

10

<400> 10  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asp Asp  
20 25 30  
Leu Gly Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60



# ES 2 863 626 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Phe Lys  
100 105

<210> 11  
<211> 372  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
caggttcagc taatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctg acaatgggtca cacaactat 180  
gcacagaaac tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240  
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 300  
gagctactaa attactacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360  
accgtctcct ca 372

<210> 12  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
Gln Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Asp Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu  
50 55 60

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

# ES 2 863 626 T3

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Glu Leu Leu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
100 105 110

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

<210> 13  
 5 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca ttcctggaca gccggcctcc 60  
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt tttgtactgg 120  
 tacctgcaga ggccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 180  
 tctggagtgc cacataggct cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240  
 agccgggttg aggctgagga tggtgggtt tattactgca tgcaaagtat acaggttccg 300  
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 14  
 10 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ile Pro Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Pro  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
 85 90 95

Ile Gln Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

# ES 2 863 626 T3

<210> 15  
 < 211> 363  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 15  
 cagtgtcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg 60  
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgca ctgggtccgc 120  
 caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat catatgatgg aagtgataaa 180  
 tactatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg 240  
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga 300  
 gatcaatggg gtggggagccc agccggcccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360  
 tca 363

<210> 16  
 < 211> 119  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10 <400> 16  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Gln Trp Gly Gly Ser Pro Ala Gly Pro Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 17  
 < 211> 324  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

15

# ES 2 863 626 T3

<400> 17  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180  
gacagggtta gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacgat caccttcggc 300  
caagggaacac gactggagat taaa 324

<210> 18  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn  
20 25 30  
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80  
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95  
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 19  
<211> 357  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 19  
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggaatg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtga taaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccttc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaattg 300  
ggtatagcag cttcctttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 20  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Leu Gly Ile Ala Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 21  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 21  
 gatattgtga tgaccacagtc tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60  
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg cacagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120  
 tatctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 180  
 tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240  
 agccgggtgg aggctgagga tggtggggtc tattactgca tgcaaagtat acaggttccg 300  
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

15

<210> 22  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
85 90 95

Ile Gln Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 23

<211> 351

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

cagggtgcaac tgggtggagtc tggaggagggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctgggggtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtga taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacctc	300
gtggatacag ctatgccctg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc a	351

<210> 24

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 25

<211> 336

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 25

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt tttgtattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc	180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agccgggtgg aggctgagga tgttgggtt tattactgca tgcaaagtaa acagcttcca	300
ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaa	336

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
85 90 95

Lys Gln Leu Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105 110

<210> 27  
<211> 366  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 27  
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtga taaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag ggctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagccggg 300  
tactccctct actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360  
tcctca 366

<210> 28  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

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

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



# ES 2 863 626 T3

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

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

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

Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 29  
<211> 339  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 29  
gatattgtga tgaccacagac tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60  
atctcctgca ggtctagtca gagcctcttg gatagtgatg atggagacac ctatttggac 120  
tggtacctgc agaagccagg gcagtctcca cagctcctga tctatacgct ttcctatcgg 180  
gcctctggag tcccagacag gttcagtggc agtgggtcag gcactgattt cacactgaaa 240  
atcagcaggg tggaggctga ggatgttgga gtttattact gcatgcaacg tatagagttt 300  
ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 30  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

Asp Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

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

# ES 2 863 626 T3

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln  
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile  
100 105 110

Lys

<210> 31  
< 211> 381  
< 212> ADN  
< 213> Homo sapiens

<400> 31  
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60  
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggct actactggag ctggatccgc 120  
cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt ggggacatct attacagtgg gagcacctac 180  
tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240  
tcctgaagc tgagctctgt gactgccgag gacacggcgg tgtattactg tgcgagagat 300  
cgggcttacg gtgactacgg gggagactac tactacggta tggacgtctg gggccaaggg 360  
accacggtca cgtctcctc a 381

<210> 32  
< 211> 127  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 32  
Gln Val Gln Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

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

# ES 2 863 626 T3

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Ala Tyr Gly Asp Tyr Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr  
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 33  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc aggcgagtca ggacattaac aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaatctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gcagatattg caacatatta ctgtcaacaa tatgatgatt tcccgctcac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 34  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Ala Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 35  
 < 211> 354  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 35  
 Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr  
 20 25 30  
 Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Ala Gly  
 35 40 45  
 Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Thr  
 50 55 60  
 Gly Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ala Cys  
 85 90 95  
 Thr Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys  
 100 105 110  
 Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Thr Ala Thr Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Ala Ala Thr Thr Ala  
 165 170 175  
 Cys Ala Ala Cys Cys Cys Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Ala Ala Gly  
 180 185 190  
 Ala Gly Thr Cys Gly Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Ala Thr  
 195 200 205

# ES 2 863 626 T3

Cys Ala Gly Thr Ala Gly Ala Cys Ala Cys Gly Thr Cys Cys Ala Ala  
210 215 220

Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly  
225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Thr Gly Thr Gly Ala  
245 250 255

Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Gly Gly Ala Cys Ala Cys Gly Gly Cys  
260 265 270

Cys Gly Thr Ala Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Gly Cys Gly  
275 280 285

Ala Gly Gly Thr Ala Thr Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala  
290 295 300

Ala Cys Gly Ala Cys Cys Thr Cys Thr Thr Thr Gly Ala Cys Thr Ala  
305 310 315 320

Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys  
325 330 335

Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr  
340 345 350

Cys Ala

<210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

# ES 2 863 626 T3

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 37  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 37  
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc aggcgagtc ggacattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaactgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagatattg caacatatta ctgtcaacaa tatgataatc tccctctcac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 38  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 38  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

# ES 2 863 626 T3

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 39  
< 211> 378  
< 212> ADN  
< 213> Homo sapiens

<400> 39  
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtgtg atggaagtaa taaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca gttccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggc 300  
tatggttcgg ggagttatga ggactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360  
acggtcaccg tctcctca 378

<210> 40  
< 211> 126  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 40  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly  
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

# ES 2 863 626 T3

<210> 41  
 < 211> 321  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 41  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc aggcgagtc ggacattagt aaggatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaggctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacggg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatattg caacatttta ctgtcaacag tatgatcatc tcccgatcgc cttcggccaa 300  
 gggacacgac tggagattaa a 321

10 <210> 42  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 42  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Asp  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp His Leu Pro Ile  
 85 90 95  
 Ala Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

15 <210> 43  
 < 211> 357  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens



# ES 2 863 626 T3

<400> 43  
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120  
actggccaag ggcttgagtg gatgggatgg atggacccta acagtggtaa cacaggctat 180  
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagccttc 240  
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaacggac 300  
tacttctact tcggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcacctg ctctca 357

<210> 44  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Trp Met Asp Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Phe  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Thr Asp Tyr Phe Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 45  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 45  
gacatccagg tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc aggcgagtc gacattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120

# ES 2 863 626 T3

gggaaagccc ctaagttcct gatctacgat gcatccaatt tggaagcagg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttacttttca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag tatgataatc tcccgtcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 46  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 46  
 Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 47  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 47  
 caggtgcagt tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagaaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggg 300  
 ggagcagtg ctgattacaa ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360  
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 48  
 <211> 125

# ES 2 863 626 T3

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 48

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Gly Ala Val Ala Asp Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

5

<210> 49

< 211> 321

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 49

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc aggcgagtca ggacattagc aaggatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180

aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatattg caacatatta ctgtcaacag tatgatgatc tcccgatcac cttcggccaa 300

10

gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 50

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 50

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 51

<211> 357

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 51

cagggtgcagc	tggtacagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cctctggatt	caccttcacc	agttatgata	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
actggactag	ggcttgagtg	gatgggatgg	atgaacccta	gcagtgggta	cacaggctat	180
gcacagaact	tccagggcag	agtcaccatg	acctggaaca	cctccataag	cacagtctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagaacggac	300
tactactact	acggtatgga	cgtctggggc	cgagggacca	cggtcaccgt	ctcctca	357

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Leu Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Gln Asn Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Trp Asn Thr Ser Ile Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 53  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 53  
gacatccggt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc aggcgagtc ggacattagc aactatttaa attggtatca gcaggaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaacacagg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240  
gaagatattg caacatatta ctgtcaacag tatgataatt tcccgtcac ttccggcgga 300  
gggaccaagg tgagatcaa a 321

<210> 54  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54  
Asp Ile Arg Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

# ES 2 863 626 T3

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Phe Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 55  
< 211> 354  
< 212> ADN  
< 213> Homo sapiens

5

<400> 55  
cagggtgctac tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagacc 120  
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat gtctattaca gtgggagcac cagctacaac 180  
ccctccctca agagtcgagt caccatatca atgtacacgt ccaagaccga gttctccctg 240  
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag gtataactgg 300  
aacaacgacc tctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

10

<210> 56  
< 211> 118  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 56  
Gln Val Leu Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Met Tyr Thr Ser Lys Thr Glu Phe Ser Leu  
65 70 75 80

# ES 2 863 626 T3

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 57  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 57  
tcctatgtgt tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60  
acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120  
cagggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180  
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240  
gatgaggccg actattactg tcaggtgttg gatagtagta gtgatcatgt gatattcggc 300  
ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 58  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58  
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

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

# ES 2 863 626 T3

<210> 59  
 < 211> 324  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 59  
 tcctatgtgt tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60  
 acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120  
 caggccccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180  
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggc cgaagccggg 240  
 gatgaggccg actattactg tcaggtgttg gatagtagta gtgatcatgt gatattcggc 300  
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 60  
 < 211> 120  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10 <400> 60  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ser Gly Asn Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Glu Phe Gly Glu Leu Glu Pro Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 61  
 < 211> 324  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

15



# ES 2 863 626 T3

<400> 61  
tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60  
acctgtgggg gaaacaacat tggaagtgaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120  
caggccccctg tgctgggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180  
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggg cgaagccggg 240  
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta atgatcatgt ggttttcggc 300  
ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 62  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62  
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Glu Ser Val  
20 25 30  
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
35 40 45  
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Asn Asp His  
85 90 95  
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 63  
<211> 372  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 63  
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtagtaatt actactgggg ctggatccgc 120  
cagcccccg ggaaggggct ggagtggatt gggactatct attatagtgg gagcacctac 180  
tacaccccg cctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240  
tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tctattactg tgcgagagag 300  
agggcgatag cagtggctgc tatagtcttc ttgactact ggggccaggg aaccctggtc 360  
accgtctcct ca 372

5

<210> 64  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 64  
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30  
Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45  
Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser  
50 55 60  
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80  
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95  
Cys Ala Arg Glu Arg Ala Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Phe Phe Asp  
100 105 110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

10

<210> 65  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 65  
 tcctatgtgc tgactcagtc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60  
 acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120  
 caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180  
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240  
 gatgaggccg actactactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcattg ggtgttcggc 300  
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

5

<210> 66  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 66  
 Gln Ser Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr  
 1 5 10 15  
 Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln  
 20 25 30  
 Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg  
 35 40 45  
 Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr  
 50 55 60  
 Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr  
 65 70 75 80  
 Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val Phe Gly Gly  
 85 90 95  
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100

10

<210> 67  
 <211> 369  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 67  
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120  
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaatctta acagtgataa cacaggctat 180  
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cactgcctac 240  
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagtatagca 300  
gctcgtcgcg actacaacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac caaggtcacc 360  
gtctcctca 369

<210> 68  
< 211> 123  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 68  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Trp Met Asn Leu Asn Ser Asp Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Ser Ile Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
100 105 110  
Trp Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 69  
< 211> 321  
< 212> ADN  
< 213> Homo sapiens

<400> 69  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta tcagcagaaa 120  
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatccg gcagggccac tggcatcca 180  
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcattc tcaccatcag cagactggag 240  
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gtcattcac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 70  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30  
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45  
Ile Tyr Gly Ala Ser Gly Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80  
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 71  
<211> 375  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 71  
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattatatg atggaagtga taattactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaaggg 300  
atagcagtgg ctggggacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360  
gtcaccgtct cctca 375

<210> 72  
< 211> 125  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 72  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asp Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Gly Ile Ala Val Ala Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met  
100 105 110  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 73  
< 211> 336  
< 212> ADN  
< 213> Homo sapiens

<400> 73  
cagtcagtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60  
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcagattatg atgtacactg gtaccagcag 120  
cttcaggaa cagcccccaa actcctcatc tatgattaca gcaatcggcc ctcaggggtc 180  
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240  
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acaacagcct gagtgggtat 300  
gtgggtattcg gcggagggac caagctgacc gtccta 336

<210> 74  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp  
20 25 30  
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
35 40 45  
Leu Ile Tyr Asp Tyr Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60  
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
65 70 75 80  
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asn Ser  
85 90 95  
Leu Ser Gly Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 75  
<211> 348  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 75  
gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120  
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180  
agcccgctcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240  
ctgcagtgga gcagcctgac ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagacagggg 300  
gagagctttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 76  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 76  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Thr Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gln Gly Glu Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

10

<210> 77  
 <211> 330  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 77  
 cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60  
 tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcagggttatg atgtacactg gtaccagcag 120  
 cttccaagaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc 180  
 cctgaccgat tctctgactc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggcctc 240  
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtccatg acagcagcct gagtgtgata 300  
 ttccggcgag ggaccaagct gaccgtccta 330

15

<210> 78  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens



# ES 2 863 626 T3

<400> 78  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
 20 25 30  
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Arg Thr Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Asp Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Leu Ser Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

5 <210> 79  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 79  
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
 tcctgtaagg tttctggata cagctttacc acctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120  
 cccgggaaaag gcctggactg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180  
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240  
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacaaggt 300  
 atagcgtttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

10 <210> 80  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 80

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr  
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Met  
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 81

<211> 336

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 81

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtctgggtca gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt tttgtattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ttctgatct atgaagtttc caaccggttc	180
tctagagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgagaatc	240
agccgggtgg aggctgagga tgttggaatt tattactgca tgcaaagtat acagcttccg	300
tggacgttcg gccaaaggac ccaggtggaa atcaaa	336

<210> 82

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 82

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Arg Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
85 90 95

Ile Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 83

<211> 342

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 83

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt ggctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaatga taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatac acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagcta 300

cgggtcctct ggggccaggg aaccctggtc accgtctcta gt 342

<210> 84

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 84

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Leu Arg Val Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser

<210> 85

< 211> 336

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 85

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtctgggtca gagcctcctg cataatgatg gaaagacctt tttgtattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ttctgatct atgaagtttc caaccgggtc	180
tctagagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agccgggtgg aggctgagga tgttggaatt tattactgca tgcaaagtat acagcttccg	300
tggacgttcg gccaaaggac ccaggtggaa atcaaa	336

<210> 86

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 86

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Asn  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Arg Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
85 90 95

Ile Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 87

<211> 342

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 87

cagggtgcagc	tggtggagtc	tggtggagtc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	ggctatggca	tgacttgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggcggcagtt	atatcatatg	atggaaatga	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agctgaggac	acggctgttt	attactgtgc	gagagagcta	300
cgggtcctct	ggggccaggg	aaccctggtc	accgtctcct	ca		342

<210> 88

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 88

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Leu Arg Val Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser

<210> 89

< 211> 336

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 89

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctagaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt tttgtattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ttctgatct atgaagtttc caaccggttc	180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttccg	300
tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa	336

<210> 90

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 90

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Arg  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
85 90 95

Ile Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 91  
<211> 342  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 91  
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggtc 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaggtga tcaatactat 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag aactgaggac acggtgagat attactgtgc gagagagctc 300  
cgggtcctct ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342

<210> 92  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 92  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

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

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

# ES 2 863 626 T3

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

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

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

Ala Arg Glu Leu Arg Val Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser

<210> 93  
< 211> 324  
< 212> ADN  
< 213> Homo sapiens

<400> 93  
tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60  
acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtacact ggtaccagca gaagccaggc 120  
caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agtgaccggc cctcagagat ccctgagcga 180  
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240  
gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc 300  
ggagggacca ggctgaccgt ccta 324

<210> 94  
< 211> 107  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 94  
Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr  
1 5 10 15

Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
20 25 30

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

Asp Ser Asp Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn  
50 55 60

Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp



ES 2 863 626 T3

65                      70                      75                      80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val  
                              85                      90                      95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu  
100 105

5

<400> 95	
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt cgctatgaca tgcactgggt ccgccagget	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atattctatg atggcagcaa taaatactat	180
gcagaccccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attcaaagaa cacactgtat	240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gactctagca	300
gcagcttttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctctca	348

10

```

<400> 96
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

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

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

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

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

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

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

```

Thr Val Ser Ser  
115

5 <210> 97  
< 211> 11  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 97  
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asp Asp Leu Gly  
1 5 10

10 <210> 98  
< 211> 7  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 98  
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

15 <210> 99  
< 211> 9  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

20 <400> 99  
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Cys Ser  
1 5

<210> 100  
< 211> 5  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

25 <400> 100  
Ser Tyr Gly Ile Ser  
1 5

30 <210> 101  
< 211> 17  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 101  
Trp Ile Ser Ala Asp Asn Gly His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln  
1 5 10 15

Gly

35 <210> 102  
< 211> 15  
< 212> PRT  
< 213> Homo sapiens

<400> 102  
 Asp Gly Glu Leu Leu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15  
  
 <210> 103  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 103  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15  
  
 <210> 104  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 104  
 Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
  
 <210> 105  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 105  
 Met Gln Ser Ile Gln Val Pro Trp Thr  
 1 5  
  
 <210> 106  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 106  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5  
  
 <210> 107  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 107  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 <210> 108  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 108  
 Asp Gln Trp Gly Gly Ser Pro Ala Gly Pro  
 1 5 10

5  
 <210> 109  
 < 211> 12  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 109  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala  
 1 5 10

10  
 <210> 111  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 110  
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 1 5

15  
 <210> 111  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20  
 <400> 111  
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr  
 1 5

<210> 112  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25  
 <400> 112  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

30  
 <210> 113  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 113  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

35  
 <210> 114  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 114  
 Glu Leu Gly Ile Ala Ala Ser Phe Asp Tyr  
 1 5 10

5  
 <210> 115  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 115  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15

10  
 <210> 116  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 116  
 Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

15  
 <210> 117  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20  
 <400> 117  
 Met Gln Ser Ile Gln Val Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 118  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25  
 <400> 118  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

30  
 <210> 119  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 119  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

35  
 <210> 120  
 < 211> 8  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 120  
 Asp Leu Val Asp Thr Ala Met Pro  
 1 5  
 <210> 121  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
 <400> 121  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 10 <210> 122  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
 <400> 122  
 Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 15 <210> 123  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
 <400> 123  
 Met Gln Ser Lys Gln Leu Pro Phe Thr  
 1 5  
 20 <210> 124  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
 25 <400> 124  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5  
 30 <210> 125  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
 <400> 125  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 35 <210> 126  
 < 211> 13  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 126  
 Ala Gly Tyr Ser Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10

5  
 <210> 127  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 127  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Asp Gly Asp Thr Tyr Leu  
 1 5 10 15

Asp

10  
 <210> 128  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 128  
 Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser  
 1 5

15  
 <210> 129  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20  
 <400> 129  
 Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro  
 1 5 10

<210> 130  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25  
 <400> 130  
 Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser  
 1 5

30  
 <210> 131  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 131  
 Asp Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

35  
 <210> 132  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 132  
 Asp Arg Ala Tyr Gly Asp Tyr Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15  
  
 Val  
  
 <210> 133  
 <211> 11  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 133  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10  
  
 <210> 134  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 134  
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5  
  
 <210> 135  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 135  
 Gln Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Leu Thr  
 20 1 5  
  
 <210> 136  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 136  
 Ser Tyr Tyr Trp Ser  
 25 1 5  
  
 <210> 137  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 137  
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
  
 <210> 138  
 <211> 10  
 35 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens



<400> 138  
 Tyr Asn Trp Asn Asn Asp Leu Phe Asp Tyr  
 1 5 10

5  
 <210> 139  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10  
 <400> 139  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10

15  
 <210> 140  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20  
 <400> 140  
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5

25  
 <210> 141  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

30  
 <400> 141  
 Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr  
 1 5

35  
 <210> 142  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

40  
 <400> 142  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

45  
 <210> 143  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

50  
 <400> 143  
 Val Ile Trp Cys Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

55  
 Gly

60  
 <210> 144  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 144  
 Gly Gly Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15  
  
 Val  
  
 <210> 145  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 145  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Asp Leu Asn  
 1 5 10  
  
 <210> 146  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 146  
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5  
  
 <210> 147  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 147  
 Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr  
 1 5  
  
 <210> 148  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 148  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5  
  
 <210> 149  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 149  
 Trp Met Asp Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 <210> 150  
 <211> 10

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 150  
 Thr Asp Tyr Phe Tyr Phe Gly Met Asp Val  
 1 5 10

5 <210> 151  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 151  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10

10 <210> 152  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <400> 152  
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ala  
 1 5

<210> 153  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20 <400> 153  
 Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 154  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25 <400> 154  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

<210> 155  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

30 <400> 155  
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

35 Gly

<210> 156  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 156  
 Gly Gly Gly Ala Val Ala Asp Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15

10

<210> 157  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 157  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Asp Leu Asn  
 1 5 10

15

<210> 158  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 158  
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5

20

<210> 159  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 159  
 Gln Gln Tyr Asp Asp Leu Pro Ile Thr  
 1 5

25

<210> 160  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

30

<400> 160  
 Ser Tyr Asp Ile Ser  
 1 5

<210> 161  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

35

<400> 161  
 Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Gln Asn Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

<210> 162  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 162  
 Thr Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10

<210> 163  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

10

<400> 163  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10

<210> 164  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15

<400> 164  
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1 5

<210> 165  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20

<400> 165  
 Gln Gln Tyr Asp Asn Phe Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 166  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25

<400> 166  
 Ser Tyr Tyr Trp Ser  
 1 5

30

<210> 167  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 167  
 Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

35

<210> 168  
 < 211> 10

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 168  
 Tyr Asn Trp Asn Asn Asp Leu Phe Asp Tyr  
 1 5 10

5 <210> 169  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 169  
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 1 5 10

10 <210> 170  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <400> 170  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 171  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20 <400> 171  
 Gln Val Leu Asp Ser Ser Ser Asp His Val Ile  
 1 5 10

<210> 172  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25 <400> 172  
 Asn Tyr Ala Met Ser  
 1 5

<210> 173  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

30 <400> 173  
 Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu  
 1 5 10 15

Gly

35 <210> 174  
 < 211> 11

< 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 174  
 Glu Phe Gly Glu Leu Glu Pro Arg Phe Asp Tyr  
 1 5 10

5 <210> 175  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 175  
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Glu Ser Val His  
 1 5 10

10 <210> 176  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15 <400> 176  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 177  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20 <400> 177  
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Asn Asp His Val Val  
 1 5 10

<210> 178  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25 <400> 178  
 Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 179  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

30 <400> 179  
 Thr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

35 <210> 180  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 180  
 Glu Arg Ala Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Phe Phe Asp Tyr  
 1 5 10

5  
 <210> 181  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 181  
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 1 5 10

10  
 <210> 182  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 182  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

15  
 <210> 183  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20  
 <400> 183  
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val  
 1 5 10

<210> 184  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25  
 <400> 184  
 Ser Tyr Asp Ile Asn  
 1 5

30  
 <210> 185  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 185  
 Trp Met Asn Leu Asn Ser Asp Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

35  
 <210> 186  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens



# ES 2 863 626 T3

<400> 186  
 Ile Ala Ala Arg Arg Asp Tyr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10

5  
 <210> 187  
 < 211> 12  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 187  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

10  
 <210> 188  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

15  
 <400> 188  
 Gly Ala Ser Gly Arg Ala Thr  
 1 5

20  
 <210> 189  
 < 211> 8  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 189  
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr  
 1 5

25  
 <210> 190  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 190  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

30  
 <210> 191  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 191  
 Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asp Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

35  
 <210> 192  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 192  
 Glu Gly Ile Ala Val Ala Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1 5 10 15  
  
 <210> 193  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 193  
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp Tyr Asp Val His  
 1 5 10  
  
 <210> 194  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 194  
 Asp Tyr Ser Asn Arg Pro Ser  
 1 5  
  
 <210> 195  
 < 211> 12  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 195  
 Gln Ser Tyr Asp Asn Ser Leu Ser Gly Tyr Val Val  
 1 5 10  
  
 <210> 196  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 196  
 Ser Tyr Trp Ile Gly  
 1 5  
  
 <210> 197  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 197  
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 <210> 198  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 198  
 Gln Gly Glu Ser Phe Asp Tyr  
 1 5

5  
 <210> 199  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 199  
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His  
 1 5 10

10  
 <210> 200  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 200  
 Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser  
 1 5

15  
 <210> 201  
 < 211> 10  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20  
 <400> 201  
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Val Ile  
 1 5 10

<210> 202  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25  
 <400> 202  
 Thr Tyr Trp Ile Gly  
 1 5

30  
 <210> 203  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 203  
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

35  
 <210> 204  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 204  
 Gln Gly Ile Ala Phe Asp Tyr  
 1 5

5  
 <210> 205  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 205  
 Lys Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15

10  
 <210> 206  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 206  
 Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

15  
 <210> 207  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20  
 <400> 207  
 Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 208  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25  
 <400> 208  
 Gly Tyr Gly Met His  
 1 5

30  
 <210> 209  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 209  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

35  
 <210> 210  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 210  
 Glu Leu Arg Val Leu  
 1 5  
  
 <210> 211  
 < 211> 16  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 211  
 Lys Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Asn Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15  
  
 10 <210> 212  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 212  
 Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
  
 15 <210> 213  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 213  
 Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Trp Thr  
 1 5  
  
 20 <210> 214  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 25 <400> 214  
 Gly Tyr Gly Met His  
 1 5  
  
 <210> 215  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 30 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 215  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 35 <210> 216  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 216  
 Glu Leu Arg Val Leu  
 1 5

5  
 <210> 217  
 < 211> 13  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 217  
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Asp Met His  
 1 5 10

10  
 <210> 218  
 < 211> 12  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 218  
 Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp  
 1 5 10

15  
 <210> 219  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

20  
 <400> 219  
 Ala Thr Leu Ala Ala Ala Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 220  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

25  
 <400> 220  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

30  
 <210> 221  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 221  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

35  
 <210> 222  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 222  
 Glu Leu Arg Val Leu  
 1 5  
  
 <210> 223  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 10 <400> 223  
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His  
 1 5 10  
  
 <210> 224  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 15 <400> 224  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5  
  
 <210> 225  
 < 211> 11  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 20 <400> 225  
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val  
 1 5 10  
  
 <210> 226  
 < 211> 5  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
  
 25 <400> 226  
 Arg Tyr Asp Met His  
 1 5  
  
 <210> 227  
 < 211> 17  
 < 212> PRT  
 30 < 213> Homo sapiens  
  
 <400> 227  
 Ile Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Pro Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 35 <210> 228  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 228  
 Leu Ala Ala Ala Phe Asp Tyr  
 1 5

5  
 <210> 229  
 < 211> 318  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

<400> 229  
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60  
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120  
 tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180  
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240  
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300  
 agcttcaaca ggggagag 318

10  
 <210> 230  
 < 211> 107  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

<400> 230  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

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

20  
 <210> 231  
 < 211> 318  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens



# ES 2 863 626 T3

<400> 231  
 ggtcagccca aggccaaacc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa 60  
 gccaaacaagg ccacactagt gtgtctgata agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg 120  
 gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180  
 cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240  
 tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300  
 gccctacag aatgttca 318

<210> 232  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 232  
 Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 20 25 30  
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro  
 35 40 45  
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 50 55 60  
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 65 70 75 80  
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 85 90 95  
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

<210> 233  
 <211> 318  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 233  
 ggtcagccca aggctgcccc ctgggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa 60  
 gccaaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120  
 gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180  
 caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240  
 tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300  
 gccctacag aatgttca 318

# ES 2 863 626 T3

<210> 234  
 < 211> 106  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 234  
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
 20 25 30  
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
 35 40 45  
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 50 55 60  
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 65 70 75 80  
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 85 90 95  
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

10

<210> 235  
 < 211> 318  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

<400> 235  
 ggtcagccca aggtgcccc ctggtcact ctgttccac cctcctctga ggagcttcaa 60  
 gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120  
 gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180  
 caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240  
 tcccacaaaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300  
 gccctacag aatgttca 318

15

<210> 236  
 < 211> 106  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 236

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro  
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
65 70 75 80

Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

<210> 237

<211> 318

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 237

ggtcagccca aggctgcccc atcggtcact ctgttcccg cctcctctga ggagcttcaa 60

gccaacaagg ccacactggt gtgcctgac agtgacttct acccgggagc tgtgaaagtg 120

gcctggaagg cagatggcag ccccgtaac acgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180

cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240

tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300

gcccctgcag aatgtgca 318

<210> 238

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 238

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Lys Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro  
35 40 45

Val Asn Thr Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ala  
100 105

<210> 239

<211> 318

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 239

ggtcagccca aggtcgcccc ctcggtcact ctgttcccac cctcctctga ggagcttcaa 60

gccaacaagg ccacactggt gtgtctcgta agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120

gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gtgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180

caaagcaaca acaagtatgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240

tcccacagaa gctacagctg ccgggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300

gcccctgcag aatgctct 318

<210> 240

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

# ES 2 863 626 T3

<400> 240

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Ser Asp  
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro  
35 40 45

Val Lys Val Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Arg Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
100 105

<210> 241

<211> 978

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 241

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc	300
aaatgttgtg tcgagtgcc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc	360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc	480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt	540

# ES 2 863 626 T3

```

gtggtcagcg tcttcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctocaa aaccaaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tccctgtctc cgggtaaa

```

<210> 242  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 242  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 243  
<211> 981  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 243  
gccagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60  
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120  
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180  
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240  
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300  
aaatatgtgc ccccatgccc atcatgcca gcacctgagt tcgagggggg accatcagtc 360

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480  
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540  
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600  
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660  
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720  
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840  
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg 900  
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960  
 ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 244  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 244  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val



# ES 2 863 626 T3

130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
145	150	155
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
	165	170
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
	180	185
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
	195	200
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
	210	215
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
	225	230
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
	245	250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
	260	265
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
	275	280
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
	290	295
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
	305	310
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	325	

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que compite por la unión específica de un anticuerpo que comprende las secuencias descritas en SEQ ID NOs: 94 y 96 a DKK1 humana, en donde el anticuerpo aislado o fragmento del mismo comprende las CDRs de las SEQ ID NOs: 223 a 228.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, que se une a DKK1 humana con una Kd de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1 o 2, que aumenta la densidad mineral ósea en un paciente.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, que comprende tanto una cadena ligera como una pesada del par de secuencias de las SEQ ID NOs: 94 y 96.
- 10 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso como un medicamento.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método para tratar una afección que requiere la reparación ósea.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método para tratar una fractura ósea.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método para tratar la osteoporosis.
- 15 9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde el anticuerpo es 6.147.4 tal como se representa en la Tabla 1.
10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 11. Una combinación de un anticuerpo DKK1 o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un anticuerpo de la esclerostina o fragmento del mismo para uso en un método de acelerar la reparación de la fractura ósea en un sujeto.
12. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos se administran contemporáneamente o en el espacio de un día de la fractura.
- 25 13. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos se administran en el espacio de un día de la fractura.
14. La combinación para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos son componentes de una molécula biespecífica o multi-específica.

FIGURA 1

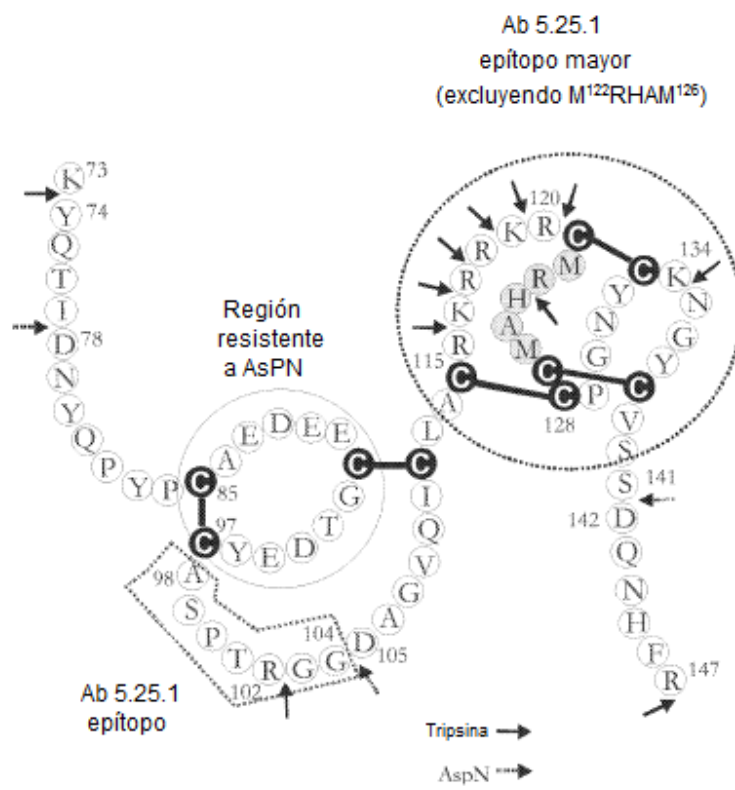


FIGURA 2

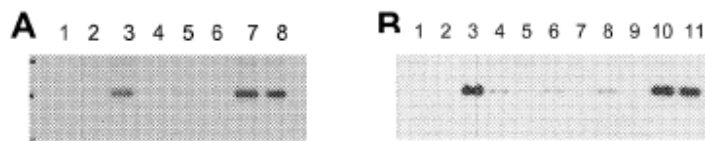


FIGURA 3

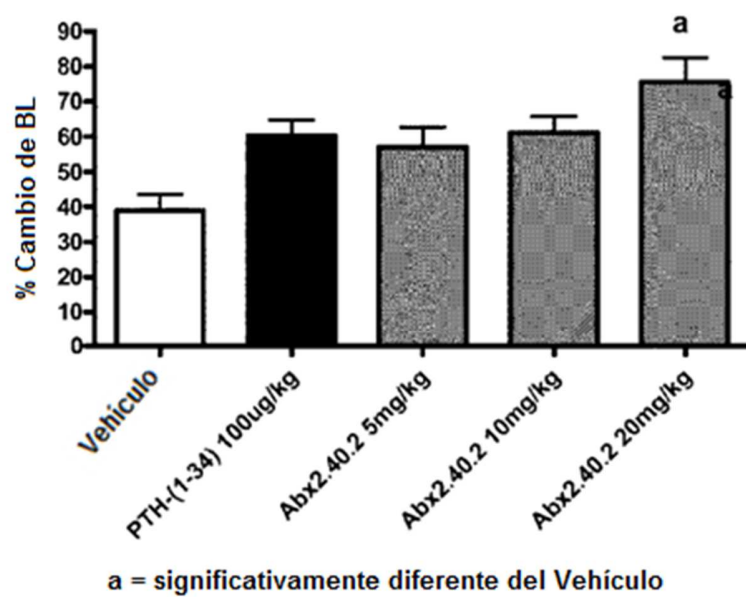


FIGURA 4

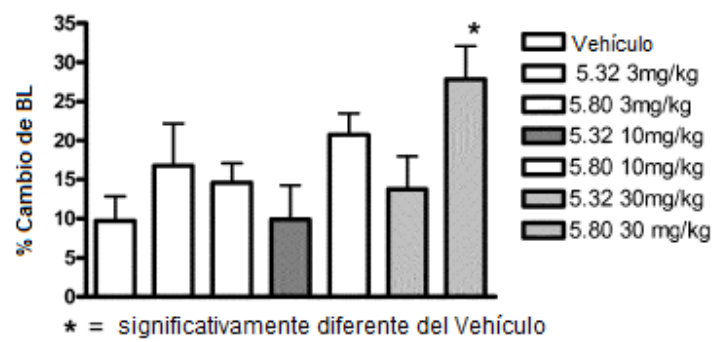


FIGURA 5

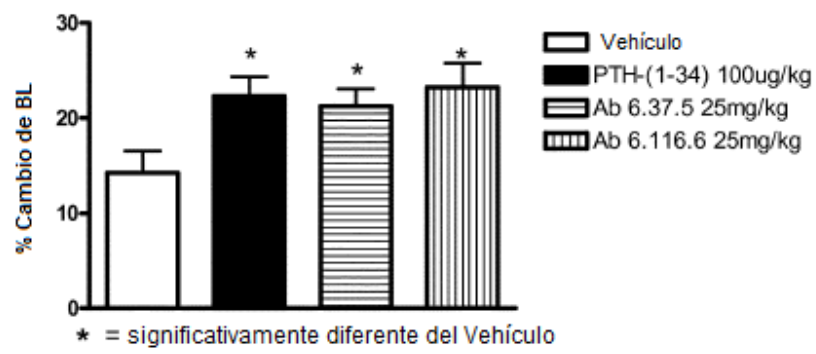


FIGURA 6

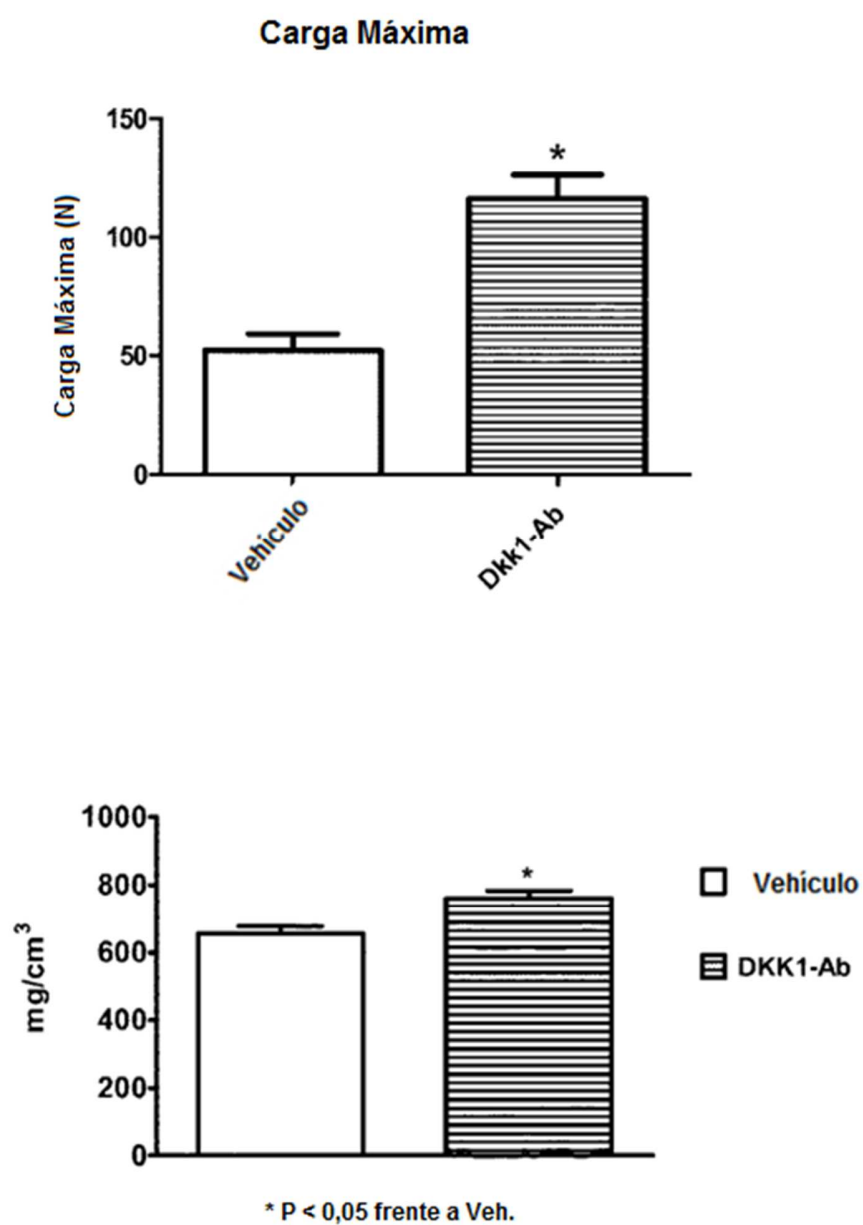




FIGURA 7

