



Organizacion CSA Ltda



INVENTARIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DVN
OK

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-97358

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ANTICUERPO ANTI-ESCLEROSTINA

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

DIRECCIÓN: Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 10 de Septiembre de 2009



No. 09-097358-00000-0000

Fecha: 2009-09-10 16:36:21
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 179

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000141

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center,
Indianápolis, Indiana 46285

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/056527 Fecha Marzo 11, 2008

Publicación Internacional No. WO 2008/115732 Fecha Septiembre 25, 2008

6

Título (54) ANTICUERPO ANTI-ESCLEROSTINA

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395, A61P 19/10, A61P 19/08

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Marzo 20, 2007

(31) Número de Solicitud

60/895,813

9

Comprobante de pago No. 09-67040

Fecha 9 Septiembre de 2009



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 07-128.249



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2008/056527



Andrew Ihor KORYTKO,
4720 Marblehead Bay Drive,
Oceanside, California 92057
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

David Matthew MARQUIS,
2106 Meadowgreen Court,
Encinitas, California 92024
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Eri Michael SMITH,
10782 Charbono Terrace, San Diego,
California 92131
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Barbara Anne SWANSON,
1402 Willowspring Drive North,
Encinitas, California 92024
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-097358-00000-0000

Fecha: 2009-09-10 16:36:21

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 179

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 67,040
FECHA : SEPTIEMBRE 9 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	33886425	08/09/2009	5,498,000.00

***** CONCEPTO *****

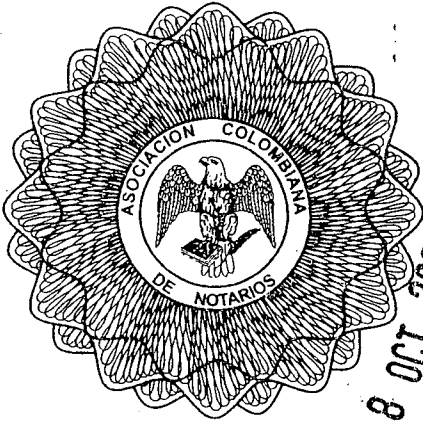
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

WK 9397304



28 OCT. 2008

ESCRITURA PUBLICA NUMERO : (1/2 2 7)

MIL DOSCIENTOS VEINTISIETE

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, a los Veintiocho -- (28) días del mes de Octubre -- -- del año dos mil ocho (2008), ante mi MARIA EUGENIA

ROJAS DE URUETA NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE PODER.-----

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS Y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA.-----

C.C. No. 79.376.996 Y 79.782.747.-----

Comparecieron JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS, mayor de edad vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.376.996 de estado civil casado con sociedad conyugal vigente y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y dijeron: -----

PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cinco (5) folios autenticados, un poder y sus traducciones los cuales son del siguiente tenor: -----

PODER-----

El suscrito ELI LILLY AND COMPANY, domiciliado en Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285 US por medio del

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA VEINTISIETE

presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri, poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de patentes, modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial o extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones y demandas que por motivo de encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultades para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.-----

Firma (ilegible) -----

Fecha 17 July 2003-----

City, Country/ Ciudad, País: Indianápolis, Indiana, United Status of America.- -----

Traduccion oficial del Inglés por Marlén Neira Castro resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia.- -----

APOSTILLA EN PODER DE DE REPRESENTACION DE ELI LILLY AND COMPANY.

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapoles, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Meter G. Stringer, Director Ejecutivo y patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.- -----

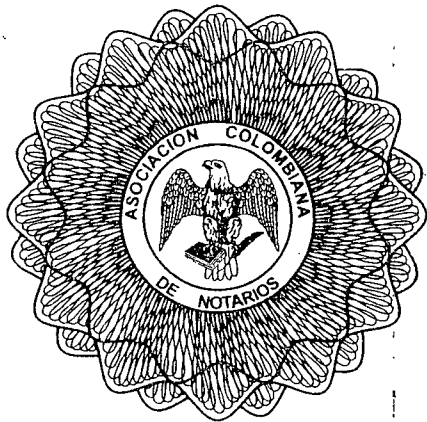
Todd Rokita Secretario de Estado-----

Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana-----

APOSTILLA

(Convencion de la Haya del 5 octubre 1961)

WK 9397305



1. País: Estados Unidos de América
- este documento público -----
2. Ha sido firmado por: Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario de la Corte del Circuito en y para el condado Jonson -----
- 4 Lleva el sello del Secretario de la Corte

del Circuito en y para el estado de Indiana -----

Certificado

5. En: Indianapoles, Indiana -----
6. El: 22 de julio de 2003.-----
7. Por el Secretario de Estado de Indiana 8 No. A2003-1279-----
9. Gran Sello del Estado de Indiana -----
10. Firma ilegible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana
- * Vigente desde el 1 de mayo de 2003, todas las apostillas de Secretario y de Estado de Indiana tienen el sello impreso electrónicamente -----
- The Statehouse, Indianapoles, Indiana 46204, (307) 232-6531, fax (317) 233-3283-----

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario Catherine Michel certifica que Meter G. Stringer, domiciliado en 7620 Castleton Faros, West Drive Indianápolis, Indiana- 46256 Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianápolis, Indiana, Estados Unidos.-----

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial inglés-Español- Inglés-----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.- -----

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento: Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder

NOTARIA VENTURISTA
MARIA REGINA ROLAS DE URUELA

otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité Ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.-----

Firma del notario público Catherine Michel certifica sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008- residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana.-----

Es traducción fiel de inglés, con copia archivo para confrontación, Bogotá 28 de julio-2003.-----

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial Inglés-Español- Inglés -----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.-----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

Se advierte que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.-----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -----

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).-----

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento: Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.

Firma del notario público Catherine Michel certifica

Sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008 - residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana

--

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 28 de julio-2003.

Marlen Neira C



MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents, Utility Models and Industrial Designs** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma

Date/Fecha: 17 July 2003

City, Country/Ciudad, País: Indianapolis, Indiana, United States of America

Poder

El suscrito,

ELI LILLY AND COMPANY

domiciliado en

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de **Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

NOTARIA VERIFICADA
17 JUL 2003
Bogotá, D.C.



Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA

APOSTILLE

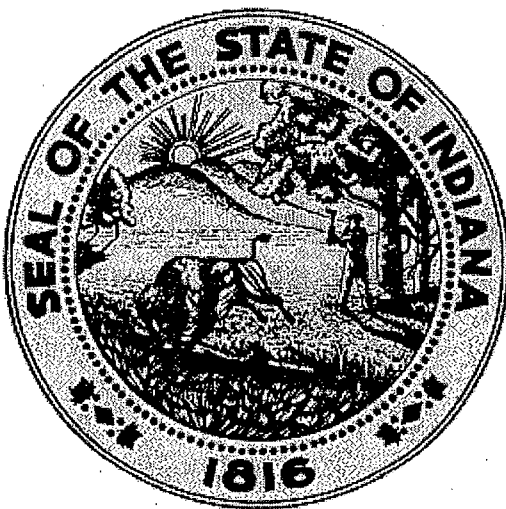
(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Catherine Michel*
3. acting in the capacity of circuit court clerk in & for *Johnson County*
4. and bears the seal/stamp of circuit court clerk in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Twenty-second day of July, 2003*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. *A2003- 11279*
9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Todd Rokita

Indiana Secretary of State

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, Fax (317) 233-3283

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,

/ 7 July 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

7620 Castleton Farms, West Drive,
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Executive Director, International
Patents
of ELI LILLY AND COMPANY

3. That ELI LILLY AND COMPANY
having its principal place of business located in
Indianapolis, Indiana, United States of
America

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Delegation of Authority Concerning Certain
Patent Matters, executed January 20, 2003;
pursuant to the authority granted to the
General Counsel of the Company by the
executive Committee of the Board of
Directors of Eli Lilly and Company

NOTARY PUBLIC (Signature):



Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Peter G. Stringer

mayor de edad y domiciliado

Indianapolis, Indiana 46256 US
suscibió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de

de

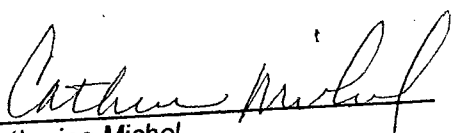
4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

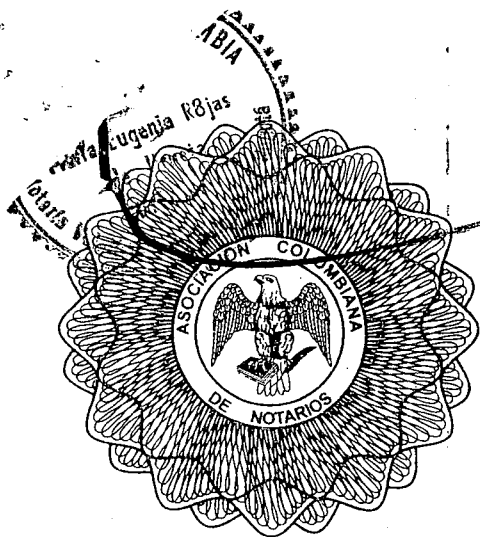
4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARIA VENTISSETE
MARIA EUGENIA ROIDS DE LLUENA


Catherine Michel
My Commission Expires October 21, 2008
Resident of Johnson County

WK 9397306



ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y
AUTORIZACION.- Leído el presente
instrumento por el (los) compareciente
(s) y advertido (s) sobre las
formalidades legales, lo aprueban y
firman conmigo y ante mí la(el)
Notaria(o) quién lo autoriza. ---Se

utilizaron las hojas de papel Notarial Nos. WK 9397304, WK 9397305 Y
WK 9397306 .

DERECHOS LEGALES: \$ 39.630.00

RESOLUCION 8850 DE 2007

IVA \$ 10.781.00

James Ian Raisbeck Llínas

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS

C.C.No. 79.376.996 BOGOTA

TEL: 601-7700

Carlos Reinaldo Olarte Garcia

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

C.C.No. 79.782.747 BOGOTA.

TEL: 601-7700

Maria Eugenia Rojas de Urqueta

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOG

redb.



Es fiel y Segunda (2ª)
fotocopia de la Escritura Pública No. 1-227
de fecha 28 de Octubre de 2008
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 28 OCT 2008
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá



ESPACIO EN BLANCO

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
25 September 2008 (25.09.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/115732 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/056527 ✓

(22) International Filing Date: 11 March 2008 (11.03.2008) ✓

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/895,813 ✓ 20 March 2007 (20.03.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **KORYTKO**, Andrew, Ihor [US/US]; 4720 Marblehead Bay Drive, Occanside, California 92057 (US); **MARQUIS**, David, Matthew [US/US]; 2106 Meadowgreen Court, Encinitas, California 92024 (US); **SMITH**, Eric, Michael [US/US]; 10782 Charbono Terrace, San Diego, California 92131 (US); **SWANSON**, Barbara, Anne [US/US]; 1402 Wilowspring Drive North, Encinitas, California 92024 (US).

(74) Agents: **COHEN**, Charles, E. et al.; Eli Lilly And Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
11 December 2008

(54) Title: ANTI-SCLEROSTIN ANTIBODIES

(57) Abstract: Humanized and chimeric antibodies are provided that specifically bind human sclerostin and are characterized as having high affinity and strong neutralizing properties. The antibodies of the invention are useful for increasing bone mass, bone mineral density and bone strength and for the treatment of various disorders, e.g., osteoporosis, in human subject.

WO 2008/115732 A3

-1-

ANTI-SCLEROSTIN ANTIBODIES

The present invention is in the field of medicine, particularly in the field of antibodies directed against sclerostin. More specifically the invention relates to high affinity antibodies that specifically bind human sclerostin and therapeutic use of the antibodies for various disorders or conditions in human subjects which benefit from an increase in at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength.

Osteoporosis is a disease in which bone mineral density (BMD) is reduced, bone microarchitecture is disrupted and osteoporotic bones are at high risk of fracture. Osteoporosis remains a major cause of long term disability and mortality, particularly among the elderly. While effective treatments for osteoporosis exist in the form of lifestyle modification and pharmacotherapy, the currently available therapies are limited in number and efficacy, are often associated with undesirable side effects and are not universally acceptable to patients. A number of antiresorptive agents including calcitonin, bisphosphonates, estrogen replacement and selective estrogen receptor modulators (SERMs) prevent further bone loss, but they do not rebuild bone once it has been lost. An anabolic agent which increases bone mass and bone mineral density and restores bone architecture is available in the form of human PTH(1-34). However, this therapeutic agent requires daily subcutaneous injection, often for a year or more, resulting in less than complete patient compliance.

Sclerostin, the SOST gene product, is strongly expressed in osteocytes within bone. Due to its role as a potent negative regulator of bone formation, sclerostin is a desirable target for therapeutic intervention for disorders or conditions which would benefit from an increase in at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content and bone strength, e.g., osteoporosis. Therefore, anti-sclerostin antibodies may prove useful as an anabolic approach for treating such disorders or conditions. PCT International Publication No. WO 2006/119107 discloses amino acid sequences of particular humanized anti-sclerostin antibodies in which all of the CDRs are entirely murine, i.e., not altered from the CDRs of an antibody generated in a mouse.

There is a need for an alternative anti-sclerostin antibody which binds human sclerostin with a strong binding affinity and has a low IC_{50} value in a sclerostin

-2-

bioactivity assay. Such an antibody would be predicted to be more therapeutically efficacious, particularly for osteoporosis, and require less frequent dosing than does PTH(1-34) or an anti-sclerostin antibody with a lesser binding affinity (i.e., a higher K_D) or a higher IC_{50} value. There is also a need for an antibody specific to human sclerostin wherein there is a decreased risk of an immune response to the antibody evoked by a human subject administered the antibody or a decreased risk of instability while the antibody's properties of having a high binding affinity for human sclerostin and a low IC_{50} value in a bioactivity assay are maintained. The anti-sclerostin antibodies of the present invention satisfy these needs and provide related advantages.

10 Antibodies of the invention are chimeric or humanized monoclonal antibodies, comprise a specific polypeptide sequence disclosed herein, specifically bind human sclerostin with a high binding affinity and can be used to increase at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content and bone strength in a mammal, preferably a human.

15 In one embodiment, at least one CDR in an antibody of the invention differs in amino acid sequence from the CDR at that position present in a parent antibody, i.e., the antibody generated in a rodent (e.g., a mouse), from which the variant antibody, i.e., humanized or chimeric antibody of the invention, was derived. Preferably, such amino acid substitution(s) in a CDR sequence of an antibody of the invention results in a greater
20 binding affinity (i.e., lower K_D) with human sclerostin, a lower IC_{50} in a sclerostin bioactivity assay, or both, than present in the parent antibody. An amino acid substitution in a CDR sequence of an antibody of the invention from that present in the CDR of the parent antibody may result in a decreased immunogenic response to the antibody by a human administered the antibody. Furthermore, an amino acid substitution in a CDR
25 sequence of an antibody of the invention from that present in the CDR of the parent antibody may decrease the risk of instability of the antibody, e.g., by substitution of an asparagine residue with a different amino acid thereby decreasing the risk of deamidation.

 In one embodiment, an antibody of the invention specifically binds human sclerostin and comprises six CDR regions with amino acid sequences selected from the
30 group consisting of (i) HCDR1 with SEQ ID NO: 20, HCDR2 with SEQ ID NO: 21, HCDR3 with SEQ ID NO: 22, LCDR1 with SEQ ID NO: 23, LCDR2 with SEQ ID NO: 24, and LCDR3 with SEQ ID NO: 25; (ii) HCDR1 with SEQ ID NO: 26, HCDR2 with

cl

-3-

SEQ ID NO: 27, HCDR3 with SEQ ID NO: 28, LCDR1 with SEQ ID NO: 29, LCDR2 with SEQ ID NO: 30, and LCDR3 with SEQ ID NO: 31; and (iii) HCDR1 with SEQ ID NO: 32, HCDR2 with SEQ ID NO: 33, HCDR3 with SEQ ID NO: 34, LCDR1 with SEQ ID NO: 35, LCDR2 with SEQ ID NO: 36, and LCDR3 with SEQ ID NO: 37.

5 In another embodiment, an antibody of the invention specifically binds human sclerostin and comprises a heavy chain variable region ("HCVR") polypeptide and a light chain variable region ("LCVR") polypeptide wherein (i) the HCVR has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 and the LCVR has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17; (ii) the HCVR has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 and the LCVR
10 has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18; or (iii) the HCVR has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16 and the LCVR has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19.

In another embodiment, an antibody of the invention specifically binds human sclerostin and comprises a heavy chain polypeptide and a light chain polypeptide
15 wherein, (i) the heavy chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 and the light chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; (ii) the heavy chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 and the light chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6; or (iii) the heavy chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 and the light chain
20 polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7.

In one embodiment, antibodies of the invention as defined herein, preferably defined with a SEQ ID number, are further characterized as having a binding affinity (K_D) for human sclerostin of about 10 pM or less at 25°C. Preferred antibodies of the invention have a K_D for cynomolgous monkey sclerostin of about 100 pM or less at
25 25°C. More preferred antibodies of the invention have a binding affinity for human sclerostin of about 10 pM or less at 25°C and a binding affinity for cynomolgous monkey sclerostin of about 100 pM or less at 25°C.

In another embodiment, antibodies of the invention as defined herein, preferably defined with a SEQ ID number, are characterized by having an IC_{50} of 50 nM or less in a
30 bone specific alkaline phosphatase assay using human sclerostin. Preferably these antibodies also have a K_D for human sclerostin of about 10 pM or less at 25°C. More



-4-

preferably these antibodies have a K_D for human sclerostin of about 10 pM or less at 25°C and a K_D for cynomolgous monkey sclerostin of about 100 pM or less at 25°C.

In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising an antibody of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier or
5 diluent. Preferably the pharmaceutical composition comprises a homogeneous or substantially homogeneous population of a monoclonal antibody of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

The invention embodies the use of an antibody of the invention for the preparation of a medicament. The invention further embodies the use of an antibody of the invention
10 in a method for increasing at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength in an animal, preferably a mammalian species, more preferably a human subject.

The invention further provides a method of increasing at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength that comprises administering
15 to a human subject in need thereof, an effective amount of an antibody of the invention.

One embodiment of the invention provides a method for treating a disease, condition or disorder, in a human subject, which benefits from an increase in at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength, including, e.g., osteoporosis, osteopenia, osteoarthritis, pain associated with osteoarthritis,
20 periodontal disease and multiple myeloma.

The invention further embodies a method for detecting sclerostin protein in a biological sample, comprising incubating an antibody of the invention with the biological sample under conditions and for a time sufficient to permit said antibody to bind to sclerostin protein, and detecting said binding. A preferred antibody for use in such
25 detection assay has a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 40 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 41; a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 42, and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 43; a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 2 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 5; a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 3 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 6; or a heavy chain
30 polypeptide with SEQ ID NO: 4 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 7.

The invention further provides isolated nucleic acid molecules encoding an antibody of the invention; a vector comprising that nucleic acid, optionally operably-

6

-5-

linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector; a host cell comprising that vector; a process for producing an antibody of the invention comprising culturing the host cell so that the nucleic acid is expressed and, optionally, recovering the antibody from the host cell culture medium.

- 5 The invention presents antibodies that specifically bind human sclerostin, neutralize or antagonize at least one human sclerostin bioactivity *in vitro* or *in vivo* and further exhibit a strong binding affinity with human sclerostin.

 When used herein, the term "sclerostin" refers to the full-length human protein with the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 or to the mature form of the
10 protein with the signal sequence removed.

 The term "antibody," in reference to an anti-sclerostin antibody of the invention (or simply, "antibody of the invention"), as used herein, refers to a monoclonal antibody. A "monoclonal antibody" as used herein refers to a chimeric antibody or a humanized antibody, unless otherwise indicated. Monoclonal antibodies of the invention can be
15 produced using *e.g.*, recombinant technologies, phage display technologies, synthetic technologies, *e.g.*, CDR-grafting, or combinations of such technologies or other technologies readily known in the art. "Monoclonal antibody" refers to an antibody that is derived from a single copy or clone, including *e.g.*, any eukaryotic, prokaryotic, or phage clone, and not the method by which it is produced.

20 A "monoclonal antibody" or "antibody of the invention" or simply "antibody" can be an intact antibody (comprising a complete or full length Fc region), or a portion or fragment of an antibody comprising an antigen-binding portion, *e.g.*, a Fab fragment, Fab' fragment, or F(ab')₂ fragment of a chimeric or humanized antibody. Particularly preferred antigen-binding fragments of an antibody of the invention retain the ability to
25 inhibit or neutralize one or more bioactivities characteristic of a mammalian sclerostin *in vivo* or *in vitro*. For example, in one embodiment, an antigen-binding portion of an antibody of the invention can inhibit the interaction of mature human sclerostin with one or more of its ligands and/or can inhibit one or more receptor-mediated functions of human sclerostin.

30 Furthermore, a "monoclonal antibody" or "antibody of the invention" or simply "antibody" as used herein can be a single chain Fv fragment that may be produced by joining the DNA encoding the LCVR and HCVR with a linker sequence. (See, Pluckthun,

-6-

The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp 269-315, 1994). It is understood that regardless of whether antigen-binding fragments or portions are specified, the term "antibody" as used herein includes such fragments or portions as well as single chain forms, unless indicated
5 otherwise. As long as the protein retains the ability to specifically bind sclerostin, it is included within the term "antibody."

The term "specifically binds" as used herein refers to the situation in which one member of a specific binding pair does not significantly bind to molecules other than its specific binding partner(s) as measured by a technique available in the art, e.g.,
10 competition ELISA, BIACORE® assay or KINEXA® assay. The term is also applicable where e.g., an antigen-binding domain of an antibody of the invention is specific for a particular epitope that is carried by a number of antigens, in which case the antibody carrying the antigen-binding domain will be able to specifically bind to the various antigens carrying the epitope. The term "epitope" refers to that portion of a molecule
15 capable of being recognized by and bound by an antibody at one or more of the antibody's antigen-binding regions.

The phrase "bioactivity," in reference to an antibody of the invention, includes, but is not limited to, epitope or antigen binding affinity, ability to neutralize or antagonize a bioactivity of sclerostin *in vivo* or *in vitro*, IC₅₀ in a bone specific alkaline phosphatase
20 assay (e.g., as described in Example 2 herein) or other *in vitro* activity assay, the *in vivo* and/or *in vitro* stability of the antibody and the immunogenic properties of the antibody, e.g., when administered to a human subject. The aforementioned properties or characteristics can be observed or measured using art-recognized techniques including, but not limited to, ELISA, competitive ELISA, surface plasmon resonance analysis, *in*
25 *vitro* and *in vivo* neutralization assays without limit, receptor binding and immunohistochemistry with tissue sections from different sources including human, primate, or any other source as the need may be.

The phrase "bioactivity" in reference to sclerostin, includes, but is not limited to, specific binding of sclerostin to another protein (e.g., a receptor or TGF- β family
30 member), one or more receptor-mediated functions of human sclerostin, signal transduction, immunogenic properties, *in vivo* or *in vitro* stability, affecting the levels or

-7-

activity of another protein *in vivo* or *in vitro* (see e.g., Example 2), sclerostin expression levels and tissue distribution.

The term "inhibit" or "neutralize" as used herein with respect to a bioactivity of an antibody of the invention means the ability to substantially antagonize, prohibit, prevent, restrain, slow, disrupt, eliminate, stop, reduce or reverse a bioactivity of sclerostin (e.g., as measured in example 2 herein).

The term "Kabat numbering" as used herein is recognized in the art and refers to a system of numbering amino acid residues which are more variable (*i.e.*, hypervariable) than other amino acid residues in the heavy and light chain regions of an antibody (Kabat, *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971); Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)). The positioning of CDRs in the variable region of an antibody follows Kabat numbering or simply, "Kabat."

A polynucleotide is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another polynucleotide. For example, a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence.

The terms "subject," and "patient," used interchangeably herein, refer to a mammal, preferably a human. In a certain embodiment, the subject is further characterized with a disease or disorder or condition that would benefit from a decreased level of sclerostin or decreased bioactivity of sclerostin.

The term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been operably linked including, but not limited to, plasmids and viral vectors. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced while other vectors can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby, are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operably linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply "expression vectors"). Exemplary vectors are well known in the art.

As used herein, the expressions "cell," "host cell," and "cell culture" are used interchangeably and include an individual cell or cell culture that is a recipient of any isolated polynucleotide of the invention or any recombinant vector(s) comprising a

10

-8-

nucleotide sequence encoding a HCVR, LCVR or antibody of the invention. A host cell includes cells transformed, transduced or infected with one or more recombinant vectors or a polynucleotide expressing a monoclonal antibody of the invention or a light chain or heavy chain thereof.

- 5 Each heavy chain of a full-length antibody is comprised of an N-terminal heavy chain variable region (herein "HCVR") and a heavy chain constant region. Each light chain of a full-length antibody is comprised of an N-terminal light chain variable region (herein "LCVR") and a light chain constant region. The HCVR and LCVR regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity
- 10 determining regions ("CDRs"), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions ("FR"). The functional ability of an antibody to bind a particular antigen or epitope is largely influenced by the six CDRs present in the variable region of the antibody. Each HCVR and LCVR is composed of three CDRs (HCDR1, HCDR2 and HCDR3 in the HCVR and LCDR1, LCDR2 and LCDR3 in the LCVR) and four FRs,
- 15 arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The CDRs contain most of the residues which form specific interactions with the antigen. CDR positioning within the variable region follows Kabat.

- Light chains are classified as kappa or lambda and characterized by a particular
- 20 constant region as known in the art. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE, respectively and several of these may be further divided into subclasses e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄. Each heavy chain type is characterized by a particular constant region with a sequence readily known in the art. Light chain constant region kappa and heavy chain
- 25 constant regions IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ are preferred constant regions in the antibodies of the invention. More preferably, the heavy chain constant region comprises a polypeptide with an amino acid sequence of SEQ ID NO: 38 as encoded by a polynucleotide with SEQ ID NO: 39. Chimeric antibodies may have constant regions of non-human origin, preferably rat or murine.

- 30 As used herein, the "antigen-binding region" or "antigen-binding portion" refers to that portion of an antibody molecule, within the variable region, which contains the amino acid residues that interact with an antigen and confer on the antibody its specificity

-9-

and affinity for the antigen. This antibody portion includes the framework amino acid residues necessary to maintain the proper conformation of the antigen-binding residues.

A preferred antibody of the invention comprises six CDRs with amino acid sequences of SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 24 and 25. Another preferred antibody of the invention comprises six CDRs with amino acid sequences of SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36 and 37. A more preferred antibody of the invention comprises six CDRs with amino acid sequences of SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30 and 31. The CDRs of these preferred antibodies exist in the position as stated in Table 1 below. The CDRs are positioned in the variable region according to Kabat.

10 A preferred antibody of the invention comprises a LCVR with the amino acid sequence of SEQ ID NO 17, 18 or 19. Other preferred monoclonal antibodies of the invention comprise a HCVR with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14, 15 or 16. More preferably an antibody of the invention comprises a LCVR of SEQ ID NO: 17 and a HCVR of SEQ ID NO: 14. An alternative antibody of the invention comprises a LCVR
15 of SEQ ID NO: 19 and a HCVR of SEQ ID NO:16. A more preferred antibody of the invention comprises a LCVR of SEQ ID NO: 18 and a HCVR OF SEQ ID NO: 15. Such LCVRs are preferably linked to a light chain constant region, preferably of human origin, preferably a kappa chain. Such HCVRs are preferably operably-linked to a heavy chain constant region, preferably of human origin, preferably IgG₁ or IgG₄, most preferably a
20 heavy chain constant region comprising the sequence of SEQ ID NO:38.

One preferred antibody of the invention comprises a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 2 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 5. The heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 2 may be encoded, e.g., by a polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 8, the light chain polypeptide with SEQ ID NO: 5 may be encoded, e.g., by
25 a polynucleotide of SEQ ID NO: 11.

Another preferred antibody of the invention comprises a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 4 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 7. The heavy chain polypeptide with SEQ ID NO:4 may be encoded, e.g., by a polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 10, the light chain polypeptide with SEQ ID NO: 7 may be encoded, e.g., by
30 a polynucleotide of SEQ ID NO: 13.

Another preferred antibody of the invention comprises a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 3 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 6. The heavy chain

-10-

polypeptide with SEQ ID NO:3 may be encoded by a polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 9, the light chain polypeptide with SEQ ID NO: 6 may be encoded by a polynucleotide of SEQ ID NO: 12.

The preferred humanized antibodies of the invention are referred to herein as 86, 88 and 89. The SEQ ID NOs of their sequences are as listed in Table 1 below.

Table 1 – Protein SEQ ID NOs

Antibody	Heavy Chain	Light Chain	HCVR	Heavy CDR1	Heavy CDR2	Heavy CDR3	LCVR	Light CDR1	Light CDR2	Light CDR3
86	2	5	14	20	21	22	17	23	24	25
88	3	6	15	26	27	28	18	29	30	31
89	4	7	16	32	33	34	19	35	36	37

Preferably an antibody of the invention wherein all six CDRs, the HCVR, the LCVR, the HCVR and the LCVR, the entire heavy chain, the entire light chain, or the entire heavy chain and the entire light chain are limited by a particular sequence as shown by a SEQ ID NO herein (see, e.g., Table 1) is further characterized by having a K_D for human sclerostin at 25°C of less than about 10 pM, 8 pM, 6 pM or 4 pM, more preferably less than about 2.2 pM. Additionally, it is preferred that such antibody is further limited by having a K_D for cynomolgous monkey sclerostin at 25°C of less than about 100 pM, 90 pM or 80 pM, or more preferably less than about 75 pM.

Preferably an antibody of the invention wherein all six CDRs, the HCVR, the LCVR, the HCVR and the LCVR, the entire heavy chain, the entire light chain, or the entire heavy chain and the entire light chain are limited by a particular sequence as shown by a SEQ ID NO herein is further characterized by having an IC_{50} in a bone specific alkaline phosphatase assay using human sclerostin (see, e.g., Example 2 herein) of about 50 nM or less, about 40, 35, or 30 nM or less, more preferably about 25 nM, even more preferably about 20 nM (e.g., 20.2 nM) or less.

More preferably, an antibody of the invention wherein all six CDRs, the HCVR, the LCVR, the HCVR and the LCVR, the entire heavy chain, the entire light chain, or the entire heavy chain and the entire light chain are limited by a particular sequence as shown by a SEQ ID NO herein is further characterized by having a K_D for human sclerostin at 25°C or less than about 10 pM, 8 pM, 6 pM or 4 pM, more preferably less than about 2.2 pM, and is also characterized by having an IC_{50} in a bone specific alkaline phosphatase

-11-

assay using human sclerostin of about 50 nM or less, about 40, 35, or 30 nM or less, more preferably about 25 nM or less, even more preferably about 20 nM (e.g., 20.2 nM) or less.

Even more preferably, an antibody of the invention wherein all six CDRs, the HCVR, the LCVR, the HCVR and the LCVR, the entire heavy chain, the entire light chain, or the entire heavy chain and the entire light chain are limited by a particular sequence as shown by a SEQ ID NO herein is further characterized by having a K_D for human sclerostin at 25°C or less than about 10 pM, 8 pM, 6 pM or 4 pM, more preferably less than about 2.2 pM; is also characterized by having an IC_{50} in a bone specific alkaline phosphatase assay using human sclerostin of about 50 nM or less, about 40, 35, or 30 nM or less, more preferably about 25 nM or less, even more preferably about 20 nM (e.g., 20.2 nM) or less; and is also characterized by having an IC_{50} in a bone specific alkaline phosphatase assay using cynomolgous monkey sclerostin of about 75 nM or less.

15 Antibody Expression

The present invention is also directed to host cells that express an anti-sclerostin antibody of the invention. Creation and isolation of host cell lines producing an antibody of the invention can be accomplished using standard techniques known in the art.

A wide variety of host expression systems known in the art can be used to express an antibody of the present invention including prokaryotic (bacterial) and eukaryotic expression systems (such as yeast, baculovirus, plant, mammalian and other animal cells, transgenic animals, and hybridoma cells), as well as phage display expression systems.

An antibody of the invention can be prepared by recombinant expression of immunoglobulin light and heavy chain genes in a host cell. To express an antibody recombinantly, a host cell is transformed, transduced, infected or the like with one or more recombinant expression vectors carrying DNA fragments encoding the immunoglobulin light and/or heavy chains of the antibody such that the light and/or heavy chains are expressed in the host cell. The heavy chain and the light chain may be expressed independently from different promoters to which they are operably linked in one vector or, alternatively, the heavy chain and the light chain may be expressed independently from different promoters to which they are operably linked in two vectors

-12-

– one expressing the heavy chain and one expressing the light chain. Optionally the heavy chain and light chain may be expressed in different host cells.

Additionally, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the anti-sclerostin antibody light and/or heavy chain from a host cell. The anti-sclerostin antibody light and/or heavy chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is operably linked in-frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide. Preferably, the recombinant antibodies are secreted into the medium in which the host cells are cultured, from which the antibodies can be recovered or purified.

An isolated DNA encoding a HCVR region can be converted to a full-length heavy chain gene by operably linking the HCVR-encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions. The sequences of human, as well as other mammalian, heavy chain constant region genes are known in the art. DNA fragments encompassing these regions can be obtained *e.g.*, by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be of any type, (*e.g.*, IgG, IgA, IgE, IgM or IgD), class (*e.g.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃ and IgG₄) or subclass constant region and any allotypic variant thereof as described in Kabat (*supra*). A preferred heavy chain constant region comprises the polypeptide of SEQ ID NO:38.

An isolated DNA encoding a LCVR region may be converted to a full-length light chain gene (as well as to a Fab light chain gene) by operably linking the LCVR-encoding DNA to another DNA molecule encoding a light chain constant region. The sequences of human, as well as other mammalian, light chain constant region genes are known in the art. DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region.

Preferred mammalian host cells for use in the invention are CHO cells (*e.g.*, ATCC CRL-9096), NS0 cells, SP2/0 cells and COS cells (ATCC *e.g.*, CRL-1650, CRL-1651), HeLa (ATCC CCL-2). Additional host cells for use in the invention include other mammalian cells, yeast cells and prokaryotic cells. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody

-13-

into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the host cell and/or the culture medium using standard purification methods.

Once expressed, the intact antibodies, individual light and heavy chains, or other immunoglobulin forms of the present invention can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, ion exchange, affinity, reverse phase, hydrophobic interaction column chromatography, gel electrophoresis and the like. Substantially pure immunoglobulins of at least about 90%, 92%, 94% or 96% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the sterile antibodies may then be used therapeutically, as directed herein.

Humanized Antibody

Preferably an antibody of the invention to be used for therapeutic purposes, has the sequence of the framework and constant region (to the extent it exists in the antibody) derived from the mammal in which it would be used as a therapeutic so as to decrease the possibility that the mammal would illicit an immune response against the therapeutic antibody. Humanized antibodies are of particular interest since they are valuable for therapeutic application and diminish the likelihood of a human anti-mouse antibody response frequently observed with antibodies of murine origin or antibodies comprising portions which are of murine origin when administered to a human subject. Preferably injected humanized antibodies may have a half-life more like that of naturally occurring human antibodies than do e.g., murine antibodies, thereby allowing smaller and less frequent doses to be administered to a subject.

The term "humanized antibody" as used herein refers to an antibody wherein at least one portion is of human origin. For example, the humanized antibody can comprise portions derived from an antibody of nonhuman origin, such as a mouse, and portions derived from an antibody of human origin, joined together, e.g., chemically by conventional techniques (e.g., synthetic) or prepared as a contiguous polypeptide using genetic engineering techniques.

Preferably, a "humanized antibody" has CDRs that originate from or are derived from a parent antibody, i.e., a non-human antibody (preferably a mouse monoclonal antibody), while framework and constant region, to the extent it is present, (or a

-14-

significant or substantial portion thereof, *i.e.*, at least about 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99%) are encoded by nucleic acid sequence information that occurs in the human germline immunoglobulin region (see, e.g., the International ImMunoGeneTics Database) or in recombined or mutated forms thereof whether or not said antibodies are produced in a human cell. Preferably, at least two, three, four, five or six CDRs of a humanized antibody are optimized from the CDRs of a non-human parent antibody from which the humanized antibody was derived, to generate a desired property, e.g., improved specificity, affinity or neutralization, which may be identified by a screening assay, e.g., an ELISA assay. Preferably an optimized CDR in an antibody of the invention comprises at least one amino acid substitution when compared to that present in the parent antibody. Certain amino acid substitutions in the CDRs of humanized antibodies 88 and 89 of the invention as compared to those of parent antibodies 788 and 789 (see examples 5 and 6 herein) decrease the likelihood of instability of the antibody (e.g., removal of CDR Asn residues) or decrease the likelihood of immunogenicity of the antibody when administered to a human subject (e.g., as predicted by IMMUNOFILTERTM Technology).

Humanized antibodies preferably contain minimal sequence derived from a non-human antibody. Humanized antibodies may comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the CDR or framework sequences imported from the parent antibody. Humanized antibodies may be subjected to *in vitro* mutagenesis using methods of routine use in the art and, thus, the framework region amino acid sequences of the HCVR and LCVR regions of the humanized recombinant antibodies are sequences that, while derived from those related to human germline HCVR and LCVR sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*. It is contemplated that such amino acid sequences of the HCVR and LCVR framework regions of the humanized recombinant antibodies are at least 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 98% or more preferably at least 99% or most preferably 100% identical to a human germline sequence.

In preferred embodiments, a humanized antibody of the present invention comprises human germline light chain framework sequences (see, e.g., PCT WO 2005/005604) and human germline heavy chain framework sequences (see, e.g., PCT WO 2005/005604). Preferred human germline light chain framework regions are from a



-15-

human kappa light chain gene selected from the group consisting of: A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, L1, L11, L12, L2, L5, L6, L8, O12, O2, and O8. Preferred human germline heavy chain framework regions are from a human heavy chain selected from the group consisting of: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VH1-24, VH1-46,
5 VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VH1-18, VH1-69, VH3-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59, VH5-51 (see, International Publication No. WO2006/046935).

There are multiple methods available in the art to generate humanized antibodies. For example, humanized antibodies may be produced by obtaining nucleic acid sequences
10 encoding the HCVR and LCVR of a parent antibody (e.g., a murine antibody or antibody made by a hybridoma) which specifically binds sclerostin, preferably human sclerostin, identifying the CDRs in said HCVR and LCVR (nonhuman), and grafting such CDR-encoding nucleic acid sequences onto selected human framework-encoding nucleic acid sequences. Optionally, a CDR region may be optimized by mutagenizing randomly or
15 at particular locations in order to substitute one or more amino acids in the CDR with a different amino acid prior to grafting the CDR region into the framework region. Alternatively, a CDR region may be optimized subsequent to insertion into the human framework region using methods available to one of skill in the art.

After the CDR-encoding sequences are grafted onto the selected human
20 framework encoding sequences, the resultant DNA sequences encoding the humanized variable heavy and variable light sequences are then expressed to produce a humanized antibody that binds sclerostin. The humanized HCVR and LCVR may be expressed as part of a whole anti-sclerostin antibody molecule, *i.e.*, as a fusion protein with human constant domain sequences. However, the HCVR and LCVR sequences can also be
25 expressed in the absence of constant sequences to produce a humanized anti-sclerostin Fv.

References further describing methods involved in humanizing a mouse antibody that may be used include *e.g.*, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869, 1991 and the method of Winter and co-workers [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534 (1988)].
30

Diagnostic Uses

-16-

An antibody of the invention may be used to diagnose a disorder or disease associated with the expression of human sclerostin. In a similar manner, the antibody of the invention can be used in an assay to monitor sclerostin levels in a subject being treated for a sclerostin-associated condition. Such applications include methods that
5 utilize an antibody of the invention and a label to detect sclerostin in a biological sample, *e.g.*, in a human body fluid or in a cell or tissue extract (see, *e.g.*, Example 1 herein). Antibodies of the invention may be used with or without modification, and may be labeled by covalent or non-covalent attachment of a detectable moiety.

A variety of conventional protocols for measuring sclerostin levels in a biological
10 sample, including *e.g.*, ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of sclerostin expression. Normal or standard sclerostin levels present in a sample are established using any known technique, *e.g.*, by combining a sample comprising a sclerostin polypeptide with, *e.g.*, an antibody of the invention under conditions suitable to form an antigen:antibody complex. The
15 antibody is directly or indirectly labeled with a detectable substance to facilitate detection of the bound or unbound antibody. Suitable detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials. The amount of a standard complex formed is quantitated by various methods, such as, *e.g.*, photometric means. Amounts of sclerostin polypeptide present in samples
20 are then compared with the standard values.

Therapeutic Uses

Sclerostin functions as a negative regulator of bone formation. (see, *e.g.*, Cytokine & Growth Factor Reviews, 16:319-327, 2005). In adults, sclerostin mRNA is
25 primarily detected in osteocytes although lower concentrations have been found by Applicants in cartilage.

A pharmaceutical composition comprising an anti-sclerostin monoclonal antibody of the invention may be used to increase at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength in either vertebral or non-vertebral bone, or both,
30 when an effective amount is administered to a human subject in need thereof. A pharmaceutical composition comprising an anti-sclerostin monoclonal antibody of the invention may be used to reduce the incidence of fracture of vertebral and/or non-

-17-

vertebral bone, when an effective amount is administered to a human subject in need thereof. Reducing the incidence of fracture includes reducing the likelihood or actual incidence of fracture for a human subject compared to an untreated control population.

Furthermore, an antibody of the invention may be useful for the treatment of
5 conditions, diseases, or disorders wherein the presence of sclerostin causes or contributes to undesirable pathological effects or a decrease of sclerostin levels or sclerostin bioactivity has a therapeutic benefit in human subjects. Such conditions, diseases or disorders include, but are not limited to, osteoporosis, osteopenia, osteoarthritis, pain associated with osteoarthritis, periodontal disease or multiple myeloma. Subjects may be
10 male or female. Preferably a human subject is at risk of fracture of vertebral and/or non-vertebral bone, more preferably a human subject is at risk for, or suffering from, osteoporosis. The human subject is preferably a female and more preferably a female at risk for or having post-menopausal osteoporosis. It is contemplated that the method of the invention can benefit a subject at any stage of osteoporosis.

15 Additionally, the use of an antibody of the invention for use in the manufacture of a medicament for the treatment of at least one of the aforementioned disorders is contemplated.

The terms "treatment" and "treating" are intended to refer to all processes wherein there may be a slowing, interrupting, arresting, controlling, or stopping of the progression
20 of the disorders described herein, but does not necessarily indicate a total elimination of all disorder symptoms. "Treatment", as used herein, includes administration of a compound of the present invention for treatment of a disease or condition in a mammal, particularly in a human, and includes: (a) inhibiting further progression of the disease, i.e., arresting its development; and (b) relieving the disease, i.e., causing regression of the
25 disease or disorder or alleviating symptoms or complications thereof. Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation.

30

Pharmaceutical Composition

-18-

An antibody of the invention can be incorporated into a pharmaceutical composition suitable for administration to a human subject. An antibody of the invention may be administered to a human subject alone or in combination with a pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent in single or multiple doses. Such pharmaceutical compositions are designed to be appropriate for the selected mode of administration, and pharmaceutically acceptable diluents, carrier, and/or excipients such as dispersing agents, buffers, surfactants, preservatives, solubilizing agents, isotonicity agents, stabilizing agents and the like are used as appropriate. Said compositions can be designed in accordance with conventional techniques disclosed in, e.g., Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 which provides a compendium of formulation techniques as are generally known to practitioners. Suitable carriers for pharmaceutical compositions include any material which, when combined with a monoclonal antibody of the invention, retains the molecule's activity and is non-reactive with the subject's immune system.

15 A pharmaceutical composition comprising an anti-sclerostin monoclonal antibody of the present invention can be administered to a subject at risk for or exhibiting pathologies as described herein, e.g., osteoporosis, osteoarthritis or other bone degenerative disorders, using standard administration techniques.

A pharmaceutical composition of the invention preferably contain an "effective amount" of an antibody of the invention. An effective amount refers to an amount necessary (at dosages and for periods of time and for the means of administration) to achieve the desired therapeutic result. An effective amount of the antibody may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. An effective amount or is also one in which any toxic or detrimental effect of the antibody, are outweighed by the therapeutically beneficial effects.

20 An effective amount is at least the minimal dose, but less than a toxic dose, of an active agent which is necessary to impart therapeutic benefit to a subject. Stated another way, an effective amount or therapeutically effective amount of an antibody of the invention is an amount which in mammals, preferably humans, (i) increases at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength, or (ii) treats a condition, disorder or disease wherein the presence of sclerostin causes or contributes to

-19-

an undesirable pathological effect, or (iii) a decrease in sclerostin levels or sclerostin bioactivity results in a beneficial therapeutic effect in a mammal, preferably a human, including, but not limited to osteoporosis, osteopenia, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, periodontal disease or multiple myeloma.

5 As is well known in the medical arts, dosages for any one subject depends upon many factors, including the patient's size, body surface area, age, the particular compound to be administered, sex, time and route of administration, general health, and other drugs being administered concurrently. Dose may further vary depending on the type and severity of the disease. A typical dose can be, for example, in the range of 0.001
10 to 1000 μg ; preferably 1 to 100 μg ; however, doses below or above this exemplary range are envisioned, especially considering the aforementioned factors. A daily parenteral dosage regimen can be about 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to about 20 mg/kg of total body weight, preferably from about 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to about 10 mg/kg . Progress may be monitored by periodic assessment, and the dose adjusted accordingly.

15 These suggested amounts of antibody are subject to a great deal of therapeutic discretion. The key factor in selecting an appropriate dose and scheduling is the result obtained. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the antibody, the particular type of antibody, the method of administration,
20 the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners.

The route of administration of an antibody of the present invention may be oral, parenteral, by inhalation, or topical. Preferably, the antibodies of the invention can be incorporated into a pharmaceutical composition suitable for parenteral administration. The term parenteral as used herein includes intravenous, intramuscular, subcutaneous,
25 rectal, vaginal, or intraperitoneal administration. Parenteral delivery by intravenous or intraperitoneal or subcutaneous injection is preferred. Subcutaneous injection is most preferred. Suitable vehicles for such injections are well known in the art.

The pharmaceutical composition typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage in the container provided, including *e.g.*, a sealed
30 vial, syringe or other delivery device, *e.g.*, a pen. Therefore, pharmaceutical compositions may be sterile filtered after making the formulation, or otherwise made microbiologically acceptable.



-20-

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention.

-21-

EXAMPLES

Example 1 ELISA Assay

This assay is used to detect and quantify sclerostin in human serum samples to a lower detection limit of 0.4 ng/ml. Antibody 86 is the capture antibody, while antibody
5 88 is the detection antibody (see table 1 for antibody sequences).

The inner wells of a 96-well plate are coated with 100 μ l of full-length anti-sclerostin monoclonal antibody 86 at a concentration of 0.5 μ g/mL in 0.5 M sodium carbonate at pH 9.6 ("coating buffer"). The plate is sealed and incubated overnight at 4°C. The plate is then washed three times with TBST "wash buffer" (0.4 M Tris-HCl,
10 3M NaCl, 0.1% Tween 20). Then 200 μ L of casein blocking buffer in PBS (Pierce, #37528) is added per well and the plate is incubated for one hour at room temperature. The plate is then washed twice in wash buffer to remove the blocking solution.

To generate a standard curve, human sclerostin at a concentration of 0.35 mg/mL is prepared in casein blocking buffer and serially diluted two fold (from 1.25 ng/ml to 0
15 ng/ml) in 5% pooled human serum in casein blocking buffer in PBS. The human serum is run over a column of magnetic beads coated with anti-sclerostin monoclonal antibody 86 to remove any sclerostin that may have been endogenously present in the serum.

One hundred microliters of samples (5% serum in casein blocking buffer) or standards are added to wells in duplicate and the plate is further incubated at room
20 temperature for two hours. The wells are then washed 5 times with wash buffer.

One hundred microliters of detection antibody (full-length anti-sclerostin monoclonal antibody 88) which has been biotinylated with Pierce EZ link NHS-LC biotin kit is added per well. The plate is incubated at room temperature for one hour and then washed four times with wash buffer. Streptavidin-horseradish peroxidase is diluted
25 1:2000 in casein blocking buffer in PBS to a final concentration of 0.5 μ g/ml, then 100 μ L is added per well, incubated at room temperature for one hour and then washed 7 times with wash buffer. OPD substrate (Sigma P8806) is added at 100 μ L/well and reaction is allowed to continue at room temperature for 20 minutes. The reaction is then terminated by adding 100 μ L/well of 1 N HCl. The plate is read at OD 490 nm.

33

-22-

Example 2 Neutralization – bone specific alkaline phosphatase assay

Bone specific alkaline phosphatase is a biochemical indicator of osteoblast activity. The bone specific alkaline phosphatase assay described herein is based on the ability of sclerostin to decrease BMP-4 and Wnt3a-stimulated alkaline phosphatase levels in the multipotential murine cell line, C2C12, while an antibody which neutralizes sclerostin activity would result in a dose-dependent increase of alkaline phosphatase activity in this assay. Wnt3a and BMP-4 are osteogenic growth factors.

C2C12 cells (ATCC, CRL 1772) are plated at 3000-5000 cells per well in a 96-well tissue culture plate in MEM medium supplemented with 5% fetal calf serum, then incubated at 37°C in 5% CO₂ overnight. The antibody to be tested is diluted in 0.5X Wnt3a-conditioned medium to various final concentrations. The medium is then removed from the cells on the tissue culture plate and 150 µl per well of a pre-mixed antibody-BMP4-sclerostin solution (human or cynomologous monkey) is added in which the antibody is at a final concentration 30 µg/ml to 0.5 µg/ml, BMP-4 is at a final concentration of 25 ng/ml and the sclerostin protein is at a final concentration of 1.0 µg/ml and the conditioned medium is at 0.5X concentration. The plate is then incubated at 37°C in 5% CO₂ for 72 hours. The medium is removed from the cells on the tissue culture plate, the cells are washed once with PBS, then the plate of cells is frozen and thawed three times alternating between -80°C and 37°C.

The Wnt3a conditioned media is prepared by growing L-Wnt-3A cells and control L-cells (ATCC CRL-2647 and CRL-2648, respectively) for four days, from a 1:20 split of confluent cells, in DMEM with 10% FBS and 2 mM L-glutamine. The collected media is filtered through 0.2 micron nylon membranes and stored at -20°C long term or 4°C short term.

Alkaline phosphatase activity is measured by adding 150 µl per well of alkaline phosphatase substrate (1-step PNPP, Pierce #37621). The plate of cells is then incubated for 60 minutes at room temperature at which time OD at 405nm is read to determine the alkaline phosphatase activity. Antibody neutralization IC₅₀ values reported in Table 2 below are averages from 2 separate experiments. The IC₅₀ calculations are performed using SigmaPlot Regression Wizard with a Sigmoid 4-parameter fit equation.

34

-23-

Table 2

Antibody	IC ₅₀ (nM) Using Human sclerostin	IC ₅₀ (nM) Using Cyno sclerostin
89	25.1	34.4
88	20.2	23.7
86	25.5	31.6

Example 3 Affinity binding

5 Equilibrium binding studies between an anti-sclerostin antibody and either human, cynomolgous ("cyno") monkey or rat sclerostin are performed on a KinExA 3000 instrument (Sapidyne Instruments Inc.) under K_D-controlled conditions. With this technique, a fixed concentration of antibody below its K_D is mixed with various

10 concentration of sclerostin protein and allowed to come to equilibrium. The fraction of free, unbound, antibody remaining in solution is probed by briefly exposing this equilibrated mixture to sclerostin-coated beads followed by detection with a fluorescently labeled secondary antibody. Typically 2 pM of an anti-sclerostin antibody to be tested is mixed with varying concentrations of human, cyno, or rat sclerostin starting at 2-50 nM

15 and doing three-fold serial dilutions in binding buffer (1X phosphate buffered saline solution, pH 7.4, 0.02% sodium azide and 1 mg/mL bovine serum albumin) containing 2 pM of the antibody to be tested. These solutions are allowed to reach equilibrium over two days at 25°C. The amount of unbound antibody is probed using human sclerostin-coated azlactone beads (Sapidyne Instruments Inc.). These beads are prepared by

20 reacting 50 mg of dry azlactone beads with 50 mcg/ml human sclerostin in a 50 mM sodium carbonate buffer at pH 9.0-9.6 with overnight rotation. Beads are then allowed to settle and the supernatant is replaced with blocking solution (1 M Tris, pH 8.0, plus 10 mg/mL bovine serum albumin) and rotated for one hour. This bead stock is diluted 20-fold into binding buffer and used within three days. A KinExA 3000 instrument

25 equilibrated at room temperature (ca 25°C) is used for binding studies. Typically 6.25 mL of the equilibrated antibody/sclerostin solution are drawn over a packed human sclerostin-azlactone bead column at 0.25 mL/minute flow rate then rinsed with running buffer (1X phosphate buffered saline solution, pH 7.4 with 0.02% sodium azide). The fraction of free anti-sclerostin antibody bound to these beads is quantified by measuring

30 fluorescence resulting from an injected labeled secondary antibody (Cy5-labeled goat anti-human Fab'2 antibody). Two replicate samples for each condition are analyzed and

93

-24-

K_D is determined by fitting data to a 1:1 binding model using KinExA Pro software. The average of the K_D values at 25°C are reported in Table 3 below.

Table 3 - Affinity

Antibody	Human Sclerostin K_D (pM)	Rat Sclerostin K_D (pM)	Cyno Sclerostin K_D (pM)
89	0.3	0.4	1.4
88	2.2	2.2	75
86	0.6	0.1	1.0

5

Example 4 *In vivo* calcein assay:

The rat calcein assay allows direct evaluation of bone formation over a short (10 day) period of time and the effect of an antibody of the invention on bone formation. Calcein is a fluorochrome label which is incorporated into the bone matrix during new bone formation. Quantitative measurement of calcein reflects the degree of bone formation induced by pharmacologic agents. Six month old female Sprague-Dawley rats are used (n=6/dose group). Rats are dosed every 3 days by subcutaneous injection (days 0, 3, and 6) with 1 mg/kg or 6 mg/kg antibody in PBS vehicle, or with 10 µg/kg PTH daily or with 6 mg/kg human IgG as a negative control. Calcein is injected subcutaneously on day 7 and rats are sacrificed on day 10. Tibiae are collected and cut to evaluate trabecular bone formation (distal metaphysis) or cortical bone formation (tibial diaphysis) and subjected to demineralization and fluorochrome quantitation of total calcein. The values shown in Table 4 below are averages with the human IgG control set to 1.0. The data demonstrate that administration of antibodies of the invention leads to both trabecular and cortical bone formation.

20

26

-25-

Table 4

Antibody	Dose mg/k g	Relative Trabecular Calcein	Relative Cortical Calcein
Hu IgG	6	1.00	1.00
PTH	.01	1.45	1.89
89	6	1.97	1.88
88	6	1.90	2.18
86	6	1.77	2.78

5 Example 5 Osteoarthritis

SOST expression is mainly confined to bone tissue. However, applicants determine herein that another tissue with significant SOST expression is cartilage as measured by real-time PCR. Cartilage expression of SOST is also observed using an array of RNA isolated from cartilage of normal or osteoarthritic patients. Furthermore, in the array, expression of SOST increases relative to osteoarthritis severity such that expression in cartilage from mild osteoarthritis is greater than control, severe is greater than mild, and severe surgical (removed for knee replacement surgery) is greater than all others demonstrating a correlation of osteoarthritis and SOST expression. An antibody specific to sclerostin may be used to treat osteoarthritis.

An anti-sclerostin chimeric antibody with a murine variable region on a rat Fc region, antibody 789 with SEQ ID NO:42 for heavy chain and SEQ ID NO:43 for light chain, is tested for the ability to block joint pain in the MIA model of osteoarthritis. The variable region of this antibody was the parent sequence for generation of the humanized antibody 89 (HCVR with SEQ ID NO: 16 and LCVR with SEQ ID NO: 19). Both, humanized antibody 89 and chimeric antibody 789 bind the same epitope. This osteoarthritis model utilizes monoiodoacetate (MIA) injections directly into the knee joint to induce an OA-like process that involves an inflammatory and cytokine mediated pain and cartilage destruction process. The contralateral knee of a rat is injected with saline only, and pain is measured as the difference in weight-bearing of the 2 hind legs.

MIA experiment #1 utilizes young male Lewis rats (7-8 weeks of age) in "prevention mode" where the anti-sclerostin antibody is administered prior to MIA injections. The day prior to MIA injections, rats are injected with either 10 mg/kg anti-sclerostin antibody i.p. or 10 mg/kg control IgG, or PBS (n = 6 per group). The following

-26-

day, rats are anesthetized and the right knees are injected with 0.3 mg of monosodium iodoacetate dissolved in 50 ul of 0.9% sterile saline. The left knees are injected with saline alone. Injections are through the patellar ligament using an insulin syringe with a 28G needle covered with a plastic tubing sheath to allow only 5 mm penetration into the knee joint.

Pain measurements are taken 2 and 7 days after MIA injection (3 and 8 days after antibody injection). After the pain measurement on day 7, a second dose of the antibody or control injection is administered. Additional pain measurements are then taken 10 and 14 days after MIA (3 and 7 days after the second injection of the antibody).

Pain is measured by difference in weight bearing of the injected legs through use of an incapacitance tester. Rats are placed in a Perspex box with their hind paws on the pressure sensors. When the rats are reliably still, a 1 second reading is taken, followed by 2 additional readings and the average calculated. The weight placed on the MIA-injected leg is subtracted from the saline-injected leg to give the difference in weight bearing.

A statistically significant decrease in pain is seen with the anti-sclerostin antibody compared to IgG (and PBS) control at days 7, 10 and 14 after MIA administration (Table 5 below). Values are weight bearing differences between MIA injected leg and saline injected leg in grams (standard error of the mean).

A second MIA experiment is carried out with older rats (27 weeks of age) and in "treatment mode" where antibody is administered after MIA is injected. Rats receive MIA or control saline injections as before and then 6 days later 10 mg/kg anti-sclerostin antibody, control IgG, or PBS (n = 6 per group) are injected i.p. On days 8 and 15 after MIA (2 and 9 days after antibody) pain measurements are taken as before. On day 16 after MIA, a second dose of the anti-sclerostin antibody and controls is administered, and on day 21 (5 days after second antibody dose) pain measurements are again collected.

At the early timepoint after administration of the anti-sclerostin antibody (day 8 post-MIA) there is no effect of the antibody on pain, but 7 days later, there is a trend towards decreased pain as measured by weight bearing differences between MIA injected leg and saline injected leg in grams. The trend towards reduced pain with anti-sclerostin antibody is also seen 5 days after the second antibody dosing. Chimeric antibody 789 differed from IgG control with a p-value of 0.06 and 0.08 at day 15 and 21 respectively.

-27-

Together, these results demonstrate that joint pain resulting from the established MIA disease process is interrupted by administering neutralizing anti-sclerostin antibody.

5 Example 6 OVX Rat Studies

The ovariectomized (OVX) rat is a well recognized model for post-menopausal osteoporosis. In this study the effects of anti-sclerostin antibodies of the invention comprising a murine variable region and a rat Fc are examined in the OVX rat.

10 Six month old female Sprague-Dawley rats are ovariectomized and allowed to lose bone for 1 month prior to dosing. One group of rats (n=8) are not ovariectomized but are sham-operated for bone comparison to ovariectomized rats. All OVX rats are randomized into treatment groups (n=7 each) and treated with either PTH (1-38), IgG control (10 mg/kg) or 10 mg/kg of chimeric anti-sclerostin antibody (Antibody 788 with
15 heavy chain of SEQ ID NO: 40 and light chain of SEQ ID NO:41 [the variable region of this antibody was the parent sequence for generation of the humanized antibody 88]; Antibody 789 with heavy chain of SEQ ID NO: 42 and light chain of SEQ ID NO: 43) for a total of 58 days. The antibodies are all dosed subcutaneously once every 3 days, while the PTH (1-38) is dosed daily subcutaneously at 10 mg/kg. Upon sacrifice, the femurs
20 and vertebrae are removed for quantitative computed tomography (CT) analysis using a CT scanner to measure the distal femur (trabecular bone) and midshaft (cortical bone) as well as the 5th lumbar vertebrae. Bones are positioned on molding clay for reproducible measurements and scans of the femurs are taken 2 mm from the end of the epiphysis (distal femur) or 10 mm from the epiphysis (midshaft femur).

25 Vertebral measurements are done with L-5 scanned from a landmark "V" structure in the vertebra. Data are calculated by manufacture software package SYS-C320-V 1.5. The biomechanical properties of the femoral diaphysis, the L-5 vertebrae and femoral neck are measured post-necropsy according to: Turner CH, Burr DB, Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 14(4):595-608, 1993. Mechanical
30 properties of the midshaft are measured for intact left femora using 3-point bending with load applied midway between two supports 15 mm apart. Femora are positioned so the loading point is about 7.5 mm proximal from the distal popliteal space and bending occurs about the medial-lateral axis. Specimens are tested in a saline bath at 37°C. Load-displacement curves are recorded at a crosshead speed of 10 mm/min using a materials

-28-

testing machine (model: 1/S, MTS Corp, Minneapolis, MN) and analyzed using TestWorks 4 software (MTS Corp.) to calculate peak load. Mechanical properties of L-5 vertebrae were analyzed after the posterior processes were removed and the ends of the centrum were made parallel using a diamond wafering saw (Buehler Isomet, Evanston, IL). Vertebral specimens are loaded in compression, using the materials testing device and analyzed using TestWorks 4 software (MTS Corp.). For femoral neck measurements, the femur is positioned vertically in a mounting chuck with the proximal side up and load was applied downward on the midpoint of the femoral head. Analysis was with TestWorks 4 software (MTS Corp.). The average values and standard error of the mean values are in Table 5 and 6 below. The data demonstrate that chimeric antibodies 788 and 789 increase bone mineral density ("BMD"), bone mineral content ("BMC") and bone strength (peak load) in OVX rats.

Table 5

Treatment	Dist. Femur BMD (mg/cm ³)	Dist. Femur BMC (mg)	Mid Femur BMD (mg/cm ³)	Mid Femur BMC (mg)	Vertebra 1 BMD (mg/cm ³)	Vertebra 1 BMC (mg)
Sham	*602	74.1	898	61.2	*587	165
IgG	528	68.6	852	60.5	526	149
PTH	*744	*95.3	*925	63.2	*642	*180
788	*675	*91.4	*946	*68.6	*703	*209
789	*710	*94.9	*951	*68.4	*721	*209

* Statistically significant increase from IgG control, p<0.05, Dunnett's Method.

Table 6

Treatment	Femoral Neck Peak Load (Newtons)	Mid Femur Peak Load (Newtons)	Vertebral Peak Load (Newtons)
Sham	96.5	134	236
IgG	100.4	126	188
PTH	117.6	128	*328
2492788	*131.6	*147	*431
2492789	*147.5	*153	*432

* Statistically significant increase from IgG control, p<0.05, Dunnett's Method.

-29-

WE CLAIM:

1. An antibody that specifically binds human sclerostin and comprises six CDRs with amino acid sequences selected from the group consisting of:

- 5 i) HCDR1 with SEQ ID NO: 20, HCDR2 with SEQ ID NO: 21, HCDR3 with SEQ ID NO: 22, LCDR1 with SEQ ID NO: 23, LCDR2 with SEQ ID NO: 24 and LCDR3 with SEQ ID NO: 25;
- ii) HCDR1 with SEQ ID NO: 26, HCDR2 with SEQ ID NO: 27, HCDR3 with SEQ ID NO: 28, LCDR1 with SEQ ID NO: 29, LCDR2 with SEQ ID NO: 30 and LCDR3 with SEQ ID NO: 31; and
- 10 iii) HCDR1 with SEQ ID NO: 32, HCDR2 with SEQ ID NO: 33, HCDR3 with SEQ ID NO: 34, LCDR1 with SEQ ID NO: 35, LCDR2 with SEQ ID NO: 36 and LCDR3 with SEQ ID NO: 37;

wherein the antibody is characterized by at least one of the following:

- 15 i) a K_D for human sclerostin of 10 pM or less at 25°C;
- ii) a K_D for cynomolgous monkey sclerostin of 100 pM or less at 25°C;
- or
- iii) an IC_{50} of 50 nM or less in a bone specific alkaline phosphatase assay using human sclerostin.

20

2. An antibody that specifically binds human sclerostin and comprises a heavy chain variable region and a light chain variable region wherein,

- i) the heavy chain variable region has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 and the light chain variable region has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17;
- 25 ii) the heavy chain variable region has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 and the light chain variable region has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18; or
- iii) the heavy chain variable region has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16 and the light chain variable region has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19.
- 30

-30-

3. An antibody that specifically binds human sclerostin and comprises a heavy chain polypeptide and a light chain polypeptide wherein,
 - i) the heavy chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 and the light chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5;
 - ii) the heavy chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 and the light chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6; or
 - iii) the heavy chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 and the light chain polypeptide has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7.
4. An antibody that specifically binds human sclerostin and comprises a heavy chain polypeptide with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 and a light chain polypeptide with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6.
5. The antibody of any one of claims 2-4 wherein the antibody has a K_D for human sclerostin of 10 pM or less at 25°C.
6. The antibody of any one of claims 2-4 wherein the antibody has a K_D for human sclerostin of 2.2 pM or less at 25°C.
7. The antibody of any one of claims 2-6 wherein the antibody has an IC_{50} of 50 nM or less in a bone specific alkaline phosphatase assay using human sclerostin.
8. The antibody of claim 1 or 2 wherein the antibody comprises a heavy chain constant region selected from the group consisting of the heavy chain constant region of human IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ and a polypeptide with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38.
9. The antibody of any one of claims 1-8 for use in the preparation of a medicament.

-31-

10. The antibody of any one of claims 1-8 for use in a method of increasing at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength in a human subject.
- 5 11. Use of an antibody of any one of claims 1-8 for the preparation of a medicament for increasing at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength in a human subject.
- 10 12. Use of an antibody of any one of claims 1-8 for the preparation of a medicament for treatment of a disease or disorder selected from the group consisting of osteoporosis, osteopenia, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, periodontal disease, or multiple myeloma in a human subject.
- 15 13. A method of increasing at least one of bone mass, bone mineral density, bone mineral content or bone strength in a human subject in need thereof, comprising administering to the human subject an effective amount of an antibody of any one of claims 1-8.
- 20 14. A method of treating a disease or disorder selected from the group consisting of osteoporosis, osteopenia, osteoarthritis, pain associated with osteoarthritis, periodontal disease, or multiple myeloma in a human subject in need thereof, comprising administering to the human subject an effective amount of an antibody of any one of claims 1-8.
- 25 15. A method of treating osteoporosis in a human subject in need thereof, comprising administering to the human subject an effective amount of an antibody comprising a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 3 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 6.
- 30 16. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 1-8, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

-32-

17. A method for detecting sclerostin protein in a biological sample, comprising incubating an antibody selected from the group consisting of:

- i) an antibody comprising a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO:40 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 41; and
- 5 ii) an antibody comprising a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 42, and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 43;
- iii) an antibody comprising a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 2 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 5;
- 10 iv) an antibody comprising a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 3 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 6; and
- v) an antibody comprising a heavy chain polypeptide with SEQ ID NO: 4 and a light chain polypeptide with SEQ ID NO: 7;

with the biological sample under conditions and for a time sufficient to permit said antibody to bind to sclerostin protein, and detecting said binding.

15

44

X17563_WO_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company
Korytko, Andrew I.
Marquis, David Matthew
Smith, Eric Michael
Swanson, Barbara Anne

<120> Anti-Sclerostin Antibodies

<130> X17563

<150> US 60/895813

<151> 2007-03-20

<160> 43

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
1 5 10 15

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
20 25 30

Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
35 40 45

Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
50 55 60

Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
65 70 75 80

Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
85 90 95

Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
100 105 110

Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
115 120 125

Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
130 135 140

Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg

X17563_WO_ST25
155

145

150

160

Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
180 185 190

Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
195 200 205

Leu Glu Asn Ala Tyr
210

<210> 2
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct
<400> 2

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

Ser val Lys val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Phe Leu Asn Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Tyr His Asp Gly Thr Thr Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr val Thr val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

X17563_WO_ST25

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
Página 3

46

42

X17563_WO_ST25
395

385 390 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 3
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 3

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 Val Ser Gly Phe Pro Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Ser Asp Pro Glu Ile Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Gly Asp Thr Thr Tyr Lys Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

X17563_WO_ST25

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

Ad

405 X17563_WO_ST25 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 4
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 4

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 Asp Phe Glu Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg 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 Glu Gly Tyr Tyr Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

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

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

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

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

50

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

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

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

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
Página 7

gl

420 X17563_WO_ST25 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Gly
450

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 5

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 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Gln Trp Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 6

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

X17563_WO_ST25

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Glu Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

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

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

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

5/4

X17563_WO_ST25

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8
<211> 1332
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 8
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata cacattcact gactactttc tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaact atttatcctt accatgatgg tactacctac 180
tctcagaagt tcaagggcag agtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaggaa 300
gaggatggtc agttcgacta ctggggccaa ggaaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
accaagggcc catcggctctt cccgctagcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gccgccttg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
ggcccccat gccaccctg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttctc 720
ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccagga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020



X17563_W0_ST25

ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggaa	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc	1320
ctgtctctgg gt	1332

<210> 9
<211> 1332
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 9	
caggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg tttccggctt cccattaag gacaccttc agcactgggt gcgacaggct	120
cctggaaaag ggcttgagt gatgggatgg agcgatcctg agatcgggtga tactgaatat	180
gcctcgaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggcgac	300
accacataca agtttgactt ctggggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcgggtctt cccgctagcg ccctgtctca ggagcacctc cgagagcaca	420
gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac	480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc	540
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc	600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttga gtccaaatat	660
ggtcccccat gccaccctg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg	720
ttcccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
gtggtggacg tgagccagga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag	960
gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggaa	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc	1260

X17563_WO_ST25

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
ctgtctctgg gt 1332

<210> 10
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 10
gagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctgactt cgagattaaa gactactata tacattgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggcag attgatgctg aggatgggtga aactgaatat 180
gccccgaggt tccagggcca ggccaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagagaggggt 300
tattactacg atgggcgca ctactggtac ttcgatgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc cgctagcgcc ctgctccagg 420
agcacctccg agagcacagc cgccctgggc tgcctgggtca aggactactt ccccgaaccg 480
gtgacgggtg ctggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
agagttgagt ccaaatatgg tccccatgc ccaccctgcc cagcacctga gttcctgggg 720
ggaccatcag tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccggacc 780
cctgagggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac 840
tggtagctgg atggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagttc 900
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa ggcctcccgt cctccatcga gaaaaccatc 1020
tcaaagcca aagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag 1080
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggaaag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg 1260
tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
acacagaaga gcctctccct gtctctgggt 1350

<210> 11

X17563_WO_ST25

<211> 642
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Miscellaneous construct

<400> 11
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctct ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca gtgcaagtca gggcattcag tggattttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag catagtaaac ttcctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acggactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 12
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Miscellaneous construct

<400> 12
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca ggatgtgcac actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatttg gcatccacc ggtggactgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa tatagcgatt atccgtggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acggactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 13
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Miscellaneous construct

<400> 13
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatccact ggtaccaaca gaaacctggc 120
 caggctccca ggctcctcat ctatagcaca tccgagctgg cttctggcat cccagccagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 240
 gattttgcag tttattactg tcagcagctt agtcatctcc cgctcacgtt cggcggaggg 300
 accaaggtgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600
 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgc 639

<210> 14
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Miscellaneous construct

<400> 14

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

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

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Tyr His Asp Gly Thr Thr Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Página 15

59

X17563_WO_ST25
90

85

95

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

Thr val Thr val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 15

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 val Ser Gly Phe Pro Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Ser Asp Pro Glu Ile Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Gly Asp Thr Thr Tyr Lys Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr val Thr val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 16



X17563_WO_ST25

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 Asp Phe Glu Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg 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 Glu Gly Tyr Tyr Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 17

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 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Gln Trp Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Lys Leu Pro Arg
Página 17

bl

85 X17563_WO_ST25 95

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

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 18

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 19
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 19

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

C2

X17563_W0_ST25

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

Ser Thr Ser Glu Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 21

Thr Ile Tyr Pro Tyr His Asp Gly Thr Thr Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 22

Glu Glu Glu Asp Gly Gln Phe Asp Tyr



1 5

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 23

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Gln Trp Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 24

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 25

Gln Gln His Ser Lys Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 26

Gly Phe Pro Ile Lys Asp Thr Phe Gln His
1 5 10

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

64

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 27

Trp Ser Asp Pro Glu Ile Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 28

Gly Asp Thr Thr Tyr Lys Phe Asp Phe
1 5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 29

Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 30

Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 31

Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 32

Asp Phe Glu Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 33

Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 34

Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

6

X17563_WO_ST25

<223> Miscellaneous construct

<400> 35

Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 36

Ser Thr Ser Glu Leu Ala Ser
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 37

Gln Gln Leu Ser His Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 38

<211> 322

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Miscellaneous construct

<400> 38

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
35 40 45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
Página 23

6A

X17563_W0_ST25
60

50

55

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
65 70 75 80

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
85 90 95

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
100 105 110

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
115 120 125

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
130 135 140

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
145 150 155 160

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
165 170 175

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
195 200 205

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
210 215 220

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
225 230 235 240

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
245 250 255

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
260 265 270

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
275 280 285

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
290 295 300

68

X17563_WO_ST25

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
305 310 315 320

Leu Gly

<210> 39
<211> 970
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 39
ggcccatcgg tcttcccgt agcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc 60
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc 120
gcccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 180
gctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa 240
cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatggtcc 300
cccatgcca ccctgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tcctgttccc 360
cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacgt gcgtgggtgg 420
ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt 480
gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtgggtcag 540
cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggcttc 600
caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg 660
agagccacag gtgtacacc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag 720
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa 780
tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt 840
cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc 900
atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc 960
tctgggttga 970

<210> 40
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 40

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
Página 25

6d

X17563_WO_ST25

1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Gly Glu Ser Asn Tyr Asp Phe Asp Phe Trp Gly Leu Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
145 150 155 160

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

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

Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys
210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
245 250 255

70

X17563_WO_ST25

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe
260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro
275 280 285

Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
290 295 300

Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val
305 310 315 320

Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro
325 330 335

Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys
340 345 350

Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser
385 390 395 400

Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 41
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
Página 27

91

20 X17563_W0_ST25 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln Leu Ala Thr Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile
130 135 140

Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg Asp Gly Val Leu
145 150 155 160

Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

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

Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro Val Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 42
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 42

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Asp Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg Phe
50 55 60

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

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

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

Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
115 120 125

Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn
130 135 140

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

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

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

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val
195 200 205

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg
210 215 220

Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val
225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile
245 250 255

Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp
Página 29

29

260 X17563_WO_ST25 265 270

Asp Pro Glu Val His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His
275 280 285

Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg
305 310 315 320

Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr
340 345 350

Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile
355 360 365

Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp
370 375 380

Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr
385 390 395 400

Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys
405 410 415

Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 43
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Miscellaneous construct

<400> 43

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

X17563_WO_ST25

24

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln Leu Ala Thr Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Ser
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg Asp Gly Val Leu Asp
145 150 155 160

Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

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

Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro Val Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

ANTICUERPOS ANTI-ESCLEROSTINA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está en el campo de la
5 medicina, particularmente en el campo de anticuerpos
dirigidos contra esclerostina. Más específicamente, la
invención se refiere a anticuerpos de alta afinidad que
enlazan específicamente esclerostina humana y al uso
terapéutico de los anticuerpos para varios trastornos o
10 condiciones en sujetos humanos los cuales se benefician de un
incremento en al menos uno de masa ósea, densidad mineral,
contenido mineral óseo o consistencia ósea.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La osteoporosis es una enfermedad en la cual la
densidad mineral ósea (BDM) se reduce, la microarquitectura
ósea es interrumpida y los huesos osteoporóticos están en
alto riesgo de fractura. La osteoporosis permanece como una
causa principal de incapacidad de largo término y mortalidad,
20 particularmente entre personas de edad avanzada. Mientras los
tratamientos efectivos para osteoporosis existen en la forma
de modificación de estilo de vida y farmacoterapia, las
terapias actualmente disponibles están limitadas en número y
eficacia, están a menudo asociadas con efectos secundarios
25 indeseables y no son universalmente aceptables a los

pacientes. Un número de agentes antiresorptivos que incluyen calcitonina, bifosfonatos, reemplazo de estrógeno y moduladores del receptor de estrógeno selectivos (SERMs), previenen la pérdida ósea adicional, pero no reacumulan hueso una vez que se ha perdido. Un agente anabólico el cual incrementa la masa ósea y densidad mineral ósea y restaura la arquitectura ósea, está disponible en la forma de PTH(1-34) humano. Sin embargo, este agente terapéutico requiere inyección subcutánea diaria, a menudo por un año o más, resultando en menos que un acatamiento completo del paciente.

La esclerostina, el producto del gen SOST, es fuertemente expresada en osteocitos dentro del hueso. Debido a su papel como un regulador negativo potente de formación ósea, la esclerostina es un objetivo deseable para intervención terapéutica para trastornos o condiciones las cuales podrían beneficiarse de un incremento en al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo y consistencia ósea, por ejemplo, osteoporosis. Por lo tanto, los anticuerpos anti-esclerostina pueden proporcionarse útiles como un procedimiento anabólico para tratar tales trastornos o condiciones. La Publicación Internacional PCT No. WO 2006/119107, describe secuencias de aminoácido de anticuerpos anti-esclerostina humanizados particulares, en los cuales todas las CDRs son completamente murina, es decir, no alteradas a partir de las CDRs de un anticuerpo generado

en un ratón.

Existe una necesidad de un anticuerpo anti-esclerostina alternativo, el cual se enlaza a esclerostina humana con una fuerte afinidad de enlace y tiene un valor IC_{50} bajo en un ensayo de bioactividad de esclerostina. Tal anticuerpo podría ser pronosticado por ser más terapéuticamente eficaz, particularmente para osteoporosis, y requiere dosificación menos frecuente que PTH (1-34) o un anticuerpo anti-esclerostina con una afinidad de enlace inferior (es decir, un K_D superior) o un valor IC_{50} superior. Existe también una necesidad de un anticuerpo específico a esclerostina humana, en donde existe un riesgo reducido de una respuesta inmune al anticuerpo evocada por un sujeto humano que administra el anticuerpo o un riesgo reducido de inestabilidad mientras las propiedades del anticuerpo de tener una alta afinidad de enlace para esclerostina humana y un valor IC_{50} bajo en un ensayo de bioactividad se mantienen. Los anticuerpos anti-esclerostina de la presente invención satisfacen estas necesidades y proporcionan ventajas relacionadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados, comprenden una secuencia de polipéptido específica descrita en la presente,

específicamente enlazan esclerostina humana con una alta afinidad de enlace y pueden ser usados para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo y consistencia ósea en un mamífero, 5 preferiblemente un humano.

En una modalidad, al menos una CDR en un anticuerpo de la invención difiere en secuencia de aminoácido a partir de la CDR en una posición presente en un cuerpo precursor, es decir, el anticuerpo generado en un roedor (por ejemplo, un 10 ratón), a partir del cual la variante de anticuerpo es decir, el anticuerpo humanizado o quimérico de la invención se deriva. Preferiblemente, tal(es) sustitución(es) de aminoácido en una secuencia CDR de un anticuerpo de la invención, resulta en una afinidad de enlace mayor (es decir, 15 K_D inferior), con esclerostina humana, un IC_{50} inferior en un ensayo de bioactividad de esclerostina o ambos, que presentan en el anticuerpo precursor. Una sustitución de aminoácido en una secuencia de CDR de un anticuerpo de la invención de aquella presente en la CDR del anticuerpo precursor, puede 20 resultar en una respuesta inmunogénica reducida al anticuerpo por un humano que administra el anticuerpo. Además, una sustitución de aminoácido en una secuencia CDR de un anticuerpo de la invención de aquella presente en la CDR del anticuerpo precursor, puede reducir el riesgo de 25 inestabilidad del anticuerpo, por ejemplo, por sustitución de

7A

un residuo asparagina con un aminoácido diferente con ello, reduciendo el riesgo de desamidación.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención específicamente se enlaza a esclerostina humana y comprende

5 seis regiones CDR con secuencias de aminoácido seleccionadas a partir del grupo que consiste de (i) HCDR1 con la SEC ID NO: 20, HCDR2 con la SEC ID NO: 21, HCDR3 con la SEC ID NO: 22, LCDR1 con la SEC ID NO: 23, LCDR2 con la SEC ID NO: 24, y LCDR3 con la SEC ID NO: 25; (ii) HCDR1 con la SEC ID NO: 26,

10 HCDR2 con la SEC ID NO: 27, HCDR3 con la SEC ID NO: 28, LCDR1 con la SEC ID NO: 29, LCDR2 con la SEC ID NO: 30, y LCDR3 con la SEC ID NO: 31; y (iii) HCDR1 con la SEC ID NO: 32, HCDR2 con la SEC ID NO: 33, HCDR3 con la SEC ID NO: 34, LCDR1 con la SEC ID NO: 35, LCDR2 con la SEC ID NO: 36, y LCDR3 con la

15 SEC ID NO: 37.

En otra modalidad, un anticuerpo de la invención se enlaza específicamente a esclerostina humana y comprende, un polipéptido de región variable de cadena pesada ("HCVR") y un polipéptido de región variable de cadena ligera ("LCVR") en

20 donde, (i) la HCVR tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 14 y la LCVR tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 17; (ii) la HCVR tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 15 y la LCVR tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 18; o (iii) la HCVR tiene la

25 secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16 y la LCVR tiene

la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 19.

En otra modalidad, un anticuerpo de la invención se enlaza específicamente a esclerostina humana y comprende, un polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera en donde, (i) el polipéptido de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 5; (ii) el polipéptido de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 3 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 6; o (iii) el polipéptido de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 4 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 7.

En una modalidad, anticuerpos de la invención como se define en la presente, preferiblemente definidos con un número de SEC ID, son además caracterizados por tener una afinidad de enlace (K_D) para esclerostina humana de aproximadamente 10 pM o menos a 25°C. Anticuerpos de la invención preferidos, tienen un K_D para esclerostina de monocinólogo de aproximadamente 100 pM o menos a 25°C. Anticuerpos de la invención más preferidos, tienen una afinidad de enlace para esclerostina humana de aproximadamente 10 pM o menos a 25°C y una afinidad de enlace para esclerostina de monocinólogo de aproximadamente 100

pM o menos a 25°C.

En otra modalidad, anticuerpos de la invención como se define en la presente, preferiblemente definidos con un número de SEC ID, son caracterizados por tener un IC₅₀ de 50
5 nM o menos en un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso, usando esclerostina humana. Preferiblemente, estos anticuerpos también tienen un K_D para esclerostina humana de aproximadamente 10 pM o menos a 25°C. Más preferiblemente, estos anticuerpos tienen un K_D para esclerostina humana de
10 aproximadamente 10 pM o menos a 25°C y un K_D para esclerostina de monos cinomólogo de aproximadamente 100 pM o menos a 25°C.

En otra modalidad, la invención proporciona una composición que comprende, un anticuerpo de la invención y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
15 Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende una población homogénea o sustancialmente homogénea de un anticuerpo monoclonal de la invención, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención incluye el uso de un anticuerpo de la
20 invención para la preparación de un medicamento. La invención además incluye el uso de un anticuerpo de la invención en un método para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o consistencia ósea en un animal, preferiblemente una especie de mamífero, más
25 preferiblemente un sujeto humano.

La invención además proporciona un método para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o consistencia ósea, que comprende administrar a un sujeto humano en necesidad del mismo, una
5 cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención.

Una modalidad de la invención proporciona un método para tratar una enfermedad, condición o trastorno en un sujeto humano, el cual se beneficia de un incremento en al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido
10 mineral óseo o consistencia ósea, que incluye, por ejemplo, osteoporosis, osteopenia, osteoartritis, dolor asociado con osteoartritis, enfermedad periodontal y mieloma múltiple.

La invención además incluye un método para detectar la proteína esclerostina en una muestra biológica, que
15 comprende incubar un anticuerpo de la invención con la muestra biológica bajo condiciones y por un tiempo suficiente para permitir a dicho anticuerpo enlazarse a la proteína esclerostina, y detectar dicho enlace. Un anticuerpo preferido para uso en tal ensayo de detección, tiene un
20 polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO:40 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 41; un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 42, y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 43; un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 2 y un
25 polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 5; un

83

polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 3 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 6; o un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 4 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 7.

5 La invención además proporciona moléculas de ácido nucleico aislado que codifican un anticuerpo de la invención; un vector que comprende tal ácido nucleico, opcionalmente operablemente ligado a secuencias de control reconocidas por una célula hospedera transformada con el vector; una célula
10 hospedera que comprende tal vector; un proceso para producir un anticuerpo de la invención que comprende, cultivar la célula hospedera de manera que el ácido nucleico es expresado y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo a partir del medio de cultivo de célula hospedera.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención presenta anticuerpos que enlazan específicamente esclerostina humana, naturalizan o antagonizan al menos una bioactividad de esclerostina humana
20 *in vivo* o *in vitro*, y además exhiben una afinidad de enlace fuerte con esclerostina humana.

Cuando se usa en la presente, el término "esclerostina" se refiere a la proteína humana de longitud completa con la secuencia de aminoácido mostrada en la SEC ID
25 NO:1 o a la forma madura de la proteína con la secuencia

señal removida.

El término "anticuerpo", con referencia a un anticuerpo anti-esclerostina de la invención (o simplemente, "anticuerpo de la invención"), como se usa en la presente, se
5 refiere a un anticuerpo monoclonal. Un "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, a menos que se indique de otro modo. Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden ser producidos usando por ejemplo,
10 tecnologías recombinantes, tecnologías de despliegue de fago, tecnologías sintéticas, por ejemplo, injerto de CDR, o combinaciones de tales tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica. "Anticuerpo monoclonal", se refiere a un anticuerpo que se deriva de una copia única o
15 clon, que incluye por ejemplo, cualquier clon eucariótico, procariótico o fago, y no el método por el cual se produce.

Un "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpo de la invención", o simplemente "anticuerpo", puede ser un anticuerpo intacto (que comprende una región Fc completa o de
20 longitud completa), o una porción o fragmento de un anticuerpo que comprende una porción de enlace al antígeno, por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fab' o fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo quimérico o humanizado. Fragmentos de enlace al antígeno particularmente preferidos de un
25 anticuerpo de la invención, retienen la capacidad para



inhibir o neutralizar una o más bioactividades características de una esclerostina de mamífero *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, en una modalidad, una porción de enlace al antígeno de un anticuerpo de la invención, puede inhibir la interacción de esclerostina humana madura con uno o más de sus ligandos y/o puede inhibir una o más funciones mediadas por el receptor de esclerostina humana.

Además, un "anticuerpo monoclonal" o "anticuerpo de la invención", o simplemente "anticuerpo" como se usa en la presente, puede ser un fragmento Fv de cadena única que puede ser producido uniendo el ADN que codifica la LCVR y HCVR con una secuencia enlazadora. (Véase, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp 269-315, 1994). Se entiende que con respecto a si los fragmentos o porciones de enlace al antígeno son especificados, el término "anticuerpo" como se usa en la presente, incluye tales fragmentos o porciones, así como también formas de cadena única, a menos que se indique de otro modo. Tan pronto como la proteína retiene la capacidad para enlazar específicamente esclerostina, se incluye dentro del término "anticuerpo".

El término "enlaza específicamente" como se usa en la presente, se refiere a la situación en la cual un miembro de un par de enlace específico no se enlaza específicamente a moléculas distintas de su patrón(es) de enlace específico



medido por una técnica disponible en el arte, por ejemplo, ensayo de competición ELISA, BIACORE® o ensayo KINEXA®. El término también es aplicable en donde por ejemplo, un dominio de enlace al antígeno de un anticuerpo de la invención es

5 específico para un epítipo particular que se lleva por un número de antígeno, en tal caso, el anticuerpo que lleva el dominio de enlace al antígeno será capaz de enlazar específicamente a los varios antígenos que llevan el epítipo. El término "epítipo", se refiere a tal porción de una

10 molécula capaz de ser reconocida por y unida por, un anticuerpo a una o más regiones de enlace al antígeno del anticuerpo.

La frase "bioactividad", con referencia a un anticuerpo de la invención, incluye pero no se limita a,

15 afinidad de enlace al antígeno o epítipo, capacidad para neutralizar o antagonizar una bioactividad de esclerostina *in vivo* o *in vitro*, el IC₅₀ en un ensayo de fosfatasa alcalina específico del hueso (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2 en la presente), u otro ensayo de actividad *in*

20 *vitro*, la estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* del anticuerpo y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo, por ejemplo, cuando se administra a un sujeto humano. Las propiedades o características mencionadas anteriormente, pueden ser observadas o medidas usando técnicas reconocidas en el arte

25 que incluyen, pero no se limitan a, ELISA, ELISA competitivo,

análisis de resonancia de plasmón de superficie, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo*, sin límite, inmunohistoquímica y enlace al receptor con secciones de tejido a partir de diferentes fuentes que incluyen fuentes
5 humana, primate o cualquier otra fuente como pueda ser necesaria.

La frase "bioactividad" con referencia a esclerostina, incluye pero no se limita a, enlace específico de esclerostina a otra proteína (por ejemplo, un receptor o
10 miembro de la familia TGF- β), una o más funciones mediadas por el receptor de esclerostina humana, transducción de señal, propiedades inmunogénicas, estabilidad *in vivo* o *in vitro*, que afectan los niveles o actividad de otra proteína *in vivo* o *in vitro* (véase por ejemplo, Ejemplo 2), niveles de
15 expresión de esclerostina y distribución de tejido.

El término "inhibe" o "neutraliza", como se usa en la presente con respecto a una bioactividad de un anticuerpo de la invención, significa la capacidad para sustancialmente antagonizar, prohibir, prevenir, restringir, reducir,
20 interrumpir, eliminar, detener, reducir o invertir una bioactividad de esclerostina (por ejemplo, como se mide en el ejemplo 2 en la presente).

El término "numeración Kabat" como se usa en la presente, es reconocido en la técnica y se refiere a un
25 sistema de numeración de residuos de aminoácido los cuales

son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácido en las regiones de cadena ligera y pesada de un anticuerpo (Kabat, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971); Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)). El posicionamiento de CDRs en la región variable de un anticuerpo sigue la numeración Kabat o simplemente, "Kabat."

10 Un polinucleótido es "operablemente ligado", cuando se coloca en una relación funcional con otro polinucleótido. Por ejemplo, un promotor o intensificador es operablemente ligado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia.

15 Los términos "sujeto" y "paciente", usados intercambiablemente en la presente, se refieren a un mamífero, preferiblemente un humano. En cierta modalidad, el sujeto es además caracterizado con una enfermedad o trastorno o condición que podría beneficiarse de un nivel reducido de esclerostina o bioactividad reducida de esclerostina.

20

 El término "vector", se refiere a una secuencia de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido operablemente ligado, que incluye pero no se limita a, plásmidos y vectores virales. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la

25

cual son introducidos, mientras otros vectores pueden ser integrados en el genoma de una célula hospedera después de la introducción en la célula hospedera, y con ello, son replicados junto con el genoma hospedero. Sin embargo, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están operablemente ligados. Tales vectores son referidos aquí como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). Vectores ejemplares son bien conocidos en la técnica.

10 Como se usa en la presente, las expresiones "célula", "célula hospedera" y "cultivo celular", son usadas intercambiablemente e incluyen una célula individual o cultivo celular que es un recipiente de cualquier polinucleótido aislado de la invención, o cualquier
15 vector(res) recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica un HCVR, LCVR o anticuerpo de la invención. Una célula hospedera incluye células transformadas, transducidas o infectadas con uno o más vectores recombinantes o un polinucleótido que expresa un
20 anticuerpo monoclonal de la invención o una cadena ligera o pesada del mismo.

Cada cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa, está comprendida de una región variable de cadena pesada N-terminal (aquí "HCVR") y una región constante de
25 cadena pesada. Cada cadena ligera de un anticuerpo de

longitud completa está comprendido de una región variable de cadena ligera N-terminal (aquí "LCVR") y una región constante de cadena ligera. Las regiones HCVR y LCVR, pueden ser además, subdivididas en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad ("CDRs"), entremezcladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de estructura ("FR"). La capacidad funcional de un anticuerpo para enlazarse a un antígeno particular o epítopo es ampliamente influenciada por las seis CDRs presentes en la región variable del anticuerpo. Cada HCVR y LCVR está compuesta de tres CDRs (HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en la HCVR y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en la LCVR) y cuatro FRs, arregladas a partir del término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las CDRs contienen la mayoría de los residuos los cuales forman interacciones específicas con el antígeno. El posicionamiento de CDR dentro de la región variable sigue a Kabat.

Las cadenas ligeras son clasificadas como kappa o lambda y caracterizadas por una región constante particular como se conoce en la técnica. Las cadenas pesadas son clasificadas como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente, y varios de estos pueden ser además divididos en las subclases por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃,

IgG₄. Cada tipo de cadena pesada es caracterizado por una región constante particular con una secuencia fácilmente conocida en el arte. La región constante de cadena ligera kappa y las regiones constantes de cadena pesada IgG₁, IgG₂, 5 IgG₃, IgG₄, son regiones constantes preferidas en los anticuerpos de la invención. Más preferiblemente, la región constante de cadena pesada comprende un polipéptido con una secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:38 como se codifica por un polinucleótido con la SEC ID NO:39. Los anticuerpos 10 quiméricos pueden tener regiones constantes de origen no humano, preferiblemente rata o murino.

Como se usa en la presente, la "región enlazante al antígeno", o "porción enlazante al antígeno", se refiere a aquella porción de una molécula de anticuerpo, dentro de la 15 región variable la cual contiene los residuos de aminoácido que interactúan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad para el antígeno. Esta porción de anticuerpo incluye los residuos de aminoácido de estructura, necesarios para mantener la conformación apropiada de los 20 residuos de enlace al antígeno.

Un anticuerpo preferido de la invención comprende seis CDRs con secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 20, 21, 22, 23, 24 y 25. Otro anticuerpo preferido de la invención comprende seis CDRs con secuencias de aminoácido de 25 las SEC ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36 y 37. Un anticuerpo más

preferido de la invención comprende seis CDRs con secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30 y 31. Las CDRs de estos anticuerpos preferidos, existen en la posición como se declara en la Tabla 1 siguiente. Las CDRs son
5 posicionadas en la región variable de conformidad con Kabat.

Un anticuerpo preferido de la invención comprende, una LCVR con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO 17, 18 o 19. Otros anticuerpos monoclonales preferidos de la invención comprende, una HCVR con secuencia de aminoácido de
10 la SEC ID NO: 14, 15 r 16. Más preferiblemente, un anticuerpo de la invención comprende una LCVR de la SEC ID NO: 17 y una HCVR de la SEC ID NO: 14. Un anticuerpo alternativo de la invención comprende, una LCVR de la SEC ID NO: 19 y una HCVR de la SEC ID NO:16. Un anticuerpo más
15 preferido de la invención comprende una LCVR de la SEC ID NO: 18 y una HCVR DE LA SEC ID NO: 15. Tales LCVRs son preferiblemente ligados a una región constante de cadena ligera, preferiblemente de origen humano, preferiblemente una cadena kappa. Tales HCVRs son preferiblemente operablemente
20 ligados a una región constante de cadena pesada, preferiblemente de origen humano, preferiblemente IgG₁ o IgG₄, más preferiblemente una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEC ID NO:38.

Un anticuerpo preferido de la invención comprende,
25 un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 2, y un

polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 5. El
polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 2 puede ser
codificado, por ejemplo, por una secuencia de polinucleótido
de la SEC ID NO: 8, el polipéptido de cadena ligera con la
5 SEC ID NO: 5 puede ser codificado, por ejemplo, por un
polinucleótido de la SEC ID NO: 11.

Otro anticuerpo preferido de la invención
comprende, un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO:
4 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 7. El
10 polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO:4 puede ser
codificado, por ejemplo, por una secuencia de polinucleótido
de la SEC ID NO: 10, el polipéptido de cadena ligera con la
SEC ID NO: 7 puede ser codificado, por ejemplo, por un
polinucleótido de la SEC ID NO: 13.

15 Otro anticuerpo preferido de la invención
comprende, un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO:
3 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 6. El
polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO:3 puede ser
codificado por una secuencia de polinucleótido de la SEC ID
20 NO: 9, el polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 6
puede ser codificado por un polinucleótido de la SEC ID NO:
12.

Los anticuerpos humanizados preferidos de la
invención, son referidos en la presente como 86, 88 y 89. Las
25 SEC ID NOS de sus secuencias son listadas en la Tabla 1

ph

siguiente.

Tabla 1 - SEC ID NOs de Proteínas

Anticuerpo	Cadena pesada	Caden a ligera	HCVR	CDR1 pesada	CDR2 pesada	CDR3 pesada	LCVR	CDR1 ligera	CDR2 ligera	CDR3 ligera
86	2	5	14	20	21	22	17	23	24	25
88	3	6	15	26	27	28	18	29	30	31
89	4	7	16	32	33	34	19	35	36	37

5
10
15
20

Preferiblemente, un anticuerpo de la invención en donde todas las seis CDRs, la HCVR, la LCVR, la HCVR y la LCVR, la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o la cadena pesada completa y la cadena ligera completa, están limitadas por una secuencia particular como se muestra por una SEC ID NO aquí (véase por ejemplo, Tabla 1), es además es además caracterizado por tener un K_D para esclerostina humana a 25°C de menos de aproximadamente 10 pM, 8 pM, 6 pM o 4 pM, más preferiblemente menos de aproximadamente 2.2 pM. Adicionalmente, se prefiere que tal anticuerpo sea además limitado por tener un K_D para esclerostina de mono cinomólogo a 25°C de menos de aproximadamente 100 pM, 90 pM o 80 pM, o más preferiblemente menos de aproximadamente 75 pM.

25

Preferiblemente, un anticuerpo de la invención, en donde las seis CDRs, la HCVR, la LCVR, la HCVR y la LCVR, la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o la cadena pesada completa y la cadena ligera completa, están limitadas por una secuencia particular como se muestra por una SEC ID NO aquí, es además caracterizado por tener un IC_{50}

en un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso, usando esclerostina humana (véase por ejemplo, el Ejemplo 2 aquí) de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40, 35, o 30 nM o menos, más preferiblemente aproximadamente 25 nM, aún más preferiblemente aproximadamente 20 nM (por ejemplo, 20.2 nM) o menos.

Más preferiblemente, un anticuerpo de la invención en donde las seis CDRs, la HCVR, la LCVR, la HCVR y la LCVR, la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o la cadena pesada completa y la cadena ligera completa están limitadas por una secuencia particular como se muestra por una SEC ID NO aquí, es además caracterizado por tener un K_D para esclerostina humana a 25°C o menos de aproximadamente 10 pM, 8 pM, 6 pM o 4 pM, más preferiblemente menos de aproximadamente 2.2 pM, y es también caracterizado por tener un IC_{50} en un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso, usando esclerostina humana de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40, 35, o 30 nM o menos, más preferiblemente aproximadamente 25 nM o menos, aún más preferiblemente aproximadamente 20 nM (e.g., 20.2 nM) o menos.

Aún más preferiblemente, un anticuerpo de la invención en donde las seis CDRs, la HCVR, la LCVR, la HCVR y la LCVR, la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o la cadena pesada completa y la cadena ligera

qb

completa están limitadas por una secuencia particular como se muestra por una SEC ID NO aquí, es además caracterizado por tener un K_D para esclerostina humana a 25°C o menos de aproximadamente 10 pM, 8 pM, 6 pM o 4 pM, más preferiblemente menos de aproximadamente 2.2 pM; es también caracterizado por tener un IC_{50} en un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso, usando esclerostina humana de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40, 35, o 30 nM o menos, más preferiblemente aproximadamente 25 nM o menos, aún más preferiblemente aproximadamente 20 nM (por ejemplo, 20.2 nM) o menos; y es también caracterizado por tener un IC_{50} en un ensayo de fosfatasa alcalina específica del hueso, usando esclerostina de mono cinomólogo de aproximadamente 75 nM o menos.

15

Expresión de Anticuerpo

La presente invención también se dirige a células hospederas que expresan un anticuerpo anti-esclerostina de la invención. La creación y aislamiento de las líneas de células hospederas que producen un anticuerpo de la invención, puede ser realizado usando técnicas estándares conocidas en el arte.

Una amplia variedad de sistemas de expresión hospederos conocidos en la técnica, pueden ser usados para expresar un anticuerpo de la presente invención que incluye,

sistemas de expresión procarióticos (bacteriales) y
eucarióticos (tales como levaduras, baculovirus, células de
planta, mamífero y otros animales, animales transgénicos y
células de hibridoma), así como también sistemas de expresión
5 de exhibición de fago.

Un anticuerpo de la invención puede ser preparado
por expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada
de inmunoglobulina en una célula hospedera. Para expresar un
anticuerpo recombinantemente, una célula hospedera es
10 transformada, transducida, infectada o similar, con uno o más
vectores de expresión recombinante que llevan fragmentos de
ADN que codifican las cadenas ligera y/o pesada de
inmunoglobulina del anticuerpo, de manera que las cadenas
ligera y/o pesada son expresadas en la célula hospedera. La
15 cadena ligera y cadena pesada puede ser expresada
independientemente de promotores diferentes a los cuales
están operablemente ligados en un vector o, alternativamente,
la cadena pesada y la cadena ligera pueden ser expresadas
independientemente de diferentes promotores a los cuales
20 están operablemente ligados en dos vectores -uno que expresa
la cadena pesada y uno que expresa la cadena ligera.
Opcionalmente, la cadena ligera y la cadena pesada pueden ser
expresadas en diferentes células hospederas.

Adicionalmente, el vector de expresión recombinante
25 puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de

la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo anti-esclerostina a partir de una célula hospedera. El gen de cadena ligera y/o pesada del anticuerpo anti-esclerostina, puede ser clonado en el vector de manera que el péptido señal es operablemente
5 ligado en estructura al término amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo. Preferiblemente, los anticuerpos recombinantes son secretados en el medio en el cual las células hospederas son cultivadas,
10 a partir del cual los anticuerpos pueden ser recuperados o purificados.

Un ADN aislado que codifica una región HCVR, puede ser convertido a un gen de cadena pesada de longitud completa operablemente enlazando el ADN que codifica a HCVR a otra
15 molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada. Las secuencias genes de región constante de cadena pesada de humano, así como también otras de mamífero, son conocidas en la técnica. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por ejemplo, por
20 amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser de región constante de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM o IgD), clases (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) o subclases y cualquier variante alotípica del mismo como se describe en Kabat (supra). Una
25 región constante de cadena pesada preferida comprende el

polipéptido de la SEC ID NO:38.

Un ADN aislado que codifica una región LCVR puede ser convertido a un gen de cadena ligera de longitud completa (así como también a un gen de cadena ligera Fab), enlazando operablemente el ADN que codifica LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena ligera. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera de humano, así como también otras de mamífero, son conocidas en la técnica. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación de PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Células hospederas de mamífero preferidas para uso en la invención, son células CHO (por ejemplo, ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0 y células COS (ATCC por ejemplo, CRL-1650, CRL-1651), HeLa (ATCC CCL-2). Células hospederas adicionales para uso en la invención incluyen otras células de mamífero, células de levadura y células procarióticas. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo son introducidos en células hospederas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospederas por un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospederas, o más preferiblemente, secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células

hospederas están creciendo. Los anticuerpos pueden ser recuperados de la célula hospedera y/o el medio de cultivo usando métodos de purificación estándar.

Una vez expresados, los anticuerpos intactos, cadenas pesadas y ligera individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, pueden ser purificados de conformidad con procedimientos estándares de la técnica, que incluyen precipitación de sulfato de amonio, intercambio iónico, afinidad, fase inversa, interacción hidrofóbica, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Las inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90%, 92%, 94% o 96% de homogeneidad son preferidas, y 98 a 99% o más homogeneidad más preferidas, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o a homogeneidad como se desee, los anticuerpos estériles pueden entonces ser usados terapéuticamente, como se dirige en la presente.

Anticuerpo Humanizado

Preferiblemente, un anticuerpo de la invención a ser usado para propósitos terapéuticos, tiene la secuencia de la estructura y región constante (en la magnitud que existe en el anticuerpo), derivada del mamífero en el cual podría ser usado como un terapéutico para reducir la posibilidad que el mamífero podría estimular una respuesta inmune contra el

anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos humanizados son de interés particular, puesto que son valiosos para aplicación terapéutica y disminuyen la probabilidad de una respuesta anticuerpo anti-ratón humano frecuentemente observada con anticuerpos de origen murino o anticuerpos que comprenden porciones las cuales son de origen murino cuando se administran a un sujeto humano. Los anticuerpos humanizados preferiblemente inyectados, pueden tener una vida media más similar que los anticuerpos humanos que se originan naturalmente, por ejemplo, anticuerpos murino, con ello permitiendo dosis más pequeñas y menos frecuentes para ser administradas a un sujeto.

El término "anticuerpo humanizado" como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo en donde al menos una porción es de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones derivadas de un anticuerpo de origen no humano, tal como un ratón, y porciones derivadas de un anticuerpo de origen humano, unidos en conjunto, por ejemplo, químicamente por técnicas convencionales (por ejemplo, sintéticas) o preparados como un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética.

Preferiblemente, un "anticuerpo humanizado" tiene CDRs que se originan de o se derivan de un anticuerpo precursor, es decir, un anticuerpo no humano (preferiblemente un anticuerpo monoclonal de ratón), mientras la región

102 ✓

constante y estructura, en la magnitud que se presentan, (o una porción significativa o sustancial de la misma, es decir, al menos aproximadamente 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%), son codificadas por información de secuencia de ácido nucleico que ocurre en la región de inmunoglobulina de línea germinal humana (véase por ejemplo, la Base de Datos Internacional ImMunoGeneTics) o en las formas mutadas o recombinadas de los mismos sean o no dichos anticuerpos producidos en una célula humana. Preferiblemente, al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs de un anticuerpo humanizado son optimizados a partir de las CDRs de un anticuerpo precursor no humano a partir del cual el anticuerpo humanizado se deriva para generar una propiedad deseada, por ejemplo, especificidad mejorada, afinidad o neutralización, las cuales pueden ser identificadas por un ensayo de selección por ejemplo, un ensayo ELISA. Preferiblemente, una CDR optimizada en un anticuerpo de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácido cuando se compara con aquella presente en el anticuerpo precursor. Ciertas sustituciones de aminoácido en las CDRs de anticuerpos humanizados 88 y 89 de la invención comparados con aquellos de anticuerpos precursores 788 y 789 (véase ejemplo 5 y 6 en la presente), reducen la probabilidad de inestabilidad del anticuerpo (por ejemplo, remoción de residuos Asn de CDR) o reducir la probabilidad de

103

inmunogenicidad del anticuerpo cuando se administra a un sujeto humano (por ejemplo, como se predice por Tecnología IMMUNOFILTER™).

Los anticuerpos humanizados preferiblemente
5 contienen secuencia mínima derivada de un anticuerpo no humano. Los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos los cuales no se encuentra en el recipiente del anticuerpo ni en la CDR o secuencias de estructura importadas a partir del anticuerpo precursor. Los anticuerpos
10 humanizados pueden ser sometidos a mutagénesis *in vitro* usando métodos de rutina usados en la técnica y, de este modo, las secuencias de amino ácido de región de estructura de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes humanizados son secuencias que, mientras se derivan de
15 aquellas relacionadas con las secuencias HCVR y LCVR de línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del reportorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*. Se contempla que tales secuencias de aminoácido de las regiones de estructura HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes
20 humanizados son al menos 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 98% o más preferiblemente al menos 99% o más preferiblemente 100% idéntico a una secuencia de línea germinal humana.

En modalidades preferidas, un anticuerpo humanizado de la presente invención comprende secuencias de estructura
25 de cadena ligera de línea germinal humana (véase por ejemplo,

PCT WO 2005/005604) y secuencias de estructura de cadena pesada de línea germinal humana (véase por ejemplo, PCT WO 2005/005604). Las regiones de estructura de cadena ligera de línea germinal humana preferidas son de un gen de cadena ligera kappa humana seleccionado del grupo que consiste de: A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, L1, L11, L12, L2, L5, L6, L8, O12, O2, y O8. Las regiones de estructura de cadena pesada de línea germinal humana preferidas son a partir de una cadena pesada humana seleccionada a partir del grupo que consiste de: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VH1-24, VH1-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VH1-18, VH1-69, VH3-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59, VH5-51 (véase, Solicitud Internacional No. WO2006/046935).

Existen métodos múltiples disponibles en la técnica para generar anticuerpos humanizados. Por ejemplo, anticuerpos humanizados pueden ser producidos obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican la HCVR y LCVR de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo murino o anticuerpo elaborado por un hibridoma), el cual se enlaza específicamente a esclerostina, preferiblemente esclerostina humana, identificando las CDRs en la HCVR como LCVR (no humano), e injertando tales secuencias de ácido nucleico que codifican CDR en secuencias de ácido nucleico que codifican estructuras humanas seleccionadas. Opcionalmente, una región

COS

CDR puede ser optimizada mutagenizando aleatoriamente o en ubicaciones particulares para sustituir uno o más aminoácidos en la CDR con un aminoácido diferente previo a injertar la región CDR en la región de estructura. Alternativamente, una
5 región CDR puede ser optimizada subsecuente a la inserción en la región de estructura humana usando métodos disponibles para uno de habilidad en la técnica.

Después que las secuencias que codifican CDR son injertadas sobre las secuencias codificantes de estructura humana, las secuencias de ADN resultantes que codifican las
10 secuencias ligera variable y pesada variable humanizadas, son entonces expresadas para producir un anticuerpo humanizado que se enlaza a esclerostina. Las HCVR y LCVR humanizadas pueden ser expresadas como parte de una molécula de
15 anticuerpo anti-esclerostina completo, es decir, como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humanas. Sin embargo, las secuencias HCVR y LCVR pueden también ser expresadas en la ausencia de secuencias constantes para producir un Fv anti-esclerostina humanizado.

20 Referencias adicionales que describen métodos involucrados en la humanización de un anticuerpo de ratón que puede ser usado incluyen, por ejemplo, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869, 1991 y el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522 (1986);
25 Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et*

106

al., Science, 239:1534 (1988)].

Usos de Diagnóstico

Un anticuerpo de la invención puede ser usado para
5 diagnosticar un trastorno o enfermedad asociada con la
expresión de esclerostina humana. En una manera similar, el
anticuerpo de la invención puede ser usado en un ensayo para
monitorear los niveles de esclerostina en un sujeto siendo
tratado para una condición asociada con esclerostina. Tales
10 aplicaciones incluyen métodos que utilizan un anticuerpo de
la invención y una etiqueta para detectar esclerostina en una
muestra biológica, por ejemplo, en un fluido corporal humano
o en un extracto de tejido o célula (véase por ejemplo,
Ejemplo 1 en la presente). Los anticuerpos de la invención
15 pueden ser usados con o sin modificación, y pueden ser
etiquetados por unión covalente o no covalente de una porción
detectable.

Una variedad de protocolos convencionales para
medir los niveles de esclerostina en una muestra biológica,
20 que incluyen por ejemplo, ELISAs, RIAs y FACS, son conocidos
en la técnica y proporcionan una base para diagnosticar
niveles alterados o anormales de expresión de esclerostina.
Los niveles de esclerostina estándares o normales presentes
en una muestra son establecidos usando cualquier técnica
25 conocida, por ejemplo, combinando una muestra que comprende

un polipéptido de esclerostina con por ejemplo, un anticuerpo de la invención bajo condiciones adecuadas para formar un complejo de antígeno:anticuerpo. El anticuerpo es directamente o indirectamente etiquetado con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. La cantidad de un complejo estándar formado es cuantificada por varios métodos, tales como por ejemplo, medios fotométricos. Las cantidades de polipéptido de esclerostina presentes en las muestras, son entonces comparadas con los valores estándares.

15 Usos Terapéuticos

La esclerostina funciona como un regulador negativo de formación ósea. (Véase por ejemplo, Cytokine & Growth Factor Reviews, 16:319-327, 2005). En adultos, el ARNm de esclerostina es principalmente detectado en osteocitos aunque se han encontrado concentraciones inferiores por los solicitantes en cartílago.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de la invención, puede ser usada para incrementar al menos de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o consistencia

106

ósea en ya sea hueso vertebral o no vertebral, o ambos, cuando una cantidad efectiva es administrada a un sujeto humano en necesidad de la misma. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de la invención, puede ser usada para reducir la incidencia de fractura de hueso vertebral y/o no vertebral, cuando una cantidad efectiva se administra a un sujeto humano en necesidad de la misma. Reducir la incidencia de fractura incluye reducir la probabilidad o incidencia actual de fractura para un sujeto humano, comparado con una población de control no tratada.

Además, un anticuerpo de la invención puede ser útil para el tratamiento de condiciones, enfermedades o trastornos en donde la presencia de esclerostina causa o contribuye a efectos patológicos indeseables o a una reducción de niveles de esclerostina o bioactividad de esclerostina que tiene un beneficio terapéutico en sujetos humano. Tales condiciones, enfermedades o trastornos incluyen, pero no se limitan a, osteoporosis, osteopenia, osteoartritis, dolor asociado con osteoartritis, enfermedad periodontal o mieloma múltiple. Los sujetos pueden ser varones o mujeres. Preferiblemente, un sujeto humano está en riesgo de fractura de vertebra y/o hueso no vertebral, más preferiblemente, un sujeto humano está en riesgo por, o de sufrir de, osteoporosis. El sujeto humano es preferiblemente

una mujer y más preferiblemente, una mujer en riesgo de, o que tiene osteoporosis post-menopáusica. Se contempla que el método de la invención puede beneficiar un sujeto en cualquier etapa de osteoporosis.

5 Adicionalmente, se contempla el uso de un anticuerpo de la invención para uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente.

10 Los términos "tratamiento" y "tratar", están propuestos para referirse a todos los procesos en donde puede ser una disminución, interrupción, arresto, control o detención del progreso de los trastornos descritos en la presente, pero no necesariamente indica una eliminación total de todos los síntomas del trastorno. "Tratamiento", como se
15 usa en la presente, incluye administración de un compuesto de la presente invención para tratamiento de una enfermedad o condición en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye: (a) inhibir el progreso adicional de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (b) aliviar la enfermedad,
20 es decir, causar la regresión de la enfermedad o trastorno o aliviar los síntomas o complicaciones de la misma. Los regímenes de dosificación pueden ser ajustados para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un bolo único puede ser
25 administrado, varias dosis divididas pueden ser administradas

con el tiempo, o la dosis puede ser proporcionalmente reducida o incrementada como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

5 Composición Farmacéutica

Un anticuerpo de la invención puede ser incorporado en una composición farmacéutica adecuad para administración a un sujeto humano. Un anticuerpo de la invención puede ser administrado a un sujeto humano solo o en combinación con un

10 portador farmacéuticamente aceptable y/o diluyente en dosis únicas o múltiples. Tales composiciones farmacéuticas están diseñadas para ser apropiadas para el modo seleccionado de administración, y diluyentes, portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes,

15 amortiguadores, tensoactivos, preservativos, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares, son usados como apropiados. Dichas composiciones pueden ser diseñadas de conformidad con las técnicas de invención descritas en, por ejemplo,

20 Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, el cual proporciona un compendio de técnicas de formulación que son en general conocidas por los especialistas. Los portadores adecuados para composiciones farmacéuticas incluyen cualquier

25 material el cual, cuando se combina con un anticuerpo

monoclonal de la invención, retiene la actividad de la molécula y no es reactivo con el sistema inmune del sujeto.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de la presente invención, puede ser administrada a un sujeto en riesgo de, o que exhibe patologías como se describe en la presente, por ejemplo, osteoporosis, osteoartritis u otros trastornos degenerativos óseos, usando técnicas de administración estándar.

10 Una composición farmacéutica de la invención, preferiblemente contiene una "cantidad efectiva" de un anticuerpo de la invención. Una cantidad efectiva se refiere a una cantidad necesaria (a dosificaciones y por periodos de tiempo y por los medios de administración), para lograr el
15 efecto terapéutico deseado. Una cantidad efectiva del anticuerpo puede variar de conformidad con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción del anticuerpo para estimular una respuesta deseada en el
20 individuo. Una cantidad efectiva o es también una en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo es excedido por los efectos terapéuticamente benéficos.

Una cantidad efectiva es al menos, la dosis mínima pero menor que una dosis tóxica de un agente activo, el cual
25 es necesario para impartir el beneficio terapéutico a un

112
sujeto. Declarado de otra forma, una cantidad efectiva o
cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la
invención, es una cantidad en la cual en mamíferos,
preferiblemente humanos (i) incrementa al menos uno de masa
5 ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o
consistencia ósea, o (ii) trata una condición, trastorno o
enfermedad en donde la presencia de esclerostina causa o
contribuye a un efecto patológico indeseable, o (iii) una
reducción en los niveles de esclerostina o bioactividad de
10 esclerostina resulta en un efecto terapéutico benéfico en un
mamífero, preferiblemente un humano, que incluye pero no se
limita a, osteoporosis, osteopenia, osteoartritis, artritis
reumatoide, enfermedad periodontal o mieloma múltiple.

Como es bien sabido en las artes médicas, las
15 dosificaciones por cualquier sujeto dependen de muchos
factores, que incluyen el tamaño del paciente, área de
superficie corporal, edad, el compuesto particular a ser
administrado, sexo, tiempo y ruta de administración, salud
general y otros fármacos siendo administrados
20 concurrentemente. Las dosis pueden además, variar dependiendo
del tipo y severidad de la enfermedad. Una dosis típica puede
estar por ejemplo, en el intervalo de 0.001 a 1000 µg;
preferiblemente 1 a 100 µg; sin embargo, dosis por arriba o
por debajo de este intervalo ejemplar están contempladas,
25 especialmente considerando los factores mencionados

113

anteriormente. Un régimen de dosificación parenteral diario puede ser aproximadamente 0.1 µg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal total, preferiblemente, desde aproximadamente 0.3 µg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. El
5 progreso puede ser monitoreado por valoración periódica y la dosis ajustada por consiguiente.

Estas cantidades sugeridas de anticuerpo son sometidas a un arreglo mayor de discreción terapéutica. El factor clave en seleccionar una dosis y programación
10 apropiados, es el resultado obtenido. Los factores para consideración en este contexto incluyen, el trastorno particular siendo tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del anticuerpo, el tipo particular de anticuerpo, el método
15 de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los especialistas médicos.

La ruta de administración de un anticuerpo de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención
20 pueden ser incorporados en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. El término parenteral como se usa en la presente, incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. El suministro parenteral por inyección
25 intravenosa o intraperitoneal o subcutánea es preferido. La

inyección subcutánea es más preferida. Los vehículos adecuados para tales inyecciones son bien conocidos en la técnica.

La composición farmacéutica típicamente debe ser
5 estéril y adecuada bajo las condiciones de manufactura y
almacenaje en el contenedor proporcionado, que incluyen por
ejemplo, un vial sellado, jeringa u otro dispositivo de
suministro, por ejemplo, una pluma. Por lo tanto, las
composiciones farmacéuticas pueden ser filtradas estéril
10 después de elaborar la formulación, o de otro modo hechas
microbiológicamente aceptables.

Los siguientes ejemplos son ofrecidos para
propósitos ilustrativos solamente, y no están propuestos para
limitar el campo de la presente invención.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Ensayo ELISA

Este ensayo se usó para detectar y cuantificar
esclerostina en muestras de suero humano para un límite de
20 detección inferior de 0.4 ng/ml. El anticuerpo 86 es el
anticuerpo de captura, mientras el anticuerpo 88 es el
anticuerpo de detección (véase Tabla 1 para secuencias de
anticuerpo).

Las cavidades internas de una placa de 96 cavidades
25 se recubrieron con 100 μ l de anticuerpo monoclonal anti-

115

esclerostina de longitud completa 86 a una concentración de 0.5 µg/ml en carbonato de sodio 0.5M a pH 9.6 ("amortiguador de recubrimiento"). La placa se selló y se incubó durante la noche a 4°C. La placa después se lavó tres veces con "amortiguador de lavado" TBST (Tris-HCl 0.4M, NaCl 3M, 0.1% de Tween 20). Después se agregó 200 µl de amortiguador de bloqueo caseína en PBS (Pierce, #37529) por cavidad y la placa se incubó por una hora a temperatura ambiente. La placa después se lavó dos veces en amortiguador de lavado para remover la solución de bloqueo.

Para generar una curva, se preparó esclerostina humana a una concentración de 0.35 mg/ml en amortiguador de bloqueo caseína y serialmente se diluyó dos veces (a partir de 1.25 ng/ml a 0 ng/ml) en 5% de suero humano combinado en amortiguador de bloqueo caseína en PBS. El suero humano se corrió sobre una columna de perllas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-esclerostina 86 para remover cualquier esclerostina que pueda estar endógenamente presente en el suero.

Se agregaron cien microlitros de muestras (5% de suero en amortiguador de bloqueo de caseína) o estándares a cavidades en duplicado y la placa se incubó adicionalmente a temperatura ambiente por dos horas. Las cavidades después se lavaron 5 veces con amortiguador de lavado.

Se agregó por cavidad cien microlitros de

anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal anti-esclerostina de longitud completa 88) el cual se ha biotinilado con el kit de biotina NHS-LC unido Pierce EZ. La placa se incubó a temperatura ambiente por una hora y después se lavó cuatro veces con amortiguador de lavado. Se diluyó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante 1:2000 en amortiguador de bloqueo caseína en PBS a una concentración final de 0.5 µg/ml, después se agregó 100 µl por cavidad, se incubó a temperatura ambiente por una hora y después se lavó 7 veces con amortiguador de lavado. Se agregó sustrato OPD (Sigma P8806) a 100 µl/cavidad y la reacción se dejó continuar a temperatura ambiente por 20 minutos. La reacción después se terminó agregando 100 µl/cavidad de HCl 1N. La placa se leyó a 490 nm OD.

15

Ejemplo 2 Neutralización - ensayo de fosfatasa alcalina específica ósea

La fosfatasa alcalina específica ósea es un indicador bioquímico de actividad osteoblasto. El ensayo de fosfatasa alcalina específica ósea descrito en la presente, se basa en la capacidad de esclerostina para disminuir BMP-4 y niveles de fosfatasa alcalina estimulada por Wnt3a en la línea de célula murina multipotencial, C1C12, mientras un anticuerpo el cual neutraliza la actividad de esclerostina puede resultar en un incremento dependiente de la dosis de

actividad de fosfatasa alcalina en este ensayo. Wnt3a y BMP-4 son factores de crecimiento osteogénico.

Las células C1C12 (ATCC, CRL 1772) se colocan a 3000-5000 células por cavidad en una placa de cultivo de
5 tejido de 96 cavidades en medio MEM, suplementado con suero de bovino fetal al 5%, después se incubó a 37°C en CO₂ al 5% durante la noche. El anticuerpo a ser probado se diluyó en medio acondicionado con Wnt3a 0.5X a varias concentraciones finales. El medio después se removió de las células en la
10 placa de cultivo de tejido y se agregó 150 µl por cavidad de una solución de anticuerpo BMP4-esclerostina pre-mezclada (humano o mono cinomólogo) en el anticuerpo a una concentración final de 30 µg/ml a 0.5 µg/ml, BMP-4 está a una concentración final de 25 ng/ml y la proteína esclerostina
15 está a una concentración final de 1.0 µg/ml y el medio acondicionado está a una concentración de 0.5X. La placa después se incubó a 37°C en CO₂ al 5% por 72 horas. El medio se removió de las células en la placa de cultivo de tejido, las células se lavaron una vez con PBS, después la placa de
20 células se congeló y se descongeló tres veces alternando entre -80°C y 37°C.

Se preparó el medio acondicionado Wnt3a haciendo crecer células L-Wnt3A y células L de control (ATCC CRL-2647 y CRL-2648, respectivamente) por cuatro días, de una división
25 1:20 de células confluentes, en DMEM con 10% de FBS y 2 mM de

11/8

L-glutamina. El medio recolectado se filtró a través de una membrana de nylon de 0.2 micrones y se almacenó a -20°C por un periodo prolongado o 4°C por periodo corto.

Se midió la actividad de fosfatasa alcalina agregando 150 µl por cavidad de sustrato de fosfatasa alcalina (PNPP de 1 etapa, Pierce #37621). La placa de células después se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente tiempo en el cual se leyó OD a 405 nm para determinar la actividad de fosfatasa alcalina. Los valores IC₅₀ de neutralización del anticuerpo, reportados en la Tabla 2 posterior son promedios de 2 experimentos separados. Se realizaron los cálculos IC₅₀ usando una Aplicación de Regresión SigmaPlot con una ecuación fija de 4 parámetros Sigmoide.

15

Tabla 2

20

ANTICUERPO	IC ₅₀ (NM) USANDO ESCLEROSTINA HUMANA	IC ₅₀ (NM) USANDO ESCLEROSTINA CINO
89	25.1	34.4
88	20.2	23.7
86	25.5	31.6

Ejemplo 3 Enlace de afinidad

Se realizaron estudios de enlace de equilibrio entre un anticuerpo anti-esclerostina y esclerostina tanto de

25

119

humano, mono cinomólogo ("cino") como de rata en un instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Inc.) bajo condiciones controladas K_D . Con esta técnica, se mezcló una concentración fija del anticuerpo por debajo de su K_D con
5 varias concentraciones de proteína de esclerostina y se dejó llevar a equilibrio. Se probó la fracción de anticuerpo libre, no unido restante en solución exponiendo brevemente esta mezcla equilibrada a perllas recubiertas con esclerostina después de la detección con un anticuerpo
10 secundario fluorescentemente etiquetado. Típicamente se mezcló 2 pM de un anticuerpo anti-esclerostina a ser probado con concentraciones variantes de esclerostina humana, cino o rata iniciando a 2-50 nM y se realizaron diluciones seriales tres veces en amortiguador de enlace (solución salina
15 amortiguada de fosfato 1X, pH 7.4, 0.02% de azida de sodio y 1 mg/ml de albúmina de suero de bovino) que contiene 2 pM del anticuerpo a ser probado. Estas soluciones se dejaron alcanzar equilibrio durante dos días a 25°C. La cantidad de anticuerpo no enlazado se probó usando perllas de azlactona
20 recubiertas con esclerostina humana (Sapidyne Instruments Inc.). Estas perllas se prepararon haciendo reaccionar 50 mg de perllas de azlactona seca con 50 mcg/ml de esclerostina humana en 50 mM de un amortiguador de carbonato de sodio a pH 9.0-9.6 con rotación durante la noche. Las
25 perllas después se dejaron asentarse y lo sobrenadante se

no

reemplazaron con soluciones de bloqueo (Tris 1M, pH 8.0, más 10 mg/ml de albúmina de suero bovino) y se giró por una hora. Esta base de perlilla se diluyó 20 veces en amortiguador de enlace y se usó dentro de los siguientes tres días. Se usó un

5 instrumento KinExA 3000 equilibrado a temperatura ambiente (ca 25°C) para estudios de enlace. Típicamente se extrajeron 6.25 ml de la solución anticuerpo/esclerostina equilibrada sobre una columna de perlilla de esclerostina humana-azlactona a velocidad de flujo de 0.25 ml/minuto después se

10 enjuagó con amortiguador de corrida (solución salina amortiguada de fosfato 1X, pH 7.4 con 0.02% de azida de sodio). La fracción de anticuerpo anti-esclerostina libre unida a estas perlillas se cuantificó midiendo la fluorescencia resultante de un anticuerpo secundario

15 etiquetado inyectado (anticuerpo Fab'2 anti-humano de cabra etiquetado Cy5). Se analizaron dos muestras replicadas para cada condición y se determinó K_D por datos ajustados a un modelo de enlace 1:1 usando el software KinExA. El promedio de los valores K_D a 25°C se reportaron en la Tabla 3

20 posterior.

121

Tabla 3 - Afinidad

ANTICUERPO	ESCLEROSTINA HUMANA K _D (PM)	ESCLEROSTINA DE RATA K _D (PM)	ESCLEROSTINA CINO K _D (PM)
89	0.3	0.4	1.4
88	2.2	2.2	75

Ejemplo 4 Ensayo de calceína in vivo:

El ensayo de calceína de rata se evaluó directamente de formación ósea durante un periodo corto (10 días) de tiempo y el efecto de un anticuerpo de la invención en formación ósea. La calceína es una etiqueta de fluorocromo la cual se incorporó en la matriz ósea durante nueva formación ósea. La medición cuantitativa de calceína refleja el grado de formación ósea inducida por agentes farmacológicos. Se usaron ratas Sprague-Dawley hembras de seis meses de edad (n=6/grupo de dosis). Las ratas se dosificaron cada 3 días por inyección subcutánea (días 0, 3 y 6) con 1 mg/kg o 6 mg/kg de anticuerpo en vehículo PBS, o con 10 µg/kg de PTH diario o con 6 mg/kg de IgG humano como un control negativo. La calceína se inyectó subcutáneamente en el día 7 y las ratas se sacrificaron en el día 10. Se recolectaron las tibias y se cortaron para evaluar la formación ósea trabecular (metáfisis distal) o formación ósea cortical (diáfisis tibial) y se sometió a desmineralización y cuantificación del fluorocromo de calceína total. Los valores

122

mostrados en la Tabla 4 posterior, son promedios con el control IgG humano fijado a 1.0. Los datos demostraron que la administración de anticuerpos de la invención, conduce a formación ósea tanto trabecular como cortical.

5

Tabla 4

ANTICUERP O	DOSIS MG/KG	CALCEÍNA TRABECULAR RELATIVA	CALCEÍNA CORTICAL RELATIVA
Hu IgG	6	1.00	1.00
PTH	.01	1.45	1.89
89	6	1.97	1.88
88	6	1.90	2.18
86	6	1.77	2.78

10

Ejemplo 5 Osteoartritis

15

La expresión SOST es principalmente confinada a tejido óseo. Sin embargo, se determinó que otro tejido con expresión SOST significativa es cartílago como se midió por PCR en tiempo real. También se observó la expresión de cartílago de SOST usando un arreglo de ARN aislado a partir del cartílago de pacientes normales u osteoartríticos. Además, en el arreglo, la expresión de SOST se incrementa relativamente para severidad de osteoartritis de forma que la expresión en cartílago de osteoartritis media es mayor que el control, severo es mayor que medio, y cirugía severa (removido por cirugía de reemplazo rodilla) en mayor que

20

25

123

todas las otras que demuestran una correlación de osteoartritis y expresión SOST. Un anticuerpo específico a esclerostina se puede usar para tratar osteoartritis.

Un anticuerpo quimérico anti-esclerótico con una
5 región variable murina en una región Fc de rata, anticuerpo 789 con SEC ID NO: 42 para cadena pesada y SEC ID NO: 43 para cadena ligera, se listan por la capacidad para bloquear el dolor en la articulación en el modelo MIA de osteoartritis. La región variable de este anticuerpo, fue la presente
10 secuencia para generación del anticuerpo 89 humanizado (HCVR con la SEC ID: 16 y LCVR con la SEC ID NO: 9). Tanto anticuerpo humanizado 89 como anticuerpo quimérico 789 enlaza el mismo epítotope. Este modelo de osteoartritis utiliza inyecciones de monoyodoacetato (MIA) directamente en la
15 articulación de la rodilla para inducir un proceso similar a OA que involucra un dolor mediado por citocina e inflamatorio y proceso de destrucción del cartílago. La rodilla contralateral de una rata se inyectó con únicamente salina, y el dolor se midió como la diferencia entre el peso que se
20 produce de las 2 patas traseras.

El experimento MIA #1 utiliza ratas Lewis jóvenes (7-8 semanas de edad) en "forma de prevención", en donde el anticuerpo anti-esclerostina se administró antes por inyección MIA. El día previo a inyecciones MIA, las ratas se
25 inyectaron con cualquiera de 10 mg/kg de anticuerpo anti-

esclerostina, i.p. o 10 mg/ml de IgG control, o PBS (n = 6 por grupo). Al siguiente día, las ratas se anestesiaron y las rodillas derechas se inyectaron con 0.3 mg de yodoacetato de monosodio disuelto en 50 μ l de 0.9% de salina estéril. Las rodillas izquierdas se inyectaron con solo salina. Las inyecciones son a través del ligamento rotular usando una jeringa de insulina con una aguja 28G cubierta con una envoltura de entubamiento de plástico que permite únicamente 5 mm de penetración en la articulación de la rodilla.

10 Se tomaron mediciones de dolor 2 y 7 días después de la inyección MIA (3 y 8 días después de la inyección del anticuerpo). Después de la medición de dolor en el día 7, se administró una segunda dosis del anticuerpo o inyección control. Después se tomaron mediciones de dolor adicional 10 y 14 días después de MIA (3 y 7 días después de la segunda inyección del anticuerpo).

20 Se midió el dolor por diferencia en peso que se produce de las patas inyectadas a través del uso de un probador de incapacitación. Las ratas se colocaron en una caja Perspex con sus patas traseras en los sensores de presión. Cuando las ratas están confiadas, se tomó una lectura de 1 segundo, seguida por 2 lecturas adicionales y se calculó el promedio. El peso colocado en la pata inyectada con MIA se resta de la pata inyectada con salina para dar la 25 diferencia en peso producido.

129

Se observó una disminución estadísticamente significativa con el anticuerpo anti-esclerostina comparado a IgG control (y PBS) en los días 7, 10 y 14 después de la administración de MIA (Tabla 5 posterior). Los valores son pesos que producen diferencia entre la pata inyectada con MIA y la pata inyectada con salina en gramos (error estándar de la media).

Se llevó a cabo un segundo experimento MIA con ratas más viejas (27 semanas de edad) y en "forma de tratamiento" en donde el anticuerpo se administró después de la inyección MIA. Las ratas recibieron inyecciones de MIA o salina de control como anteriormente y después el día 6 más tarde, se inyectó i.p., 10 mg/kg de anticuerpo anti-esclerostina, IgG control o PBS (n = 6 por grupo). En los días 8 y 15 después de MIA (2 y 9 días después del anticuerpo) se tomaron mediciones de dolor como anteriormente. En el día 16 después de MIA, se administró una segunda dosis del anticuerpo anti-esclerostina y se administraron los controles, y en el día 21 (5 días después de la segunda dosis de anticuerpo) las mediciones de dolor nuevamente se recolectan.

En el primer punto de tiempo después de la administración del anticuerpo anti-esclerostina (día 8 después de MIA) no existe efecto del anticuerpo en dolor, pero 7 días más tarde, existe una tendencia hacia disminución

de dolor como se midió por peso que produce diferencia entre la pata inyectada con MIA y la pata inyectada con salina en gramos. La tendencia hacia reducir el dolor con anticuerpo anti-esclerostina también se observa el día 5 después de la segunda dosificación del anticuerpo. El anticuerpo quimérico 789 difiere del IgG control con un valor p de 0.06 y 0.08 en el día 15 y 21 respectivamente. Juntos, estos resultados demostraron que el dolor de articulación resultante del proceso de enfermedad de MIA establecido se interrumpe administrando anticuerpo anti-esclerostina neutralizante.

Ejemplo 6 Estudios de Rata OVX

La rata ovariectomizada (OVX) es un modelo bien reconocido para osteoporosis post-menopáusica. En este estudio, los efectos de anticuerpos anti-esclerostina de la invención que comprende una región variable de murina y un Fc de rata se examinaron en la rata OVX.

Se ovariectomizaron ratas Sprague-Dawley hembras de seis meses de edad y se permitió pérdida ósea por 1 mes antes de la dosificación. Un grupo de ratas ($n = 8$) no se ovariectomizaron, pero se operaron falsamente para comparación ósea a ratas ovariectomizadas. Todas las ratas OVX se formaron al azar en grupos de tratamiento ($n = 7$ cada uno) y se trataron con cualquiera de PTH (1-38), IgG control (10 mg/kg) o 10 mg/kg de anticuerpo anti-esclerostina

quimérico (Anticuerpo 788 con cadena pesada de SEC ID NO: 40 y cadena ligera de SEC ID NO: 41 [la región variable de este anticuerpo es la secuencia principal para generación del anticuerpo humanizado 88]; Anticuerpo 789 con cadena pesada de SEC ID NO: 42 y cadena ligera de SEC ID NO: 43) para un total de 58 días. Los anticuerpos son todos dosificados subcutáneamente una vez cada 3 días, mientras el PTH (1-38) se dosifica diariamente subcutáneamente a 10 mg/kg. Hasta el sacrificio, se remueven los fémures y vértebras para análisis de tomografía computarizada cuantitativa (CT) usando un escáner CT para medir el fémur distal (hueso trabecular) y eje medio (hueso cortical) así como la 5ta vértebra lumbar. Los huesos se colocaron en arcilla para moldear para mediciones reproducibles y se tomaron exploraciones de los fémures 2 mm del final de la epífisis (fémur distal) o 10 mm de la epífisis (fémur del eje medio).

Se realizaron mediciones vertebrales con exploración de L-5 de una estructura en "V" de marca en la vértebra. Los datos se calcularon por paquetes de software manufacturados SYS-C320-V 1.5. Las propiedades bioquímicas de la diáfisis femoral, la vértebra L-5 y cuello femoral se midieron después de la necropsia de conformidad con: Turner CH, Burr DB, Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone 14(4):595-608, 1993. Se midieron las propiedades mecánicas del eje medio para el fémur trasero

178

intacto usando flexión de 3 puntos con carga aplicada al camino entre dos soportes de 15 mm de separación. El fémur se colocó de esta forma, el punto de carga es aproximadamente 7.5 próximo del espacio popliteal distal y ocurre una flexión aproximadamente en el eje lateral medio. Se probaron especímenes en un baño de salina a 37°C. Se registraron las curvas de desplazamiento de carga a una velocidad de corredera de 10 mm/min, usando una máquina de prueba materiales (modelo: 1/S, MTS Corp, Minneapolis, MN) y se analizó usando el software TestWorks 4 (MTS Corp.) para calcular la carga de pico. Las propiedades mecánicas de la vértebra L-5 se analizaron después de los procesos posteriores y se removieron, y los extremos del centro de hicieron paralelo usando una sierra de corte de laminilla de diamante (Buehler Isomet, Evanston, IL). Los especímenes de vertebras se cargaron en compresión usando los materiales del dispositivo de prueba y se analizaron usando software TestWorks 4 (MTS Corp.). Para mediciones de cuello femorales, el fémur es posicionado verticalmente en un mandril de montaje con el lado hacia arriba próximo y se aplica carga descendentemente al punto medio de la cabeza femoral. El análisis fue con el software TestWorks 4 (MTS Corp.). Los valores promedio y el error estándar de los valores medios están en la Tabla 5 y 6 abajo. Los datos demuestran que los anticuerpos quiméricos 788 y 789 incrementan la densidad

179

mineral ósea ("BMD"), contenido mineral óseo ("BMC"), consistencia ósea (carga máxima) en ratas OVX.

Tabla 5

Tratamiento	Fémur dist. BMD (mg/cm ³)	Fémur dist. BMC (mg)	Fémur medio BMD (mg/cm ³)	Fémur Medio BMC (mg)	BMD vertebral (mg/cm ³)	BMC vertebral (mg)
Falso	*602	74.1	898	61.2	*587	165
IgG	528	68.6	852	60.5	526	149
PTH	*744	*95.3	*925	63.2	*642	*180
788	*675	*91.4	*946	*68.6	*703	*209
789	*710	*94.9	*951	*68.4	*721	*209

* Incremento estadísticamente significativo a partir de IgG de control, p<0.05, Método Dunnett.

Tabla 6

Tratamiento	Carga máxima cuello femoral (Newtons)	Carga máxima fémur medio (Newtons)	Carga máxima vertebra (Newtons)
Falso	96.5	134	236
IgG	100.4	126	188
PTH	117.6	128	*328
2492788	*131.6	*147	*431
2492789	*147.5	*153	*432

* Incremento estadísticamente significativo a partir de IgG de control, p<0.05, Método Dunnett.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5

1. Un anticuerpo que se enlaza específicamente a esclerostina humana y que comprende seis CDR con secuencias de aminoácido seleccionadas a partir del grupo que consiste de:

10 i) HCDR1 con la SEC ID NO: 20, HCDR2 con la SEC ID NO: 21, HCDR3 con la SEC ID NO: 22, LCDR1 con la SEC ID NO: 23, LCDR2 con la SEC ID NO: 24 y LCDR3 con la SEC ID NO: 25;

ii) HCDR1 con la SEC ID NO: 26, HCDR2 con la SEC ID NO: 27, HCDR3 con la SEC ID NO: 28, LCDR1 con la SEC ID NO: 29, LCDR2 con la SEC ID NO: 30 y LCDR3 con la SEC ID NO: 31; y

iii) HCDR1 con la SEC ID NO: 32, HCDR2 con la SEC ID NO: 33, HCDR3 con la SEC ID NO: 34, LCDR1 con la SEC ID NO: 35, LCDR2 con la SEC ID NO: 36 y LCDR3 con la SEC ID NO: 37;

caracterizado porque el anticuerpo es distinguido por al menos uno de los siguientes:

i) un K_D para esclerostina humana de 10 pM o menos a 25°C;

25 ii) un K_D para esclerostina de mono cinomólogo de

B1

100 pM o menos a 25°C; o

iii) un IC_{50} de 50 nM o menos en un ensayo de fosfatasa alcalina específico del hueso usando esclerostina humana.

5 2. Un anticuerpo que se enlaza específicamente a esclerostina humana y comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, caracterizado porque,

10 i) la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 14 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 17;

15 ii) la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 15 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 18; o

20 iii) la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 19.

3. Un anticuerpo que se enlaza específicamente a esclerostina humana y comprende un polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera caracterizado porque,

25 i) el polipéptido de cadena pesada tiene la

132

secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 5;

5 ii) el polipéptido de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 3 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 6; o

10 iii) el polipéptido de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 4 y el polipéptido de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 7.

4. Un anticuerpo, caracterizado porque se enlaza específicamente a esclerostina humana y comprende un polipéptido de cadena pesada con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 3 y un polipéptido de cadena ligera con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 6.

5. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, caracterizado porque el anticuerpo tiene un K_D para esclerostina humana de 10 pM o menos a 25°C.

20 6. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, caracterizado porque el anticuerpo tiene un K_D para esclerostina humana de 2.2 pM o menos a 25°C.

25 7. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, caracterizado porque el anticuerpo

B3

tiene un IC_{50} de 50 nM o menos en un ensayo de fosfatasa alcalina específico del hueso usando esclerostina humana.

8. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el anticuerpo
5 comprende una región constante de cadena pesada seleccionada a partir del grupo que consiste de la región constante de cadena pesada de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ humano y un polipéptido con la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 38.

9. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de
10 las reivindicaciones 1-8, para uso en la preparación de un medicamento.

10. El anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en un método para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea,
15 contenido mineral óseo o consistencia ósea en un sujeto humano.

11. Uso de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para la preparación de un medicamento para incrementar al menos uno de masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o consistencia
20 ósea en un sujeto humano.

12. Uso de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o
25 trastorno seleccionado a partir del grupo que consiste de

B4

osteoporosis, osteopenia, osteoartritis, artritis reumatoide, enfermedad periodontal o mieloma múltiple en un sujeto humano.

13. Un método para incrementar al menos uno de
5 masa ósea, densidad mineral ósea, contenido mineral óseo o consistencia ósea en un sujeto humano en necesidad del mismo, caracterizado porque comprende administrar al sujeto humano, una cantidad efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

10 14. Un método para tratar una enfermedad o trastorno seleccionado a partir del grupo que consiste de osteoporosis, osteopenia, osteoartritis, dolor asociado con osteoartritis, enfermedad periodontal o mieloma múltiple en un sujeto humano en necesidad del mismo, caracterizado porque
15 comprende administrar al sujeto humano, una cantidad efectiva de un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

15. Un método para tratar osteoporosis en un sujeto humano en necesidad del mismo, caracterizado porque
20 comprende administrar al sujeto humano, una cantidad efectiva de un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 3 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 6.

16. Una composición farmacéutica, caracterizada
25 porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera

de las reivindicaciones 1-8, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

17. Un método para detectar proteína esclerostina en una muestra biológica, caracterizado porque comprende
5 incubar un anticuerpo seleccionado a partir del grupo que consiste de:

i) un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO:40 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 41; y

10 ii) un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 42, y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 43;

iii) un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 2 y un polipéptido de cadena
15 ligera con la SEC ID NO: 5;

iv) un anticuerpo que comprende un polipéptido de cadena pesada con la SEC ID NO: 3 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 6; y

v) un anticuerpo que comprende un polipéptido de
20 cadena pesada con la SEC ID NO: 4 y un polipéptido de cadena ligera con la SEC ID NO: 7;

con la muestra biológica bajo condiciones y por un tiempo suficiente para permitir a dicho anticuerpo enlazar a la proteína esclerostina y detectar dicho enlace.

136

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados y quiméricos que enlazan específicamente
5 esclerostina humana y son caracterizados por tener propiedades neutralizantes fuertes y alta afinidad. Los anticuerpos de la invención son útiles para incrementar la masa ósea, densidad mineral ósea y consistencia ósea, para el
tratamiento de varios trastornos, por ejemplo, osteoporosis,
10 en un sujeto humano.

137

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Eli Lilly and Company
Korytko, Andrew I.
Marquis, David Matthew
Smith , Eric Michael
Swanson , Barbara Anne

<120> **Anticuerpos Anti-Esclerostina**

<130> X17563

<150> US 60/895813

<151> 2007-03-20

<160> 43

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
1 5 10 15

Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
20 25 30

Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
35 40 45

Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
50 55 60

Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
65 70 75 80

Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
85 90 95

Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
100 105 110

Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
115 120 125

Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
130 135 140

Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
145 150 155 160

Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
165 170 175

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
180 185 190

Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
195 200 205

Leu Glu Asn Ala Tyr
210

<210> 2

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 2

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

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

139

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Tyr His Asp Gly Thr Thr Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

140

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 3
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 3

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 Val Ser Gly Phe Pro Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Trp Ser Asp Pro Glu Ile Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Gly Asp Thr Thr Tyr Lys Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 4
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 4

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 Asp Phe Glu Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg 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 Glu Gly Tyr Tyr Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Gly
450

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

MB

<223> Constructo Misceláneo

<400> 5

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 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Gln Trp Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

147

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 6

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Glu Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

144

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

- <210> 8
- <211> 1332
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Constructo Misceláneo

150

<400> 8

caggtgcagc tggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtctc agtgaagggt 60
 tcctgcaagg catctggata cacattcact gactacttc tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaact attatcctt accatgatgg tactacctac 180
 tctcagaagt tcaagggcag agtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaggaa 300
 gaggatggc agttcgacta ctggggccaa ggaaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcggctct cccgctagcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccac gccaccctg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agttctctg 720
 ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagtta actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggatgata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 cccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacgagc acatcgccgt ggagtgggaa 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cctgtctgga ctccgacggc 1200
 tccttctcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gt 1332

<210> 9

<211> 1332

151

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 9

caggttcagc tgggcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggct 60
tctgcaagg ttccggctt cccattaag gacaccttc agcactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggctgagtg gatgggatgg agcgatcctg agatcgggta tactgaatat 180
gcctgaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggcgac 300
accacataca agtttgactt ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
accaagggcc catcggctct cccgctagcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
ggcccccat gccacccctg cccagcacct gagtctctgg ggggaccatc agtcttctg 720
ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagtca actggtacgt ggatggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatccagg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggaa 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttctcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
ttctatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320

152

ctgtctctgg gt

1332

<210> 10

<211> 1350

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 10

gagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

ttctgtaagg gttctgactt cgagattaaa gactactata tacattgggt gcgccagatg 120

cccggaag gcctggagtg gatggggcag attgatgctg aggatggatga aactgaatat 180

gccccgaggt tccagggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagagagggt 300

tattactacg atgggcgcga ctactggtac ttcatgtct ggggccaagg gaccacggtc 360

accgtctct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc cgctagcgcc ctgctccagg 420

agcacctccg agagcacagc cgccctgggc tgctgtgtca aggactactt ccccgaaccg 480

gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgacacactt cccggctgtc 540

ctacagtct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600

ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660

agagttgagt ccaaataatg tccccatgc ccacctgcc cagcacctga gttctgggg 720

ggaccatcag tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctccggacc 780

cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag acccgaggt ccagttcaac 840

tggtagctgg atggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagttc 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc accgtctgc accaggactg gctgaacggc 960

aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa ggctcccggt cctccatcga gaaaaccatc 1020

tcaaagcca aagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca cctgcccc atcccaggag 1080

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta cccagcgac 1140

atgccgtgg agtgggaaag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg 1260

tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgtcc gtgatgatg aggctctgca caaccactac 1320

acacagaaga gcctctccct gtctctgggt 1350

<210> 11

<211> 642

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 11

gacatccaga tgaccagtc tccatctct ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca gtgcaagtca gggcattcag tggatttaa actggatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctct gatctattac acatcaagtt tacactcagg ggtcccatca 180

aggttcagt gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttg caactacta ctgtcagcag catagtaaac ttctcggac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa acggactgtg gctgcacat ctgtctcat ctcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtt gcctgtgaa taactctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 12

<211> 642

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 12

154

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc ggaatgtcac actgctgtag cctggatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattgg gcatccaccc ggtggactgg agtcccatca 180
 aggttcagt gcaatggatc tgggacagat ttcacttca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa tatagcgatt atccgtggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acggactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtgtgt gctgctgaa taacttctat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 13
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo Misceláneo

<400> 13
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctgca gtccagctc aagtgtagt tacatccact ggtaccaaca gaaacctggc 120
 caggctcca ggctcctcat ctatagcaca tccgagctgg cttctggcat cccagccagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa 240
 gattttgcag ttattactg tcagcagctt agtcatctcc cgctcacgtt cggcggaggg 300
 accaagggtg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatct cccgcatct 360
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 agagaggcca aagtacagt gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540

15

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600
 agctgccccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgc 639

<210> 14
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo Misceláneo

<400> 14

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

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

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Tyr His Asp Gly Thr Thr Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 118
 <212> PRT

150

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 15

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 Val Ser Gly Phe Pro Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Gly Trp Ser Asp Pro Glu Ile Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Gly Asp Thr Thr Tyr Lys Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 16

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 Asp Phe Glu Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg 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 Glu Gly Tyr Tyr Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 17

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 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Gln Trp Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo Misceláneo

<400> 18

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

154

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 19
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 19

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Glu Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

160

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 21

Thr Ile Tyr Pro Tyr His Asp Gly Thr Thr Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 22

Glu Glu Glu Asp Gly Gln Phe Asp Tyr
1 5

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 23

161

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Gln Trp Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 24

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 25

Gln Gln His Ser Lys Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 26

Gly Phe Pro Ile Lys Asp Thr Phe Gln His
1 5 10

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

162

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 27

Trp Ser Asp Pro Glu Ile Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 28

Gly Asp Thr Thr Tyr Lys Phe Asp Phe
1 5

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 29

Lys Ala Ser Gln Asp Val His Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 30



Trp Ala Ser Thr Arg Trp Thr
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 31

Gln Gln Tyr Ser Asp Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 32

Asp Phe Glu Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 33

Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

169

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 34

Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 35

Gln Ile Asp Ala Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 36

Ser Thr Ser Glu Leu Ala Ser
1 5

V69

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 37

Gln Gln Leu Ser His Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 38
<211> 322
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 38

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
35 40 45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
50 55 60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
65 70 75 80

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
85 90 95

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
100 105 110

166

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
115 120 125

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
130 135 140

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
145 150 155 160

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
165 170 175

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
195 200 205

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
210 215 220

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
225 230 235 240

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
245 250 255

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
260 265 270

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
275 280 285

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
290 295 300

167

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
305 310 315 320

Leu Gly

<210> 39
<211> 970
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 39
ggcccatcgg tcttcccgct agcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc 60
ctgggctgcc tggtaagga ctactcccc gaaccggtga cgggtgcgtg gaactcaggc 120
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcttac agtctcagg actctactcc 180
gctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa 240
cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatggtcc 300
cccatgccca cctgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtt tctgttccc 360
cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacgt gcgtgggtgt 420
ggacgtgagc caggaagacc ccgaggcca gttcaactgg tacgtggaag gcgtggaggt 480
gcataatgcc aagacaaagc gcggggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag 540
cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag gactacaagt gcaaggcttc 600
caacaaaggc ctcccgctct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg 660
agagccacag gtgtacacc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag 720
cctgacctgc ctggtaaaag gtttctacc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa 780
tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt 840
cttctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga atgtcttctc 900
atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc 960
tctgggttga 970



<210> 40
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo Misceláneo

<400> 40

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

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Gly Glu Ser Asn Tyr Asp Phe Asp Phe Trp Gly Leu Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160

169

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

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

Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys
210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe
260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro
275 280 285

Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
290 295 300

Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val
305 310 315 320

Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro
325 330 335

Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys
340 345 350

Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly
355 360 365

120

Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 41
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo Misceláneo

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

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

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln Leu Ala Thr Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile
130 135 140

Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg Asp Gly Val Leu
145 150 155 160

Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

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

Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro Val Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 42
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo Misceláneo

<400> 42

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

192

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Asp Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala Pro Arg Phe
50 55 60

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

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

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

Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
115 120 125

Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn
130 135 140

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

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

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

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val
195 200 205

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg
210 215 220

123

Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val
225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile
245 250 255

Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp
260 265 270

Asp Pro Glu Val His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His
275 280 285

Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg
305 310 315 320

Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr
340 345 350

Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile
355 360 365

Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp
370 375 380

Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr
385 390 395 400

Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys
405 410 415

Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 43
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo Misceláneo

<400> 43

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Thr Glu Gln Leu Ala Thr Gly Gly
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Met Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Ser
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg Asp Gly Val Leu Asp
145 150 155 160

Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

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

Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro Val Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
25 September 2008 (25.09.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/115732 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/056527 ✓

(22) International Filing Date: 11 March 2008 (11.03.2008) ✓

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/895,813 ✓ 20 March 2007 (20.03.2007) ✓ US

(71) Applicant (for all designated States except US): ELI ✓
LILLY AND COMPANY [US/US]; Lilly Corporate
Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ✓ KORYTKO,
Andrew, Ihor [US/US]; 4720 Marblehead Bay Drive,
Oceanside, California 92057 (US). ✓ MARQUIS, David,
Matthew [US/US]; 2106 Meadowgreen Court, Encinitas,
California 92024 (US). ✓ SMITH, Eric, Michael [US/US];
10782 Charbono Terrace, San Diego, California 92131
(US). ✓ SWANSON, Barbara, Anne [US/US]; 1402 Wil-
lowspring Drive North, Encinitas, California 92024 (US).

(74) Agents: ✓ COHEN, Charles, E. et al.; Eli Lilly And Com-
pany, P. O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288
(US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

WO 2008/115732 A2

(54) Title: ANTI-SCLEROSTIN ANTIBODIES

(57) Abstract: Humanized and chimeric antibodies are provided that specifically bind human sclerostin and are characterized as having high affinity and strong neutralizing properties. The antibodies of the invention are useful for increasing bone mass, bone mineral density and bone strength and for the treatment of various disorders, e.g., osteoporosis, in human subject.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/056527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/395 A61P19/10 A61P19/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61P A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/119107 A (UCB SA [GB]; AMGEN INC [US]; PASZTY CHRISTOPHER [US]; ROBINSON MARTYN) 9 November 2006 (2006-11-09) cited in the application p. 7, l. 18-24; p. 7, l. 34; p. 12, l. 22-p. 15, l. 5; p. 19, l. 3-p. 26, l. 9; p. 125, l. 23-p. 127, l. 9; examples; p. 148-151	1-17
X	WO 2006/119062 A (UCB SA [GB]; AMGEN INC [US]; LU HSIENG SEN [US]; PASZTY CHRISTOPHER [U]) 9 November 2006 (2006-11-09) p. 7, l. 18-24; p. 7, l. 34; p. 12, l. 22-p. 15, l. 5; p. 19, l. 3-p. 26, l. 9; p. 125, l. 23-p. 127, l. 9; examples; p. 148-151	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2008

Date of mailing of the international search report

23/10/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Renggli, John

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/056527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BALINT R F ET AL: "ANTIBODY ENGINEERING BY PARSIMONIOUS MUTAGENESIS". GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 137, no. 1, 27 December 1993 (1993-12-27), pages 109-118, XP002031537 ISSN: 0378-1119 page 110, right-hand column	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/056527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006119107 A	09-11-2006	AR 053266 A1	25-04-2007
		AU 2006242431 A1	09-11-2006
		CA 2607197 A1	09-11-2006
		EP 1891101 A2	27-02-2008
		KR 20080011420 A	04-02-2008
		US 2007110747 A1	17-05-2007
		UY 29514 A1	30-11-2006
WO 2006119062 A	09-11-2006	AU 2006242476 A1	09-11-2006
		CA 2607276 A1	09-11-2006
		EP 1891100 A2	27-02-2008
		US 2007072797 A1	29-03-2007



No. 09-097358- -00000-0000

Fecha: 2009-09-10 16:36:21 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- ◇ Descripción de la invención [X]
- ◇ Dibujos de ser estos pertinentes [X]
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◇ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Edwar Navarro

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia