



No. 14-147904- -00000-0000

Fecha: 2014-07-09 16:06:50
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 7

Cm

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO

54. TITULO _____

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ GENENTECH, INC.

DOMICILIO _____ SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO _____ JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 14-147904- -00000-0000 Fecha: 2014-07-09 16:06:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 7	o de radicación
--	---	-----------------

AS. 128.577

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2013/022045	Fecha 18.01.2013
Publicación Internacional No.		WO 2013/109819	Fecha 25.07.2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1. GENENTECH, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		1 DNA Way, 94080	No. TELÉFONO
CIUDAD		South San Francisco	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		CA	NACIONALIDAD O US
PAÍS DE RESIDENCIA		US	LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. YE		Weilan	US
2. BURTON		Jeremy Bryant	US
3. WU		Yan	US
4. CHIU		Cecilia	CA
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
2. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
3. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
4. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO		JUAN PABLO	C.C. 80.410.337 T.P. 57492
DIRECCIÓN		Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO 7442200
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO
PAÍS		CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. US		US	61/588,100 2012/01/18
2.			
3.			

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 14-34467, 14-7801, 14-45453	Fecha: 07.07.2014
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 1-90		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 28		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 1-11		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☒ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar:	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

1285773

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0034467

Bogotá D.C., Marzo 31 de 2014 - 07:56:20

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	610743210	28/03/2014	34.288.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
10	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	310.000.00
				<u>\$310.000.00</u>
			=====	

SON: **TRESCIENTOS DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Marzo 31 de 2014 - 07:56:34

1285774

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 007801

Bogotá D.C., Enero 24 de 2014 - 08:09:18

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	650548426	23/01/2014	76.153.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
8 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	248.000.00
			\$248.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

*****_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 24 de 2014 - 08:17:19

128577 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0045453

Bogotá D.C., Abril 29 de 2014 - 17:05:30

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	650548511	29/04/2014	42.380.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-147904-00000-0000

Fecha: 2014-07-09 16:06:50
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 7

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 29 de 2014 - 17:05:45

	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		
Dependencia:	Fecha: <u>14</u> / <u>7</u> / <u>9</u> AAAA MM DD	Recorrido: <u>4</u>	
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		Planilla:	
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14/47904	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD ☒
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:	Folio (6) el cd anexo contiene un total de (7) archivos en formato pdf los cuales fueron procesados correctamente
----------------	--



No. 14-147904-00000-0000

Fecha: 2014-07-09 16:06:50
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 7

INES

86/00

PATENTE DE INVENCION ☐

N

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita 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 ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de conformidad con 35 USC 119(e) de la Solicitud Provisoria Estadounidense No. 61/588100 presentada el 18 de enero 2012, cuyo contenido se incorpora a la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-LRP5 y métodos para su utilización.

ANTECEDENTES

Se ha establecido ahora que la angiogénesis es un contribuyente importante a la patogénesis de una variedad de trastornos. Estos incluyen tumores sólidos y metástasis, enfermedades neovasculares intraoculares tales como retinopatías, por ej., retinopatía diabética, oclusión venosa de retina (RVO, por sus siglas en inglés), degeneración macular relacionada con la edad de tipo húmeda (AMD, por sus siglas en inglés), glaucoma neovascular, rechazo inmune de tejido córneo transplantado y otros tejidos, y artritis reumatoide. Duda *et al.* J. Clin. Oncology 25(26): 4033–42 (2007); Kesisis *et al.* Curr. Pharm. Des. 13: 2795–809 (2007); Zhang & Ma Prog. Ret. & Eye Res. 26: 1–37 (2007).

La retina recibe su suministro de sangre de los vasos sanguíneos de la retina, los cuales abastecen la parte interna de la retina, y los vasos sanguíneos coroidales, los cuales abastecen la parte externa. Se produce daño a los vasos sanguíneos de la retina en diversos procesos de enfermedad incluyendo retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, y oclusiones venosas de retina centrales y ramificadas (retinopatías isquémicas). La isquemia de retina de este daño da como resultado la neovascularización indeseable. La neovascularización coroidal se produce en una cantidad de otros procesos de enfermedad, incluyendo AMD. En contraste, la vascularización incompleta de la retina es una característica distintiva en pacientes con ciertas enfermedades genéticas, por ej. vitreoretinopatía exudativa familiar (FEVR, por sus siglas en inglés), enfermedad de Coats, y enfermedad de Norrie causada por la mutación del receptor Wnt Frizzled4 (Fzd4), el co-receptor LRP5 o el ligando secretado Norrin (Berger *et al.* Nature Genet. 1:199–203 (1992); Chen *et al.* Nature Genet. 1:204–208 (1992); Robitaille *et al.* Nature Genet. 32:326–30 (2002); Toomes *et al.* Am. J. Hum. Genet. 74:721–30 (2004)). Una proteína adicional, TSPAN12, ha demostrado estar

involucrada en el señalamiento de Norrin (Junge *et al.* Cell 139:299–311 (2009) y WO 2010/030813). Se ha informado además que las mutaciones en el gen Tspan12 son la causa de FEVR (Poulter *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 14;53(6):2873-9 (2012); Yang *et al.* Molecular Vision 17:1128-1135 (2011); Poulter *et al.* The American Journal of Human Genetics 86, 248–253 (2010)). Los modelos para estas enfermedades genéticas están disponibles en ratones con eliminación de genes homólogos correspondientes.

A pesar de los muchos avances en el campo de la angiogénesis ocular, existe aun la necesidad de identificar objetivos y desarrollar medios que puedan complementar o aumentar la eficacia de las terapias existentes.

SÍNTESIS

La invención provee anticuerpos anti-LRP5 y métodos para su preparación y uso, particularmente en el tratamiento de afecciones y enfermedades asociadas con la angiogénesis.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a la proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP5, por sus siglas en inglés), donde el anticuerpo potencia la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a LRP5.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos YYRYAPYRSLGMDV (SEC ID NO: 23) o WIPQSYFPX₁SYKSGFDY, donde X₁ es A o R (SEC ID NO: 24), (b) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQYYX₁YPFT, donde X₁ es L o S (SEC ID NO: 25), y (c) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GX₁ISX₂X₃GX₄STYYADSVKG, donde X₁ es A o G, X₂ es A o S, X₃ es P o S, X₄ es S o W (SEC ID NO: 26), o SRISSNGGSTYYADSVKG (SEC ID NO: 27). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYAMX₁, donde X₁ es H o S (SEC ID NO: 28), (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GX₁ISX₂X₃GX₄STYYADSVKG, donde X₁ es A o G, X₂ es A o S, X₃ es P o S, X₄ es S o W (SEC ID NO: 26), o SRISSNGGSTYYADSVKG (SEC ID NO: 27) y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos YYRYAPYRSLGMDV (SEC ID NO: 23) o WIPQSYFPX₁SYKSGFDY, donde X₁ es A o R (SEC ID NO: 24). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además (a) HVR–L1 que

comprende la secuencia de aminoácidos RASQGISSYLA (SEC ID NO: 29) o RASQX₁X₂X₃X₄YLA, donde X₁ es A, G, S o V, X₂ es I o M, X₃ es F, G, S o Y, y X₄ es G, S o Y (SEC ID NO: 30); (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AASSLQS (SEC ID NO: 31) o DASX₁X₂ES, donde X₁ es S o T y X₂ es L o R (SEC ID NO: 32); y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQYYX₁YPFT, donde X₁ es L o S (SEC ID NO: 33). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQGISSYLA (SEC ID NO: 29) o RASQX₁X₂X₃X₄YLA, donde X₁ es A, G, S o V, X₂ es I o M, X₃ es G, F, Y o S, y X₄ es G, Y o S (SEC ID NO: 30); (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AASSLQS (SEC ID NO: 31) o DASX₁X₂ES, donde X₁ es S o T y X₂ es L o R (SEC ID NO: 32); y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQYYX₁YPFT, donde X₁ es L o S (SEC ID NO: 33). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una o más secuencias estructurales de dominios variables de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID NO: 34–37. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende (a) una secuencia VH que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno de SEC ID NOs: 1 a 11; (b) una secuencia VL que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno de SEC ID NOs: 12 a 22; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VH de uno de SEC ID NOs: 1 a 11. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VL de uno de SEC ID NOs: 12 a 22. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia VH de uno de SEC ID NOs: 1 a 11 y una secuencia VL de uno de SEC ID NOs: 12 a 22. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL de un anticuerpo mostrado en las Figuras 4 y 5. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

En otro aspecto, la invención provee ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula huésped de la invención de modo que se produzca el anticuerpo. En algunas realizaciones, el método comprende además recuperar el anticuerpo de la célula huésped.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención y un agente citotóxico. En algunas

realizaciones, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional, por ej. un antagonista de VEGF (incluyendo, por ej., un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de anticuerpo, por ej. ranibizumab, un receptor de VEGF soluble, por ej. aflibercept, o un aptámero, por ej. pegaptanib), un agonista TSPAN12, plasmina, plasminógeno, activador de plasminógeno de tejido, un inhibidor de TNF- α , y/o un esteroide, por ej. triamcinolona o dexametasona.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para utilizar como un medicamento. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para usar en el tratamiento de una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopatía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis-Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para utilizar para potenciar la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para utilizar en la manufactura de un medicamento. En algunas realizaciones, el medicamento es para el tratamiento de una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis-Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva. En algunas realizaciones, el medicamento es para potenciar la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar a un individuo que tiene una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea,

neovascularización de la retina, ROP, FEVR, enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de un agente terapéutico adicional, por ej. un antagonista de VEGF (incluyendo, por ej., un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de anticuerpo, por ej. ranibizumab, un receptor de VEGF soluble, por ej. aflibercept, o un aptámero, por ej. pegaptanib), una proteína NORRIN recombinante, un agonista de TSPAN12, plasmina, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, un inhibidor de TNF- α , y/o un esteroide, por ej. triamcinolona o dexametasona. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para potenciar la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4 en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención para potenciar la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para rescatar un defecto de señalamiento en un individuo causado por la mutación en Norrin y/o Fzd4 que comprende administrar el anticuerpo de la reivindicación 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A y 1B muestran que los anticuerpos anti-LRP5 potencian el señalamiento mediado por Norrin/Fzd4 y rescatan la mutación de Fzd4_{M157V}. En estas Figuras se utiliza el prefijo “P6C”, mientras que en otros sitios en la memoria descriptiva se utiliza “YW629” en forma indistinta.

Las Figuras 2A y 2B muestran que los anticuerpos anti-LRP5 potencian la actividad de Norrin y rescatan la pérdida de Tspan12 en células microvasculares endoteliales de retina humanas (HREMVC, por sus siglas en inglés). En estas Figuras se utiliza el prefijo “P6C”, mientras que en otros sitios de la memoria descriptiva se utiliza “YW629” en forma indistinta.

Las Figuras 3A y 3B muestran que un anticuerpo anti-LRP5 rescata parcialmente defectos vasculares en ratones (“knockout”) con eliminación de *Tspan12*. En estas Figuras se utiliza el prefijo “P6C”, mientras que en otros lugares de la memoria descriptiva se utiliza “YW629” en forma indistinta.

Las Figuras 4A y 4B muestra las secuencias de regiones variables de cadena pesada para diversos anticuerpos anti-LRP5 con CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3 en casilleros. Los correspondientes números de ID de SEC: para estas secuencias son los siguientes: YW629.42 (SEC ID NO: 1), YW629.42.57 (SEC ID

NO: 2), YW629.42.58 (SEC ID NO: 3), YW629.42.65 (SEC ID NO: 4), YW629.51 (SEC ID NO: 5), YW629.51.13 (SEC ID NO: 6), YW629.51.61 (SEC ID NO: 7), YW629.51.63 (SEC ID NO: 8), YW629.51.77 (SEC ID NO: 9), YW629.51.78 (SEC ID NO: 10), y YW629.51.80 (SEC ID NO: 11).

Las Figuras 5A y 5B muestra las secuencias de regiones variables de cadena liviana para diversos anticuerpos anti-LRP5 con CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 en casilleros. Los correspondientes números de ID de SEC: para estas secuencias son los siguientes: YW629.42 (SEC ID NO: 12), YW629.42.57 (SEC ID NO: 13), YW629.42.58 (SEC ID NO: 14), YW629.42.65 (SEC ID NO: 15), YW629.51 (SEC ID NO: 16), YW629.51.13 (SEC ID NO: 17), YW629.51.61 (SEC ID NO: 18), YW629.51.63 (SEC ID NO: 19), YW629.51.77 (SEC ID NO: 20), YW629.51.78 (SEC ID NO: 21), y YW629.51.80 (SEC ID NO: 22).

Las Figuras 6A y 6B muestran que un anticuerpo anti-LRP5 rescata parcialmente los defectos vasculares asociados con la anulación ("knockout") de Tspan12.

Las Figuras 7A-7C muestran que un anticuerpo anti-LRP5 promueve el recrecimiento vascular y reduce la angiogénesis patológica en el modelo de retinopatía inducida por oxígeno de enfermedad vascular de la retina.

Las Figuras 8A-8C muestran que un anticuerpo anti-LRP5 potencia Norrin y el señalamiento de Wnt7b, pero antagonizando al mismo tiempo el señalamiento de Wnt3a.

Las Figuras 9A y 9B muestran que un anticuerpo anti-LRP5 rescata el defecto de señalamiento de mutaciones en componente ligando o receptor que reducen el agrupamiento de receptores.

Las Figuras 10A y 10B muestran que se requiere bivalencia de anticuerpo para el potenciamiento mediado por el anticuerpo anti-LRP5 del señalamiento de Norrin, pero no la inhibición del señalamiento de Wnt3a.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

DEFINICIONES

Una "estructura humana aceptora" para los propósitos de esta invención es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura de dominio variable (VL) de cadena liviana o una estructura de dominio variable (VH) de cadena pesada derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humana, según lo descrito más adelante. Una estructura humana aceptora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana puede comprender la misma secuencia de

aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la cantidad de cambios de aminoácidos son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, la estructura humana aceptora VL es idéntica en secuencia a la secuencia estructural de inmunoglobulina humana VL o secuencia estructural consenso humana.

“Afinidad” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ej., un anticuerpo) y su socio de unión (por ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, en el presente contexto, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca la cual refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ej., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su socio Y puede ser generalmente representada por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en esta invención. Las realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión son descritas en lo que sigue.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVRs, por sus siglas en inglés), en comparación con un anticuerpo parental el cual no posee dichas alteraciones, resultando dichas alteraciones en una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Los términos “anticuerpo anti-LRP5” y “un anticuerpo que se une a LRP5” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a LRP5 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo es útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento a LRP5. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-LRP5 a una proteína no LRP5, no relacionada, es inferior a aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a LRP5 según lo medido, por ej., por un radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a LRP5 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, o $\leq 0,001\text{ nM}$ (por ej. 10^{-8} M o menos, por ej. de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LRP5 se une a un epítipo de LRP5 que es conservado entre LRP5 de diferentes especies.

El término “anticuerpo” en esta invención se utiliza en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo aunque sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos

(por ej., anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiban la actividad de unión al antígeno deseada.

Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula que no es un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, aunque sin limitarse a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena única (por ej. scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

Un “anticuerpo que se une al mismo epítipo” como un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más, y a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más. En la presente se proporciona un ensayo de competición ejemplar.

El término anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie diferente.

La “clase” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseída por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden ser adicionalmente divididas en subclases (isotipos), por ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ε , γ , y μ , respectivamente.

El término “agente citotóxico” en el presente contexto se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, aunque no se limitan a, isótopos radiactivos (por ej., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ej., metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de

origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo sus fragmentos y/o variantes; y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos más adelante.

“Funciones efectoras” se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, las cuales varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación descendiente de receptores de superficie celular (por ej. receptor de células B); y activación de células B.

Una “cantidad eficaz” de un agente, por ej., una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término “región Fc” en esta invención se utiliza para definir una región de terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el término carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina de terminal C (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique lo contrario en la presente, la numeración de residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado el índice EU, según lo descrito en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

“Estructura” o “FR” se refiere a residuos de dominio variable que no son los residuos de región hipervariable (HVR, por sus siglas en inglés). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR en general aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1–H1(L1)–FR2–H2(L2)–FR3–H3(L3)–FR4.

Los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo entero” se utilizan en la presente en forma intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativa o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc según lo definido en esta invención.

Los términos “célula huésped”, “línea de células huéspedes” y “cultivo de células huéspedes” se utilizan indistintamente y se refieren a células en las cuales se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de dichas células. Las células huéspedes incluyen “transformantes” y “células transformadas” las cuales incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma sin importar la cantidad de pasajes. La progenie puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula parental, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica a la rastreada o seleccionada en la célula originalmente transformada se incluye en la presente invención.

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Una “estructura consenso humana” es una estructura la cual representa los residuos de aminoácidos de presentación más común en una selección de secuencias estructurales VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Publicación NIH 91–3242, Bethesda MD (1991), tomos 1–3. En una realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., *supra*. En una realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., *supra*.

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVRs no humanas y residuos de aminoácidos de FRs humanas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las HVRs (por ej., CDRs) corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FRs corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un

anticuerpo, por ej., un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sufrido humanización.

El término “región hipervariable” o “HVR,” en el presente contexto, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que es hipervariable en secuencia y/o forma lazos estructuralmente definidos (“lazos hipervariables”). En general, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVRs; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). HVRs generalmente comprenden residuos de aminoácidos de los lazos hipervariables y/o de las “regiones determinantes de complementariedad” (CDRs), siendo estas últimas de variabilidad de secuencia más alta y/o estando involucradas en el reconocimiento del antígeno. Los ejemplos de lazos hipervariables se producen en los residuos de aminoácidos 26–32 (L1), 50–52 (L2), 91–96 (L3), 26–32 (H1), 53–55 (H2), y 96–101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901–917 (1987).) Los ejemplos de CDRs (CDR–L1, CDR–L2, CDR–L3, CDR–H1, CDR–H2, y CDR–H3) se producen en los residuos de aminoácidos 24–34 de L1, 50–56 de L2, 89–97 de L3, 31–35B de H1, 50–65 de H2, y 95–102 de H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Con la excepción de CDR1 en VH, CDRs en general comprenden los residuos de aminoácidos que forman los lazos hipervariables. Las CDRs también comprenden “residuos determinantes de especificidad” o “SDRs,” que son residuos que contactan antígeno. SDRs están contenidas dentro de regiones de las CDRs denominadas CDRs abreviadas, o a–CDRs. Los ejemplos de a–CDRs (a–CDR–L1, a–CDR–L2, a–CDR–L3, a–CDR–H1, a–CDR–H2, y a–CDR–H3) se producen en los residuos de aminoácidos 31–34 de L1, 50–55 de L2, 89–96 de L3, 31–35B de H1, 50–58 de H2, y 95–102 de H3. (Ver Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008).) A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ej., residuos FR) están numerados en la presente de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

Un “inmunoconjugado” es un anticuerpo conjugado a una o más molécula(s) heteróloga(s), incluyendo aunque sin limitarse a un agente citotóxico.

Un “individuo” o “sujeto” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, aunque sin limitarse a, animales domesticados (por ej., vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ej., humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ej., ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo “aislado” es aquel que ha sido separado de un componente de su medioambiente natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo es purificado hasta más del 95% o 99% de pureza según lo determinado por, por ejemplo, electroforesis (por ej., SDS–PAGE, enfoque isoelectrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ej., HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los métodos de evaluación de la pureza del anticuerpo, véase, por ej., Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79–87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de un componente de su medioambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen comúnmente la molécula de ácido nucleico, aunque la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

“Acido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti–LRP5” se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesada y liviana de anticuerpo (o sus fragmentos), incluyendo dicha o dichas moléculas de ácido nucleico en un vector único o vectores separados, y dicha o dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" en el presente contexto se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ej., que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, dichas variantes generalmente están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, las cuales incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como siendo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como requiriendo la producción del anticuerpo por cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que serán utilizados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, incluyendo aunque sin limitarse al método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de exhibición de fagos, y métodos que utilizan

animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los sitios de inmunoglobulina humana, dichos métodos y otros métodos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales son descritos en esta invención.

Un “anticuerpo desnudo” se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterólogo (por ej., un resto citotóxico) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

“Anticuerpos nativos” se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos nativos de IgG son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos por dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están enlazadas a disulfuro. Del término N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada un dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido por tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3). Similarmente, del término N al C, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada un dominio liviano variable o un dominio variable de cadena liviana, seguido por un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede ser asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término “inserto de envase” se utiliza para hacer referencia a instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos” con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios vacíos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. La alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentra dentro del conocimiento en la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos de computación disponibles para el público tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o el programa informático Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden

determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima con respecto a la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los propósitos de la presente invención, sin embargo, % de valores de identidad de secuencias de aminoácidos se generan usando el programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de computación para comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código de fuente ha sido presentado con la documentación del usuario en la Oficina Estadounidense de Derechos de Autor, Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el N° de Registro de Derecho de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público de Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California, o puede ser compilado del código de fuente. El programa ALIGN-2 debería ser compilado para uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las cuales se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada con, o contra una secuencia de aminoácidos B determinada (lo cual puede denominarse, alternativamente, como una secuencia A de aminoácidos determinada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencias de aminoácidos con, o contra una secuencia B de aminoácidos determinada) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos con resultado de coincidencias idénticas en el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación de programas de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencias de aminoácidos de B a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores porcentuales de identidad de secuencias de aminoácidos utilizados en esta invención son obtenidos según lo descrito en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación la cual está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales los cuales son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se le administraría la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, que no es un ingrediente activo, que es no tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitarse a, un buffer, excipiente, estabilizante o conservante.

El término "proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad" o "LRP5," en el presente contexto, se refiere a cualquier LRP5 nativa de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ej. humanos) y roedores (por ej., ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca LRP5 sin procesar, de "longitud completa" así como también cualquier forma de LRP5 que es el resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de LRP5, por ej., variantes de corte y empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de una LRP5 humana ejemplar es la siguiente:

MEAAPPGPPWPLLLLLLLLLLALCGCPAPAAASPLLLFANRRDVRLVDAGGVKLES
TIVVSGLEDAAVDFQFSKGAVYWTDVSEEAIKQTYLNQTGAAVQNVVISGLVSP
DGLACDWVGKKLYWTDSETNRIEVANLNGTSRKVLFWQDLDPRAIALDPAHG
MYWTDWGETPRIERAGMDGSTRKIIVSDIWPNGLTIDLEEQLYWADAKLSFI
HRANLDGSFRQKVVEGSLTHPFALTLSGDTLYWTDWQTRSIHACNKRTGGKRKE
ILSALYSPMDIQVLSQERQPPFFHTRCEEDNGGCSHLCLLSPSEPFYTCACPTGVQ
LQDNGRTCKAGAEVLLLARRTDLRRISLDTDPDFTDIVLQVDDIRHAIAIDYDPLEG
YVYWTDDEVRAIRRAYLDGSGAQTLVNTEINDPDGIAVDWVARNLYWTDGTGTDRI
EVTRLNGTSRKILVSEDLDEPRAIALHPVMGLMYWTDWGENPKIECANLDGQER
RVLVNASLGWPNGLALDLQEGKLYWGDAKTDKIEVINVDGTKRRTLLEDKLP
HIFGFTLLGDFIYWTDWQRRSIEVHKVKASRDVIIDQLPDLMLKAVNVAKVVG
TNP CADRNGGCSHLCCFFTPHATRCGCPIGLELLSDMKTCIVPEAFLVFTSRA
AIHRISL ETNNNDVAIPLTGVKEASALDFDVSNNHIYWTDVSLKTISR
AFMNGSSVEHVVEF GLDYPEGMAVDWMGKNLYWADTGTNRIEVARLDGQFRQVL
VWRDLNPRSLAL DPTKGYIYWTEWGGKPRIVRAFMDGTNCMTLV
DKVGRANDLTIDYADQRLYWTD LDTNMIESSNMLGQERVVIADDLPH
PFGLTQYSDYIYWTDWNLHSIERADKTSGR NRTL
IQGHLD FVMDILVFHSSRQDGLNDCMHNNGQCGQLCLAI
PGGHRCGCASH YTLDPSSRNCSPTTFLFSQKSAISRMIPDDQHSPDLILPLHGLRNVKAIDYDPLD

KFIYWVDGRQNIKRAKDDGTQPFVLTSLSQGQNPDRQPHDLSIDIYSRTLFWTCE
 ATNTINVHRLSGEAMGVVLRGDRDKPRAIVVNAERGYLYFTNMQDRAAKIERAAL
 DGTEREVLFTTGLIRPVALVVDNTLGKLFWVDADLKRIESCDLSGANRLTLEDANI
 VQPLGLTILGKHLWIDRQQQMIERVEKTTGDKRTRIQGRVAHLTGIHAVEEVSLE
 EFSAHPCARDNGGCSHICIAKGDGTPRCSCPVHLVLLQNL LTCGEPPTCSPDQFA
 CATGEIDCIPGAWRCDGDFPECDDQSDEEGCPVCSAAQFPCARGQCVDLRLRCD
 GEADCQDRSDEADCAICLPNQFRCASGQCVLIKQQCDSFPDCIDGSDELMCEIT
 KPPSDDSPAHS SAIGPVIGIILSLFVMGGVYFVCQRVVCQRYAGANGPFPHEYVS
 GTPHVPLNFIAPGGSQHGPFTGIACGKSMSSVSLMGGRGGVPLYDRNHVTGA
 SSSSSSSTKATLYPPILNPPPSPATDPSLYNMDMFYSSNIPATARPYRPYIIRGMA
 PPTTPCSTDVCDSDYSASRWKASKYYLDLNSDSDPYPPPPTPHSQYLSAEDSCP
 PSPATERSYFHLFPPPPSPCTDSS

(SEC ID NO: 42).

En el presente contexto, “tratamiento” (y sus variaciones gramaticales tales como “tratar” o “que trata”) se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se está tratando, y puede realizarse ya sea para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, aunque sin limitarse a, prevención de la aparición o recurrencia de enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, reducción de la velocidad de progreso de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión o prognosis mejorada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan para retardar el desarrollo de una enfermedad o ralentizar el progreso de una enfermedad.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana de anticuerpo que está involucrado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales conservadas (FRs) y tres regiones hipervariables (HVRs). (Véase, por ej., Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6^{ta} ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007).) Un dominio único de VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Por añadidura, los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular pueden ser aislados usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para seleccionar una genoteca de dominios VL o VH complementarios,

respectivamente. Ver, por ej., Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880–887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624–628 (1991).

El término "vector," en el presente contexto, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está ligada. El término incluye el vector como una estructura de ácidos nucleicos de autorreplicación así como también el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la cual se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los cuales están ligados operativamente. Dichos vectores son denominados en la presente invención "vectores de expresión".

COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de anticuerpos que potencian el señalamiento de Norrin y/o Norrin/Frizzled4. En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen a LRP5. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ej., para el diagnóstico o tratamiento de retinopatías que incluyen retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopía patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, y retinopatía hipertensiva.

Anticuerpos Anti–LRP5 Ejemplificativos

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a LRP5. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti–LRP5 potencia la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–PRO que comprende por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs seleccionadas entre (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 28; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o 27; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23 o 24; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29 o 30; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 31 o 32; y (f) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 33.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o la totalidad de tres secuencias VH HVR seleccionadas entre (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEC ID NO: 28; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o 27; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23 o 24. En una realización, el anticuerpo comprende HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23 o 24. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23 o 24 y HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 33. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23 o 24, HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 33, y HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o 27. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 28; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o 27; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23 o 24.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o la totalidad de tres secuencias VL HVR seleccionadas entre (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29 o 30; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 31 o 32; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 33. En una realización, el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29 o 30; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 31 o 32; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 33.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VH HVR seleccionadas entre (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 28, (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o 27, y (iii) HVR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 23 o 24; y (b) un dominio VL que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias VL HVR seleccionadas entre (i) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29 o 30, (ii) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 31 o 32, y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 33.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 28; (b)

HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o 27; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23 o 24; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29 o 30; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 31 o 32; y (f) HVR–L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 33.

En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas, un anticuerpo anti–LRP5 puede ser humanizado. En una realización, un anticuerpo anti–LRP5 comprende HVRs como en cualquiera de las realizaciones precedentes, y comprende además una estructura humana aceptora, por ej. una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana. En otra realización, un anticuerpo anti–LRP5 comprende HVRs como en cualquiera de las realizaciones precedentes, y comprende además un VH o VL que comprende una secuencia FR, donde las secuencias FR son como sigue. Para la cadena pesada, FR1 comprende la secuencia EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO: 34), FR2 comprende la secuencia WVRQAPGKGLEWV (SEC ID NO: 35), FR3 comprende la secuencia RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEC ID NO: 36), FR4 comprende la secuencia WGQ (SEC ID NO: 37). Para la cadena liviana, FR1 comprende la secuencia DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 38), FR2 comprende la secuencia WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 39), FR3 comprende la secuencia GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 40), FR4 comprende la secuencia FGQGTKVEIKR (SEC ID NO: 41).

En otro aspecto, un anticuerpo anti–LRP5 comprende una secuencia de dominio variable (VH) de cadena pesada que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID NOs: 1–11. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ej., sustituciones conservadoras), inserciones, o deleciones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti–LRP5 que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a LRP5. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o deleccionados en cualquiera de SEC ID NOs: 1–11. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o deleciones se producen en regiones fuera de las HVRs (es decir, en las FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti–LRP5 comprende la secuencia de VH en cualquiera de SEC ID NOs: 1–11, incluyendo modificaciones pos–traducción de

esa secuencia. En una realización en particular, el VH comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas entre: (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 28, (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o 27, y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23 o 24.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti–LRP5, donde el anticuerpo comprende un dominio variable (VL) de cadena liviana que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12–22. En ciertas realizaciones, una secuencia de VL que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (por ej., sustituciones conservadoras), inserciones, o deleciones con relación a la secuencia de referencia, aunque un anticuerpo anti–PRO que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a PRO. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o deleccionados en SEC ID NO: 12–22. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVRs (es decir, en las FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti–LRP5 comprende la secuencia de VL en SEC ID NO: 12–22, que incluye modificaciones pos–traducción de esa secuencia. En una realización en particular, el VL comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas entre (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29 o 30; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 31 o 32; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 33.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti–LRP5, donde el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en cualquiera de SEC ID NOs: 1–11 y SEC ID NOs: 12–22, respectivamente, incluyendo modificaciones pos–traducción de esas secuencias. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende secuencias de VH y VL como sigue: SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 2 y SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 6 y SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 8 y SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 9 y SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 21, o SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 22.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-LRP5 proporcionado en esta invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-LRP5 que comprende una secuencia de VH de SEC ID NO: 1 y una secuencia de VL de SEC ID NO: 12 o que comprende una secuencia de VH de SEC ID NO: 5 y una secuencia de VL de SEC ID NO: 16.

En un aspecto más de la invención, un anticuerpo anti-LRP5 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-LRP5 es un fragmento de anticuerpo, por ej., un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o fragmento F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ej., un anticuerpo de IgG1 intacto u otra clase de anticuerpo o isotipo según lo definido en la presente invención.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-LRP5 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas puede incorporar cualquiera de las características, singulares o en combinación, según lo descrito en las Secciones 1–7 a continuación:

Afinidad del Anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, o $\leq 0,001\text{ nM}$ (por ej. 10^{-8} M o menos, por ej. de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En una realización, K_d se mide mediante un ensayo de unión al antígeno radioetiquetado (RIA, por sus siglas en inglés) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno según lo descrito por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fabs para el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno rotulado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulación de antígeno sin rotular, luego capturando el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (ver, por ej., Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865–881(1999)). Para establecer condiciones para el ensayo, se recubren durante toda la noche placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9.6), y posteriormente bloqueado con 2% (p/v) de seroalbúmina bovina en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), se

mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno- ^{125}I con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ej., consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593–4599 (1997)). Luego, el Fab de interés se incuba durante toda la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ej., alrededor de 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ej., durante una hora). Luego, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con 0,1% de polisorbato 20 (TWEEN-20[®]) en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 μl /pocillo de agente de centelleo (MICROSCINT-20[™]; Packard), y las placas se cuenta en un contador gamma TOPCOUNT[™] (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual a 20% de unión máxima se escogen para utilizar en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón de superficie usando un BIACORE[®]-2000 o un BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Luego de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de surfactante polisorbato 20 (TWEEN-20[™]) (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las velocidades de asociación (k_{asoc}) y velocidades de disociación (k_{disoc}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir una a uno simple (Programa Informático de Evaluación BIACORE[®] versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la relación $k_{\text{disoc}}/k_{\text{asoc}}$. Ver, por ej., Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865–881 (1999). Si la velocidad de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón de superficie antes mencionado, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de templado fluorescente que mide el

aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de pasabanda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno según lo medido en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con parada de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro serie 8000 SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) con un recipiente agitado.

Fragmentos de Anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, y scFv, y otros fragmentos descritos más adelante. Para una reseña de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129–134 (2003). Para una reseña de fragmentos scFv, véase, por ej., Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269–315 (1994); véase también WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.571.894 y 5.587.458. Para una descripción de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de unión al receptor de rescate y que tienen aumento de la vida media in vivo, ver la Patente de los Estados Unidos No. 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003); y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444–6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos son también descritos en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena liviana de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de un solo dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ej., Patente de los Estados Unidos No. 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpos pueden ser preparados mediante diversas técnicas, incluyendo aunque sin limitarse a digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como también producción por células huéspedes recombinantes (por ej. *E. coli* o fago), según lo descrito en esta invención.

Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos son descritos, por ej., en la Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851–6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ej., una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo, o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “con cambio de clase” en el cual la clase o subclase ha sido cambiada de aquella del anticuerpo parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen sus fragmentos de unión al antígeno.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad a humanos, reteniendo al mismo tiempo la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano parental. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en las cuales HVRs, por ej., CDRs, (o sus porciones) derivan de un anticuerpo no humano, y FRs (o sus porciones) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos FR en un anticuerpo humanizado son sustituidos con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ej., el anticuerpo del cual derivan los residuos de HVR), por ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y métodos para su preparación son revisados, por ej., en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008), y son adicionalmente descritos, por ej., en Riechmann et al., *Nature* 332:323–329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029–10033 (1989); Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25–34 (2005) (que describe injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489–498 (1991) (que describe “resurfacing”); Dall’Acqua et al., *Methods* 36:43–60 (2005) (que describe el “barajado de FR”); y Osbourn et al., *Methods* 36:61–68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252–260 (2000) (que describe el método de “selección guiada” al barajado de FR (FR shuffling)).

Las regiones estructurales humanas que pueden utilizarse para la humanización incluyen aunque sin limitarse a: regiones estructurales seleccionadas usando el método de “mejor ajuste” (ver, por ej., Sims et al. *J.*

Immunol. 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de regiones variables de cadena liviana o pesada (ver, por ej., Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones estructurales de línea germinal humana (ver, por ej., Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas de la selección de genotecas FR (ver, por ej., Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678–10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611–22618 (1996)).

Anticuerpos Humanos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden ser producidos usando diversas técnicas conocidas en el campo. Los anticuerpos humanos son descritos generalmente en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368–74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450–459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden ser preparados administrando un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta al desafío antigénico. Dichos animales típicamente contienen la totalidad o una porción de los lugares de inmunoglobulina humana, los cuales reemplazan a los lugares de inmunoglobulina endógenos, o los cuales están presentes extracromosómicamente o integrados arbitrariamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los lugares de inmunoglobulina endógenos han sido generalmente inactivados. Para la reseña de los métodos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, ver Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117–1125 (2005). Ver también, por ej., las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; Patente de los Estados Unidos No. 5.770.429 que describe la tecnología HuMAB®; Patente de los Estados Unidos No. 7.041.870 que describe la tecnología K–M MOUSE®, y la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden ser adicionalmente modificadas, por ej., combinando con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden ser preparados mediante métodos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma

humano y de heteromieloma de ratón– humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver, por ej., Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados por medio de tecnología del hibridoma de células B humanas son también descritos en Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557–3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 7.189.826 (la cual describe la producción de anticuerpos de IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265–268 (2006) (que describe hibridomas humanos– humanos). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) es también descrita en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927–937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185–91 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden ser generados aislando secuencias de dominios variables de clones de Fv seleccionadas de genotecas de exhibición de fagos derivadas humanas. Luego, dichas secuencias de dominio variable pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos son descritas a continuación.

Anticuerpos Derivados de Genotecas

Los anticuerpos de la invención pueden ser aislados por screening de genotecas combinadas para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conoce una variedad de métodos para generar genotecas de exhibición de fagos y screening de dichas genotecas para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos son descritos, por ej., en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y son adicionalmente descritos, por ej., en the McCafferty et al., *Nature* 348:552–554; Clackson et al., *Nature* 352: 624–628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581–597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161–175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299–310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073–1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467–12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1–2): 119–132(2004).

En ciertos métodos de exhibición de fagos, los repertorios de genes VH y VL son clonados por separado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y recombinados arbitrariamente en genotecas de fagos, las cuales pueden ser luego seleccionadas para fago de unión al antígeno según lo descrito en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433–455 (1994). El fago típicamente exhibe fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv de una sola cadena (scFv) o como fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de elevada afinidad contra el inmunógeno sin el requerimiento de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio “naive” (como se presenta en la naturaleza) puede ser clonado (por ej., de humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos con un amplio rango de antígenos propios y ajenos sin inmunización alguna según lo descrito por Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725–734 (1993). Finalmente, las genotecas “naive” también pueden ser preparadas sintéticamente clonando segmentos de genes V sin reordenamiento a partir de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencia al azar para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, según lo descrito por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: Patente de los Estados Unidos No. 5.750.373, y Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos Nos. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en esta invención.

6. Anticuerpos Multiespecíficos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención es un anticuerpo multiespecífico, por ej. un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para por lo menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para LRP5 y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, la otra especificidad de unión es para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de LRP5. Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser utilizados

para localizar agentes citotóxicos para células que expresan LRP5. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, aunque sin limitarse a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada–cadena liviana de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), e ingeniería “knob–in–hole” (mutaciones de acoplamiento) (ver, por ej., la Patente de los Estados Unidos No. 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden ser preparados mediante técnicas de ingeniería genética de efectos de maniobras electrostáticas para preparar moléculas heterodiméricas de anticuerpos Fc (WO 2009/089004A1); entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ej., Patente de los Estados Unidos No. 4.676.980, y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); usando cierres de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ej., Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547–1553 (1992)); usando tecnología de “diacuerpos” para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, por ej., Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444–6448 (1993)); y usando dímeros de Fv de cadena única (sFv) (ver, por ej. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparar anticuerpos triespecíficos según lo descrito, por ej., en Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos contruidos por técnicas de ingeniería genética con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, incluyendo “Anticuerpos de pulpo,” son también incluidos en esta invención (ver, por ej. US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento de esta invención incluye además un “FAB de Doble Acción” o “DAF” que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a LRP5 así como también a otro antígeno diferente (ver, US 2008/0069820, por ejemplo).

7. Variantes de Anticuerpos

En ciertas realizaciones, las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados por esta invención son contempladas. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica.

Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para arribar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ej., unión al antígeno.

Sustitución, Inserción, y Variantes de Deleción

En ciertas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para mutagénesis de sustitución incluyen las HVRs y FRs. Las sustituciones conservadoras son mostradas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de “sustituciones conservadoras”. Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de “sustituciones ejemplares” y según lo descrito adicionalmente más adelante con referencia a las clases de cadena lateral de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser introducidas en un anticuerpo de interés y los productos seleccionados para una actividad deseada, por ej., unión al antígeno retenida/ mejorada, reducción de la inmunogenicidad o mejora de ADCC o CDC.

TABLA 1

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden ser agrupados de acuerdo con las propiedades comunes de cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen sobre la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras abarcarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante sustitucional involucra sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ej. un anticuerpo humanizado o humano). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para estudio adicional tendrán modificaciones (por ej., mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ej., aumento de afinidad, reducción de la inmunogenicidad) con relación al anticuerpo parental y/o tendrán ciertas propiedades biológicas sustancialmente retenidas del anticuerpo parental. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, la cual puede ser generada convenientemente, por ej., usando técnicas de maduración por afinidad basadas en exhibición de fagos tales como aquellas descritas en esta invención. Brevemente, uno o más residuos HVR son mutados y los anticuerpos variantes exhibidos en fago y seleccionados para una actividad biológica en particular (por ej. afinidad de unión).

Pueden realizarse alteraciones (por ej., sustituciones) en HVRs, por ej., para mejorar la afinidad hacia el anticuerpo. Dichas alteraciones pueden ser realizadas en “puntos calientes” (“hotspots”) de HVR, es decir, residuos codificados por codones que sufren mutación a elevada frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, por ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179–196 (2008)), y/o SDRs (α-CDRs), siendo analizada la variante VH o VL resultante para afinidad de unión. La maduración por afinidad mediante la construcción y reselección a partir de genotecas secundarias ha sido descrita, por ej., en Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1–37 (O’Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas realizaciones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para maduración mediante cualquiera de una variedad de métodos (por ej., PCR propensa al error, barajado de cadena, o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Luego se crea una genoteca secundaria. Luego, la genoteca se selecciona para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad involucra métodos dirigidos a HVR, en los cuales diversos residuos de HVR (por ej., 4–6 residuos por vez) son aleatorizados. Los residuos HVR involucrados en la unión al antígeno pueden ser específicamente identificados, por ej., usando mutagénesis de exploración con alanina o modelado. CDR–H3 y CDR–L3 en particular son frecuentemente tomados como objetivo.

En ciertas realizaciones, pueden ocurrir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVRs siempre y cuando dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ej., sustituciones conservadoras según lo proporcionado en esta invención) en HVRs que no reducen sustancialmente la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden estar afuera de los “puntos calientes” de HVR o SDRs. En ciertas realizaciones de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está sin alterar, o no contiene más de uno, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puede ser tomado como objetivo para la mutagénesis se denomina “mutagénesis de exploración con alanina” según lo descrito por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081–1085. En este método, un residuo o grupo de residuos objetivos (por ej., residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) son identificados y reemplazados por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ej., alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en los lugares de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno – anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos lindantes pueden ser tomados como objetivo o eliminados como candidatos para la sustitución. Pueden seleccionarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de terminal amino– y/o carboxilo que oscilan en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien residuos o más, así como también inserciones de intrasecuencias de residuos de aminoácido único o múltiples aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo de terminal N. Otras variantes insercionales del anticuerpo o molécula de anticuerpo incluyen la fusión al término N o C del anticuerpo a una enzima (por ej. para ADEPT) o un polipéptido el cual aumenta la vida media sérica del anticuerpo.

Variantes de glicosilación

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención es alterado para aumentar o reducir el grado hasta el cual el anticuerpo es glicosilado. La adición o deleción de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede

lograrse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se crea o elimina uno o más sitios de glicosilación.

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico que está generalmente unido por una N-ligación a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ej., Wright et al. *TIBTECH* 15:26–32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ej., manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como también una fucosa unida a un GlcNAc en el “tallo” de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención a fin de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser entre 1% y 80%, entre 1% y 65%, entre 5% y 65% o entre 20% y 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con relación a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ej. estructuras complejas, híbridas y de alto contenido de manosa) según lo medido por espectrometría de masas MALDI-TOF, según lo descrito en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de residuos de región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar situado aproximadamente ± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencias en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función mejorada de ADCC. Ver, por ej., Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Nos. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos “desfucosilados” o “deficientes en fucosa” incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239–1249 (2004); Yamane–

Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación proteica (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533–545 (1986); Sol. de Pat. Estadounidense No US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas de células knockout, tales como gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO anuladas (“knockout”) (ver, por ej., Yamane–Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680–688 (2006); y WO2003/085107).

Se proporcionan además variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisectados, por ej., en las cuales un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo es biseccionado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ej., en WO 2003/011878 (Jean–Mairet et al.); Patente de los Estados Unidos No. 6.602.684 (Umana et al.); y US 2005/0123546 (Umana et al.). Se proporcionan además variantes de anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos son descritas, por ej., en WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

Variantes de región Fc

En ciertas realizaciones, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en esta invención, generando así una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (*por ej.*, una región Dc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (*por ej.* una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpos que posee alguna, pero no todas las funciones efectoras, que la tornan un candidato deseable para aplicaciones en las cuales la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante sin embargo ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo

carezca de unión al Fc γ R (por ende probablemente carezca de actividad de ADCC), pero retiene la capacidad de unión al FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan Fc(RIII solamente, mientras que los monocitos expresa Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se sintetiza en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457–492 (1991). Los ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5.500.362 (ver, por ej. Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059–7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499–1502 (1985); 5,821,337 (ver Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351–1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayo no radiactivos (ver, por ejemplo, ACTI™ ensayo de citotoxicidad no radiactiva para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y CytoTox 96® ensayo de citotoxicidad no radiactiva (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y células Asesinas Naturales (NK, por sus siglas en inglés). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, por ej., en un modelo animal tal como aquel descrito en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652–656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo sea incapaz de unirse a C1q y por ende carece de actividad de CDC. Ver, por ej., ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano–Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045–1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738–2743 (2004)). También pueden llevarse a cabo determinaciones de unión a FcRn y de evacuación *in vivo* /vida media usando métodos conocidos en la técnica (ver, por ej., Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759–1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de Fc

“DANA” con sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (Patente de los Estados Unidos No. 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con unión mejorada o reducida a FcRs. (Ver, por ej., Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591–6604 (2001).)

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región de Fc con una o más sustituciones de aminoácidos las cuales mejoran ADCC, por ej., sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región de Fc (numeración EU de residuos).

En algunas realizaciones, se realizan alteraciones en la región de Fc que dan como resultado unión a C1q alterada (es decir, mejorada o reducida) y/o Citotoxicidad que Depende del Complemento (CDC), por ej., según lo descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 6.194.551, WO 99/51642, y Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178–4184 (2000).

Los anticuerpos con vidas medias aumentadas e unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), son descritos en US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Aquellos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones allí las cuales mejoran la unión de la región de Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ej., sustitución de residuo de región Fc 434 (Patente de los Estados Unidos No. 7.371.826).

Ver también Duncan & Winter, *Nature* 322:738–40 (1988); Patente de los Estados Unidos No. 5.648.260; Patente de los Estados Unidos No. 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de región Fc.

Variantes de anticuerpos modificadas por técnicas de ingeniería genética con cisteína

En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados por técnicas de ingeniería genética con cisteína, por ej., “thioMAbs,” en donde uno o más residuos de un anticuerpo son sustituidos con residuos cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos son así posicionados en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos

farmacológicos o restos farmacológicos ligantes, para crear un inmunoconjugado, según lo descrito adicionalmente en la presente invención. En ciertas realizaciones, cualquiera o más de los siguientes residuos puede ser sustituido con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región de Fc de cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos modificados con cisteína según lo descrito, por ej., en la Patente de los Estados Unidos No. 7.521.541.

Derivados de Anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención puede ser adicionalmente modificado para contener restos no proteináceos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para derivación del anticuerpo incluyen aunque sin limitarse a polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitativos de polímeros hidrosolubles incluyen, aunque sin limitarse a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol /propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros al azar), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno / óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ej., glicerol), polivinil alcohol, y sus mezclas. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, la cantidad y/o tipo de polímeros empleados para la derivación pueden determinarse en base a consideraciones que incluyen, aunque sin limitarse a, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo a ser mejorado, ya sea que el derivado del anticuerpo sea utilizado en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proveen conjugados de un anticuerpo y resto no proteináceo que pueden calentarse selectivamente mediante la exposición a radiación. En una realización, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600–11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, aunque sin limitación, longitudes de onda que no dañan células comunes, pero que calientan el resto no

proteínaceo hasta una temperatura a la cual las células próximas al resto no proteínaceo del anticuerpo son eliminadas.

Métodos Recombinantes y Composiciones

Los anticuerpos pueden ser producidos usando métodos recombinantes y composiciones, por ej., según lo descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567. En una realización, se proporciona el ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-LRP5 descrito en esta invención. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácido que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácido que comprende el VH del anticuerpo (por ej., las cadenas liviana y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ej., vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una realización de ese tipo, una célula huésped comprende (*por ej.*, ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una realización, la célula huésped es eucariótica, por ej. una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés) o célula linfóide (por ej., célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-LRP5, donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, según lo proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-LRP5, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ej., según lo descrito con anterioridad en la presente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede ser fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procarióticas o eucarióticas descritas en esta invención. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y función del efector Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, por ej., las Patentes Estadounidenses Nos. 5.648.237, 5.789.199, y 5.840.523. (Ver también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245–254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*.) Luego de la expresión, el anticuerpo puede ser aislado de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede ser adicionalmente purificado.

Además de procariotas, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo hongos y cepas de levaduras cuyas rutas de glicosilación han sido “humanizadas” dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Ver Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409–1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210–215 (2006).

Las células huéspedes adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado son también derivadas de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de planta e insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales las cuales pueden utilizarse en conjunto con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células de planta también pueden utilizarse como huéspedes. Ver, por ej., las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden utilizarse células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, las líneas de células de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas de células huéspedes de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS–7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 según lo descrito, por ej., en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK); células sertoli de ratón (células TM4 según lo descrito, por ej., en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243–251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de

riñón de mono verde africano (VERO–76); células de carcinoma cervical humanas (HELA); células de riñón caninas (MDCK; células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humanas (W138); células de hígado humanas (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, según lo descrito, por ej., en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44–68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huéspedes de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una reseña de ciertas líneas de células huéspedes de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ej., Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255–268 (2003).

Ensayos

Los anticuerpos Anti–LRP5 proporcionados en esta invención pueden ser identificados, seleccionados, o caracterizados por sus propiedades físico/químicas y/ o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se analiza para determinar su actividad de unión al antígeno, por ej., mediante métodos conocidos tales como ELISA, Western blot, etc.

En otro aspecto, pueden emplearse ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con YW629.42 o YW629.51 para la unión a LRP5. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ej., un epítipo lineal o un epítipo conformacional) que es unido por YW629.42 o YW629.51. Los métodos ejemplificativos detallados para el mapeo de un epítipo al cual se une un anticuerpo son proporcionados en Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols,” en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competición ejemplificativo, se incubaba LRP5 inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo rotulado que se une a LRP5 (por ej., YW629.42 o YW629.51) y un segundo anticuerpo no rotulado que está siendo ensayado para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo para la unión a LRP5. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, el LRP5 inmovilizado se incubaba en una solución que comprende el primer anticuerpo rotulado pero no el segundo

anticuerpo no rotulado. Luego de la incubación bajo condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a LRP5, se elimina el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de rótulo asociado con LRP5 inmovilizado. Si la cantidad de rótulo asociada con LRP5 inmovilizado es sustancialmente reducida en la muestra de ensayo con relación a la muestra control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para la unión a LRP5. Ver Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Ensayos de Actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-LRP5 que tienen una actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ej., la unión a LRP5, potenciación de la actividad de Norrin, o potenciación del señalamiento de Norrin/Fzd4. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En ciertas realizaciones, se analiza un anticuerpo de la invención para dicha actividad biológica. En un ensayo de activación de Wnt/Norrin ejemplar, LRP5 y proteína Fzd4, o las variantes relevantes (es decir Fzd4_{M157V}) se expresan transitoriamente con plásmidos reporteros de luciferasa Topflash en células 293T. Las células que expresan estas proteínas son expuestas a ligandos Norrin o Wnt y, luego de una incubación durante 16 horas a 37°C, se determina el nivel de activación midiendo la cantidad de luminiscencia de luciferasa. Si se aumenta sustancialmente la cantidad de luminiscencia por la adición del ligando en presencia de anticuerpo LRP5 entonces eso indica que el anticuerpo potencia el señalamiento de Fzd4/Norrin. Cuando se utiliza Fzd4_{M157V}, que tiene señalamiento disminuido en presencia de Norrin, el aumento de la luminiscencia en presencia de anticuerpo LRP5 se considera que rescata el defecto en el señalamiento de Fzd4.

En un ensayo de activación de Wnt/Norrin adicional, las células endoteliales de la retina humanas cultivadas pueden ser expuestas a ligandos Norrin o Wnt en presencia de anticuerpo LRP5 o anticuerpo control durante 24–48 horas y se puede determinar el nivel de genes reporteros Wnt conocidos (es decir, Axin–2 o PV–1) por RT–PCR cuantitativa. En la situación del anticuerpo control, luego de la adición de ligandos de Norrin y Wnt, la cantidad de ARN de Axin–2 aumentará, mientras que la cantidad de ARN de PV–1 disminuirá, con relación a la no adición de ligando. Si la presencia del anticuerpo LRP5, potenciación del señalamiento de Norrin daría como resultado un aumento adicional en Axin–2 y a la inversa, una disminución en PV–1. Este ensayo también puede ser realizado en células

tratadas con siRNA para reducir la expresión de Tspan12. En células con expresión disminuida de Tspan12 no hay cambio alguno en Axin-2 en presencia de Norrin. Si el anticuerpo LRP5, pero no el anticuerpo control, es capaz de causar un aumento en Axin-2 en ausencia de la expresión de Tspan12, entonces se considera que este anticuerpo rescata el defecto en el señalamiento de Fzd4/Norrin que es resultado de la pérdida de Tspan12.

Inmunosconjugados

La invención provee además inmunosconjugados que comprenden un anticuerpo anti-LRP5 de esta invención conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fungal, vegetal o animal, o sus fragmentos), o isótopos radiactivos.

En una realización, un inmunosconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) en el cual un anticuerpo es conjugado a uno o más fármacos, incluyendo aunque sin limitarse a maytansinoide (ver las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.208.020, 5.416.064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o su derivado (ver las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y Patente de los Estados Unidos No. 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunosconjugado comprende un anticuerpo según lo descrito en esta invención conjugado a una toxina enzimáticamente activa o a su fragmento, incluyendo aunque sin limitarse a cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de

modeccina, alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunocóncugado comprende un anticuerpo según lo descrito en esta invención cóncugado a un átomo radiactivo para formar un radiocóncugado. Se encuentra disponible una variedad de isótopos radiactivos para la producción de radiocóncugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radiocóncugado se utiliza para detección, el mismo puede comprender un átomo radiactivo para estudios de escintigrafía, por ejemplo tc99m o I123, o una etiqueta de espín para la toma de imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) (también conocido como toma de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los cóncugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina según lo descrito en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminapentaacético rotulado con Carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la cóncugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026. El ligante puede ser un "ligante disociable" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un ligante lábil al ácido, ligante sensible a peptidasa, ligante fotolábil, ligante de dimetilo o ligante que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020).

Los inmunocóncugados o ADCs de la presente invención contemplan expresamente, aunque sin limitarse a dichos cóncugados preparados con reactivos entrecruzadores incluyendo, aunque sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS,

LC–SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo–EMCS, sulfo–GMBS, sulfo–KMUS, sulfo–MBS, sulfo–SIAB, sulfo–SMCC, y sulfo–SMPB, y SVSB (succinimidil–(4–vinilsulfona)benzoato) los cuales están disponibles en el mercado (por ej., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Métodos y Composiciones para Diagnóstico y Detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti–LRP5 proporcionados en esta invención es útil para detectar la presencia de LRP5 en una muestra biológica. El término “detectar” en el presente contexto abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido ocular, incluyendo tejido de la retina.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti–LRP5 para utilizar en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de LRP5 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti–LRP5 según lo descrito en esta invención bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti–LRP5 a LRP5, y detectar si se forma un complejo o no entre el anticuerpo anti–LRP5 y LRP5. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se utiliza un anticuerpo anti–LRP5 para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti–LRP5, por ej. donde LRP5 es un biomarcador para selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que pueden ser diagnosticados usando un anticuerpo de la invención incluyen retinopatías que incluyen retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopía patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, enfermedad de Coats’, enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, y retinopatía hipertensiva.

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti–LRP5 etiquetados. Las etiquetas incluyen, aunque sin limitarse a, etiquetas o restos que se detectan directamente (tales como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminiscentes, y radiactivas), así como también restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ej., a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de etiquetas incluyen, aunque sin limitarse a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I ,

fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de los Estados Unidos No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas espín, etiquetas de bacteriófago, radicales libres estables y similares.

Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-LRP5 según lo descrito en esta invención se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, aunque sin limitarse a: buffers tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (*por ej.* complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares de esta invención incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas de hialuronidasa activas neutras solubles (SHASEGP, por sus siglas en inglés), por ejemplo, glicoproteínas

de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGPs ejemplares y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, son descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Nos. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glicosaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizados ejemplares se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen aquellas descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 6.171.586 y WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un buffer de histidina- acetato.

La formulación de esta invención también puede contener más de un ingrediente activo según lo necesario para la indicación en particular que se está tratando, con preferencia aquellos con actividades complementarias que no afectan adversamente uno al otro. Por ejemplo, puede ser conveniente proporcionar además un antagonista del VEGF (incluyendo, por ej., un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de anticuerpo, por ej. ranibizumab, un receptor del VEGF soluble o su fragmento, por ej. aflibercept, o un aptámero, por ej. pegaptanib), un agonista de TSPAN12, plasmina, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, triamcinolona, un inhibidor de TNF- α , y/o dexametasona. Dichos ingredientes activos están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas son descritas en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos conformados, *por ej.* películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad pueden lograrse fácilmente, por ej., por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Métodos Terapéuticos y Composiciones

Se puede emplear cualquiera de los anticuerpos anti-LRP5 proporcionados en esta invención en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-LRP5 para utilizar como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-LRP5 para utilizar en el tratamiento de retinopatías que incluyen retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis-Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, y retinopatía hipertensiva. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-LRP5 para utilizar en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-LRP5 para utilizar en un método para tratar un individuo que tiene una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, enfermedad de Coats, enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis-Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-LRP5. En una realización de ese tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ej., según lo descrito más adelante. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un anticuerpo anti-LRP5 para utilizar en la potenciación de la actividad de Norrin y/o potenciación del señalamiento de Norrin/Fzd4. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti-LRP5 para utilizar en un método para potenciar la actividad de Norrin y/o potenciar el señalamiento de Norrin/Fzd4 en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-LRP5 para potenciar la actividad de Norrin y/o potenciar el señalamiento de Norrin/Fzd4. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas es preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-LRP5 en la manufactura o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva. En una realización adicional, el medicamento es para utilizar en un método para tratar una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, Enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva que comprende administrar a un individuo que tiene una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, Enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva una cantidad eficaz del medicamento. En una realización de ese tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ej., según lo descrito más adelante. En una realización adicional, el medicamento es para potenciar la actividad de Norrin y/o potenciar el señalamiento de Norrin/Fzd4. En una realización adicional, el medicamento es para utilizar en un método para potenciar la actividad de Norrin y/o potenciar el señalamiento de Norrin/Fzd4 en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para potenciar la actividad de Norrin y/o potenciar el señalamiento de Norrin/Fzd4. Un “individuo” de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia

patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, Enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva. En una realización, el método comprende la administración a un individuo que tiene dicha retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, Enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva una cantidad eficaz de un anticuerpo anti–LRP5. En una realización de ese tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, según lo descrito más adelante. Un “individuo” de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para potenciar la actividad de Norrin y/o potenciar el señalamiento de Norrin/Fzd4 en un individuo. En una realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti–LRP5 para potenciar la actividad de Norrin y/o potenciar el señalamiento de Norrin/Fzd4. En una realización, un “individuo” es un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti–LRP5 proporcionados en esta invención, por ej., para utilizar en cualquiera de los métodos terapéuticos antes mencionados. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti–LRP5 proporcionados en esta invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti–LRP5 proporcionados en la presente invención y por lo menos un agente terapéutico adicional, por ej., según lo descrito más adelante.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse ya sea por sí solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser administrado en forma conjunta con por lo menos un agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un antagonista del VEGF (incluyendo, por ej., un anticuerpo anti–VEGF o

fragmento de anticuerpo, por ej. ranibizumab, un receptor del VEGF soluble o su fragmento, por ej. aflibercept, o un aptámero, por ej. pegaptanib), un agonista de TSPAN12, plasmina, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, triamcinolona, un inhibidor de TNF- α , y/o dexametasona.

Dichas terapias combinadas señaladas con anterioridad abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos son incluidos en las mismas formulaciones o en formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes de, en forma simultánea, y/o después de, la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede ser administrado por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, por administración intraocular (por ej. administración intravítrea). Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, por ej. por inyecciones, tal como la administración intravítrea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en esta invención diversos programas de dosificación incluyendo aunque sin limitarse a administraciones únicas o múltiples en diversos puntos en el tiempo, administración por bolo e infusión por pulso.

Los anticuerpos de la invención serían formulados, dosificados y administrados en forma consistente con la buena práctica médica. Los factores para tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno en particular que se está tratando, el mamífero en particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos. El anticuerpo no necesariamente pero es opcionalmente formulado con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores descritos anteriormente. Estos se utilizan, en general, en las mismas dosificaciones y con rutas de administración según lo descrito en esta invención, o aproximadamente entre 1 y 99% de las dosificaciones descritas en esta invención, o en cualquier dosificación y mediante cualquier ruta que es empíricamente/ clínicamente determinada como apropiada.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza sola o en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se está tratando, el tipo de anticuerpo, la severidad y transcurso de la enfermedad, si el anticuerpo es administrado para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico interviniente. El anticuerpo es adecuadamente administrado al paciente de una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ej. 0,1mg/kg–10mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados con anterioridad. Para administraciones repetidas durante varios días o más prolongadas, dependiendo de la afección, el tratamiento sería generalmente sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplificativa del anticuerpo estaría dentro del rango entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de los mismos). Dichas dosis pueden ser administradas en forma intermitente, por ej. cada semana o cada tres semanas (*por ej.* de modo que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte, o *por ej.* aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga más elevada inicial, seguida por una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia es fácilmente monitoreado por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones antes mencionadas o métodos terapéuticos puede llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo anti-LRP5.

Artículos de Manufactura

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos con anterioridad. El artículo de manufactura comprende un envase y un inserto de etiqueta o paquete en o asociado con el envase. Los

envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase sostiene una composición la cual está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una boca de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o inserto de paquete indica que la composición se utiliza para tratar la afección de elección. Asimismo, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un agente terapéutico citotóxico adicional o otro agente terapéutico. El artículo de manufactura en esta realización de la invención puede comprender además un inserto de paquete que indica que las composiciones pueden utilizarse para tratar una afección en particular. Alternativa, o adicionalmente, el artículo de manufactura puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros buffers, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos antes mencionados de manufactura puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-LRP5.

EJEMPLOS

Lo que sigue son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden practicarse diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada con anterioridad.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-LRP5

Clasificación y Screening de Genotecas para Identificar Anticuerpos Anti-LRP5-E3/E4

Nosotros generamos diversas construcciones de expresión de LRP5, incluyendo aquellas que codifican toda la región extracelular, los cuatro dominios

β -propulsores en su totalidad E1–4, cada dominio β -propulsor solo, y E3–E4, y descubrimos que solamente el clon que codifica los dominios E3–E4 produjo una cantidad significativa de proteína expresada soluble. Por lo tanto, utilizamos dominios LRP5 humanos biotinilados E3–E4 generados internamente (E644–Q1263 de SEC ID NO : 42) como antígeno para la clasificación de genotecas. Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp® de 96 pocillos Nunc durante toda la noche a 4°C con NeutrAvidin® (Fisher Scientific, #89890, 10µg/ml) o estreptavidina (Fisher Scientific, #21125, 10µg/ml) y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con buffer de bloqueo de fago PBST (solución salina tamponada con fosfato (PBS) y 1% (p/v) soroalbúmina bovina (BSA) y 0,05% (v/v) tween–20). Luego se capturó LRP5–E3/E4 biotinilado (10µg/ml) sobre la placa mediante NeutrAvidin®/estreptavidina durante 1 hora a temperatura ambiente. Las genotecas de fagos sintéticas de anticuerpos humanos (ver, por ej., Lee *et al.*, J. Immunol. Meth. 284:119–132, 2004, Liang *et al.*, J. Molec. Biol. 366: 815–829, 2007) se agregaron a placas de antígenos por separado y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas recubiertas con antígeno se lavaron diez veces con PBT (PBS con 0.05% Tween®–20), y el fago unido se eluyó con HCl 50mM y NaCl 500mM durante 30 minutos y se neutralizó con un volumen igual de base Tris 1 M (pH7.5). Los fagos recuperados se amplificaron en células XL–1 de *E. coli*. Durante las subsiguientes rondas de selección, se redujo la incubación de fago de anticuerpo con las placas recubiertas con antígeno a 2–3 horas, y se aumentó gradualmente la severidad del lavado de las placas.

Después de 6 rondas de cribado, se observó un enriquecimiento significativo. Se escogieron 96 clones cada uno del rastreo de genotecas para determinar si se unían específicamente a LRP5E3/E4 humano. Las regiones variables de estos clones fueron secuenciadas por PCR para identificar clones de secuencia única.

El sobrenadante de fago se diluyó 1:5 en buffer de ELISA (ensayo de inmunoabsorbencia vinculada con enzima) (PBS con 0,5% BSA, 0,05% Tween® 20) en un volumen total de 100µl y se transfirió a las placas recubiertas con proteína objetivo (1µg/ml LRP5E3/E4 directamente recubierto durante toda la noche) o placa recubierta con neutravidina/estreptavidina (5µg/ml de cada proteína). La placa se agitó suavemente durante 1 hora para permitir que el fago se uniera a las placas recubiertas con proteína. La placa se lavó diez veces con PBS–0.05% Tween® 20. La unión se cuantificó agregando anticuerpo anti-M13

conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en buffer de ELISA (1:5000) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron diez veces con PBS–0.05% Tween® 20. A continuación, se agregaron 100µl/pocillo de una relación 1:1 de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Peroxidasa y Solución de Peroxidasa B (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) al pocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 100µl de ácido fosfórico 0.1M (H₃PO₄) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la DO (densidad óptica) del color amarillo en cada pocillo usando un lector de placas de ELISA estándar a 450 nm. Se calculó la reducción de la DO (%) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{reducción de DO}_{450\text{nm}} (\%) = [(\text{DO}_{450\text{nm}} \text{ de pocillos con competidor}) / (\text{DO}_{450\text{nm}} \text{ de pocillo sin competidor})] * 100$$

Los clones que tenían la DO_{450nm} por lo menos 5 veces más alta de LRP5E3/E4 que el fondo se escogieron y reformatearon en IgG1 humana de longitud completa clonando regiones V_L y V_H de clones individuales en el vector LPG3 y LPG4 respectivamente. Estos clones fueron posteriormente expresados transitoriamente en células CHO de mamífero, y purificados con una columna de proteína A.

Construcción de Genotecas y Estrategia de Cribado para Mejora de Afinidad de Clones Derivados de las Genotecas de Fagos Sintéticas

Para cada clon que demostró actividad de ensayo basado en células prometedora, YW629.42 y YW629.51, se generó fagémido que contenía 4 codones de parada (TAA) en CDR L3 y que exhibían Fab monovalente en la superficie de bacteriófago M13. Estos fagémidos sirvieron como los patrones para mutagénesis Kunkel para la construcción de genotecas de maduración por afinidad. Para la maduración por afinidad, se utilizó una estrategia de aleatorización suave, donde se sintetizó ADN mutagénico con mezclas 70–10–10–10 de bases que favorecen a los nucleótidos del tipo salvaje para obtener el índice de mutación de aproximadamente 50% en las posiciones seleccionadas (Gallop et al., *Journal of Medicinal Chemistry* 37:1233–1251 (1994)). Se seleccionaron para la aleatorización cuatro combinaciones diferentes de lazos de CDR, H1/L3, H2/L3, H3/L3, y L1/L2/L3.

Para la selección que mejora la afinidad, LRP5E3/E4 generado internamente se biotiniló, en primer lugar, bajo condición limitadora de reactivos. Las genotecas de fagos se sometieron a seis rondas de clasificación en solución

con severidad en aumento. Para la primera ronda de clasificación en solución, 3 D.O./ml en 1% BSA y 0,05% Tween® 20 de rendimiento de fago se incubaron a placas previamente recubiertas con LRP5E3/E4 durante 3 horas. Los pocillos se lavaron con PBS–0,05% Tween® 20 diez veces. El fago unido se eluyó con 150ul/pocillo HCl 50mM, KCl 500mM durante 30 minutos, y posteriormente se neutralizó mediante 50ul/pocillo de Tris 1M pH8, se tituló y se propagó para la siguiente ronda. Para las rondas posteriores, se realizó cribado de las genotecas de fagos en fase de solución, donde la genoteca de fagos se incubó con concentración inicial de proteína objetivo biotinilada 100 nM (la concentración se basa en un valor de IC50 de fago de clon parental) en 100µl de buffer SuperBlock (Pierce Biotechnology) durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó adicionalmente 10X con SuperBlock, y se aplicaron 100µl/pocillo a pocillos recubiertos con NeutrAvidin® (10µg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente con suave agitación. Para determinar la unión al fondo, pocillos control que contenían fago se capturaron en placas recubiertas con neutravidina. Luego el fago unido se lavó, se eluyó y se propagó según lo descrito para la primera ronda. Se llevaron a cabo cinco rondas más de clasificación de las soluciones junto con severidad de selección en aumento. El primer par de rondas es para selección por asociación (on–rate) disminuyendo la concentración de proteína objetivo biotinilada de 100nM a 0,5nM, y las dos últimas rondas es para la selección por disociación (off–rate) agregando cantidades en exceso de proteína objetivo no biotinilada (300 a 1000 veces más) para sacar de competición a los aglutinantes más débiles a temperatura ambiente.

ELISA para Cribado de Afinidad de Alto Rendimiento (Competición de Un Solo Punto)

Las colonias se escogieron de la sexta ronda de cribado para selección. Se cultivaron colonias durante la noche a 37°C en 1 ml/pocillo de medio 2YT con 50µg/ml de carbenicilina y 1×10^{10} /ml M13KO7 en placa de 96 pocillos (Falcon). De la misma placa, se incluyó una colonia de fago parental infectado XL–1 como control. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con 100µl/pocillo de LRP5E3/E4 (0,5µg/ml) en PBS a 4°C durante toda la noche. Las placas se bloquearon con 150µl de 1% BSA y 0,05% Tween® 20 en PBS 20 durante 1 hora.

35 ul del sobrenadante de fago se diluyó con hasta 75 ul en buffer de ELISA (ensayo de inmunoabsorbencia vinculado con enzima) (PBS con 0,5% BSA, 0,05% Tween® 20) con o sin 5nM LRP5E3/4 y se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente en una placa F (NUNC). Se transfirieron 95µl de mezcla

lado a lado a las placas recubiertas con antígeno. La placa se agitó suavemente durante 15 min y se lavó diez veces con PBS–0,05% Tween® 20. Se cuantificó la unión agregando anticuerpo anti- M13 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) en buffer de ELISA (1:2500) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS–0,05% Tween® 20 diez veces. Luego, se agregaron 100µl/pocillo de sustrato de Peroxidasa al pocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 100µl de ácido fosfórico 0,1M (H_3PO_4) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la DO (densidad óptica) de cada pocillo usando un lector de placas de ELISA convencional a 450 nm. En comparación con la reducción de la DO_{450nm} (%) del pocillo de fago parental (100%), los clones que tenían la reducción de DO_{450nm} (%) inferior a 50% se escogieron para análisis de secuencia. Los clones únicos se seleccionaron para preparación de fago para determinar la afinidad de unión (IC_{50} de fago) contra antígeno objetivo LRP5E3/E4 mediante comparación con el clon parental. El clon que demostró la mayor mejora de la afinidad se reformateó en IgG1 humana para la producción de anticuerpos y análisis cinético de unión BIAcore™ adicional y otros ensayos *in vitro* o *in vivo*. Las secuencias de dominio variable para ciertos anticuerpos que fueron identificados mediante este proceso se muestran en las Figuras 4 y 5. En esta memoria descriptiva, los prefijos “YW629” y “P6C” pueden utilizarse indistintamente. Por consiguiente, por ej., el anticuerpo descrito como YW629.51.61 es el mismo que P6C.51.61.

Caracterización de Anticuerpos Anti–LRP5 (BIAcore)

Se midieron las afinidades de unión de IgGs anti–LRP5E3/E4 mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, por sus siglas en inglés) usando un instrumento BIAcore™–T100. Se capturaron IgGs humanas anti– LRP5E3/E4 mediante anticuerpo Fc anti- humano de ratón (GE Healthcare, cat# BR–1008–39) recubierto en chips biosensores CM5 para lograr aproximadamente 200 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones seriadas dobles (500nM a 0,245nM) de LRP5E3/E4 humano (GNE) en buffer de HBS-P (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, 0,005% surfactante P20) a 25°C con una velocidad de flujo de 30 µl/min. Se calcularon las constantes de asociación (k_{on}) y las constantes de disociación (k_{off}) usando un modelo de unión simple Langmuir uno a uno (Programa Informático de Evaluación BIAcore versión 2.0.2).

Se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la relación k_{off}/k_{on} . Los resultados de este análisis para los anticuerpos en las Figuras 4 y 5 se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Análisis BIAcore de anticuerpos anti-LRP5

Ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
YW629.42	2.26×10^4	1.16×10^{-3}	5.16×10^{-8}
YW629.42.57	3.01×10^4	1.63×10^{-4}	5.42×10^{-9}
YW629.42.58	3.13×10^4	8.69×10^{-5}	2.78×10^{-9}
YW629.42.65	3.79×10^4	9.63×10^{-5}	2.54×10^{-9}
YW629.51	2.37×10^5	3.09×10^{-3}	1.30×10^{-8}
YW629.51.13	3.27×10^5	3.69×10^{-4}	1.13×10^{-9}
YW629.51.61	2.44×10^5	1.15×10^{-4}	4.70×10^{-10}
YW629.51.63	3.37×10^5	1.99×10^{-4}	5.92×10^{-10}
YW629.51.77	3.76×10^5	1.65×10^{-4}	4.38×10^{-10}
YW629.51.78	3.78×10^5	7.24×10^{-5}	1.92×10^{-10}
YW629.51.80	3.87×10^5	1.04×10^{-4}	2.68×10^{-10}

Ejemplo 2: Identificación de anticuerpo con actividad potenciadora de la ruta de Norrin

Norrin hace señales a través de un complejo de membrana que comprende LRP5, Frizzled4 (FZD4) y Tetraspanin12 (TSPAN12). Las mutantes han sido identificadas en cada uno de Norrin (por ej. Norrin–C95R), FZD4 (por ej. FZD4–M157V) y TSPAN12 (por ej. TSPAN12–G188R), las cuales exhiben deficiencias de señalamiento. Nosotros ensayamos la capacidad de diversos anticuerpos de LRP5 para impactar sobre el señalamiento mediado por Norrin.

En placas de 24 pocillos, 1.6×10^5 células/pocillo fueron transfectadas con mezcla de ADN que contenía mezcla informante de b–Catenina (TOPFlash, pRL–CMV, y pCan–myc–lef–1), LRP5, y Fzd4 o Fzd4–M157V. Veinticuatro horas después de la transfección, se agregó la cantidad indicada de cada anticuerpo LRP5. Una hora después, se agregaron 125 ng/ml de Norrin recombinante a pocillos según lo indicado. Luego de una incubación adicional de 16 horas a 37°C, las células se lisaron y se midió la expresión de luciferasa de Luciérnaga y Renilla usando Reactivos Promega Dual–Glo® Reagents. Los valores de luciferasa de luciérnaga se normalizaron a expresión de Renilla. Norrin activa la expresión del genes informantes en 5 veces con relación a sin ligando. La adición de cantidades

en aumento de anticuerpo potencia la actividad de Norrin hasta ~10 veces a 0,1–1 µg/ml en todos los anticuerpos ensayados (Figura 1A). Cuando Fzd4–M157V es sustituido por Fzd4 en la transfección, la activación de Norrin es reducida solamente 2 veces. La adición de anticuerpos LRP5 rescata el señalamiento defectuoso hasta niveles que se asemejan a Fzd4 tipo salvaje (Figura 1B). Estos datos indican que los anticuerpos anti–LRP5 potencian el señalamiento de Norrin/Fzd4 y rescatan la mutación Fzd4–M157V.

Se sembraron 3×10^5 células microvasculares endoteliales de retina humanas (HREMVC, por sus siglas en inglés) en un plato de 6 pocillos. Al día siguiente se agregaron 10 µg/ml del anticuerpo indicado, seguido por 1,25 µg/ml de Norrin, una hora más tarde. Después de 24 horas adicionales, el ARN fue aislado para análisis de Q–PCR de genes objetivo de Norrin, PV–1 (regulado descendentemente por Norrin) y Axin–2 (regulado ascendentemente por Norrin). La adición de Norrin regula hacia arriba la expresión de Axin–2 ~1.6 veces y regula hacia abajo PV–1 ~0,7 veces, con relación a sin ligando. La adición de anticuerpos LRP5 indicados regula hacia arriba adicionalmente Axin–2 hasta ~2 veces y regula hacia abajo PV–1 hasta ~0,5 veces (Figura 2A). Se sembraron 3×10^5 HREMVC en platos de 6 pocillos. Una vez que las células se habían adherido (~4 horas), las mismas se transfectaron con 100 nM control o Tspan12 siRNA usando reactivo de transfección DharmaFECT®. Al día siguiente las células se sembraron en una placa de 24 pocillos y se trataron con anticuerpo indicado y ligando (como se describió anteriormente). Según lo indicado mediante la medición de la expresión del gen Axin–2, el knockdown de Tspan12 evita la activación con Norrin. La adición de 10 µg/ml de los anticuerpos LRP–5 indicados rescata parcialmente este señalamiento de Norrin defectuoso (Figura 2B). Estos datos indican que los anticuerpos LRP5 potencian la actividad de Norrin y rescatan la pérdida de Tspan12.

A continuación ensayamos la actividad de los anticuerpos anti–LRP5 *in vivo*. Se trataron compañeros de jaula con anulación (knockout (KO)) de *Tspan12* y del tipo salvaje con 25 mg/kg de anti–gD (anticuerpo control negativo) o con anticuerpo anti–LRP5 (YW629.42) diariamente de P3–P14. En P15, se les quitó el núcleo a los ojos y las retinas se recolectaron para la tinción vascular con isolectina biotinilada B4. Las retinas se tiñeron con estreptavidina–AF488, con preparación completa, y se les tomaron imágenes usando microscopía confocal. Se compilaron proyecciones XY y Z desde pilas de 1,6 micrones capturadas a través del espesor de cada retina. Según lo esperado, los vasos sanguíneos de la

retina con anulación (KO) de *Tspan12* se paran en el plexus vascular superficial y forman pequeñas agrupaciones vasculares patológicas justo debajo de la capa celular ganglional. El tratamiento con P6C.42, pero no con anticuerpo control anti-gD, rescata parcialmente el defecto vascular de KO *Tspan12* promoviendo la vascularización de capas profundas y reduciendo el agrupamiento vascular anormal (Figura 3A). En P15, los ratones con anulación (KO) de *Tspan12* no pueden formar un lecho vascular plexiforme interno (IPL, por sus siglas en inglés) que es típico en ratones tipo salvaje. El tratamiento con YW629.42 restaura parcialmente la vasculatura de IPL en comparación con la región similar en ratones tratados con anti-gD. (n=3 animales/ grupo de tratamiento; Figura 3B). Estos datos demuestran que un anticuerpo anti-LRP5 rescata parcialmente defectos vasculares en los ratones con anulación (knockout) de *Tspan12 in vivo*.

Los ratones compañeros de jaula con anulación (KO) de *Tspan12* y heterocigóticos también fueron tratados con 25 mg/kg de anticuerpo anti-gD o anti-LRP5 (P6C.51.61). Para los datos mostrados en la Figura 6A, los ratones fueron tratados diariamente de P6-P15 y sacrificados en P16 (6 ratones/ grupo de tratamiento). Se les quitó el núcleo a los ojos y las retinas se recolectaron para la tinción vascular con isoelectina biotinilada B4. Las retinas se tiñeron con estreptavidina-AF488, con preparación completa, y se les tomaron imágenes usando microscopía confocal. Se compilaron proyecciones XY y Z desde pilas de 1,6 micrones capturadas a través del espesor de cada retina. Los ratones *Tspan12* +/- exhiben una vasculatura normal de la retina que consiste en tres capas vasculares distintas (Figura 6A, izquierda, barra de escala 100 μ m). Según lo esperado, los vasos sanguíneos de la retina de los ratones *Tspan12* -/-, tratados con anticuerpo control anti-gD, se paran en el plexus vascular superficial y forman pequeñas agrupaciones vasculares patológicas debajo de la capa celular ganglional (Figura 6A, centro). El tratamiento con P6C.51,61 rescata parcialmente el defecto vascular de *Tspan12* promoviendo la vascularización de capas profundas y reduciendo el agrupamiento vascular anormal (Figura 6A, derecha). Para los datos mostrados en la Figura 6B, los ratones fueron tratados diariamente de P3-P15, seguido por días alternos de P15-P30 (8 ratones/ grupo de tratamiento). En P31, los ojos fueron extirpados y las retinas fueron recolectadas y tratadas según lo descrito anteriormente. Se tomaron imágenes de los vasos sanguíneos en la capa plexiforme interna (IPL, por sus siglas en inglés) mediante microscopía confocal. La IPL de ratones *Tspan12* +/- contiene la red capilar sana típica (Figura 6B, izquierda, barra de escala 50 μ m), mientras que *Tspan12* -/-

tratados con anticuerpo control anti-gD no forman una red capilar y desarrollan fragmentos de vasos sanguíneos anormales en la IPL (Figura 6B, centro). El tratamiento con P6C.51.61 restaura parcialmente la formación de red capilar en la IPL (Figura 6B, derecha).

A continuación analizaron anticuerpos anti-LRP5 en un modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR, por sus siglas en inglés), que recapitula ciertas características patológicas de trastornos vasculares de la retina de adultos, tales como disminución del flujo capilar y angiogénesis patológica en oclusión venosa de retina y retinopatía diabética. El modelo consiste en 2 fases: una fase hiperóxica de días posnatales 7-12 (P7-P12) que da como resultado la obliteración del vaso en la retina central, y una fase hipóxica relativa de P12-P17 que conduce a angiogénesis patológica. Brevemente, durante la fase 1, ratones neonatales P7 se colocan en una cámara hiperóxica que consiste en 75% de oxígeno durante 5 días. Durante esta fase, la vasculatura de la retina existente se revierte, dando como resultado la obliteración del vaso alrededor de la cabeza del nervio óptico en el centro. Durante la segunda fase, se crían ratones P12 en aire ambiente que consiste en 20% de oxígeno. La obliteración del vaso central conduce a una respuesta hipóxica que causa angiogénesis patológica. Para los datos mostrados en la Figura 7A, los ratones C57Bl6/N fueron sometidos al procedimiento de OIR según lo descrito anteriormente. Los ratones fueron tratados con 25 mg/kg de anticuerpo anti-gD (anticuerpo control negativo) o anti-LRP5 (P6C.51.61) diariamente de P12-P17. En P17, los ojos fueron extirpados y las retinas fueron recolectadas y teñidas con isoelectina B4 según lo descrito con anterioridad. El área total de la retina, el área con obliteración del vaso (subrayada en el centro), y la vasculatura patológica se midieron usando el programa informático de toma de imágenes Fiji. La Figura 7B muestra el análisis de los datos y a pesar del hecho de que no hubo diferencia significativa alguna en el área total de la retina entre grupo de tratamiento, los ratones tratados con P6C.51.61 tuvieron un recrecimiento vascular significativamente mayor dentro del área con obliteración del vaso que los ratones compañeros de jaula tratados con anti-gD. La Figura 7C muestra que el recrecimiento vascular aumentado en los animales tratados con P6C.51.61 fue acompañado por una tendencia hacia una reducción de la formación de los vasos sanguíneos patológicos con relación al grupo tratado con anti-gD. n=5 animales/grupo de tratamiento.

Ejemplo 3: Análisis de actividad potenciadora de la ruta de Norrin de anticuerpos anti-LRP5

Llevamos a cabo experimentos para comprender el mecanismo mediante el cual nuestros anticuerpos anti-LRP5 actúan sobre la ruta de Norrin y sus otros componentes. En placas de 24 pocillos, se transfectaron 1.6×10^5 células/ pocillo con una mezcla de ADNs que contienen TOPFlash, pRL-CMV, y pCan-myc-lef-1, LRP5, FZD-4, y ADNc que codifica los ligandos indicados (Norrin, o Wnt7b, o Wnt3a). Dieciseis horas después de la transfección, se agregaron 10 µg/ml de anticuerpo P6C.61.51. Luego de una incubación adicional de 16 horas a 37°C, las células fueron lisadas y se midió la expresión de luciferasa de Luciérnaga y Renilla usando Reactivos Promega Dual-Glo® Reagents. Los valores de luciferasa de luciérnaga se normalizaron a la expresión de la Renilla. La Figura 8A muestra que Norrin activa la expresión de genes informantes 6 veces con relación al caso de sin ligando y que la adición de 10µg/ml de P6C.51.61 potencia la actividad de Norrin en 3 veces con relación a Norrin solamente. La Figura 7B muestra experimentos que demuestran que Wnt7b activa la expresión de la luciferasa en ~20 veces en ausencia de anticuerpo y aumento de 2 veces con respecto a Wnt7b por P6C.51.61. La Figura 7C muestra que la presencia de Wnt3a activa la expresión de luciferasa en >40 veces en ausencia de anticuerpo pero esta actividad es significativamente antagonizada en presencia de P6C.51.61. En conjunto, estos datos muestran que P6C.51.61 potencia el señalamiento de Norrin y Wnt7b, aunque antagoniza el señalamiento de Wnt3a.

Fzd4_{M157V} y Norrin_{C95R} son mutaciones que se producen en pacientes con trastornos de espectro FEVR y estas mutaciones conducen a una disminución del agrupamiento en el complejo de receptores Fzd4/LRP5/Norrin (Junge *et al.* Cell 139:299-311 (2009)). Junge *et al.* demostraron que la sobreexpresión de TSPAN12 podría rescatar los defectos de agrupamiento asociados con Fzd4_{M157V} y Norrin_{C95R} y restauran el señalamiento hasta los niveles tipo salvaje. Analizamos si P6C.51.61 podría agrupar el complejo de receptores y similarmente rescatar estas mutaciones. En placas de 24 pocillos, se transfectaron 1.6×10^5 células/pocillo con una mezcla de ADNs que contiene TOPFlash, pRL-CMV, pCan-myc-lef-1, LRP5, Fzd4 o FZD4M157V, y Norrin o Norrin_{C95R}. Dieciseis horas después de la transfección, se agregaron 10 µg/ml de anticuerpo P6C.61.51 según lo indicado. Después de una incubación adicional de 16 horas a 37°C, las células fueron lisadas y se midió la expresión de luciferasa de Luciérnaga y Renilla

usando Reactivos Promega Dual-Glo®. Se normalizaron los valores de luciferasa de luciérnaga a la expresión de Renilla. La Figura 8A muestra que Norrin activa la expresión de genes informantes en ~6 veces con relación al caso de sin ligando en presencia de Fzd4 tipo salvaje. Bajo estas condiciones, la adición de 10µg/ml de P6C.51.61 potencia la actividad de Norrin en 3 veces con relación a Norrin solamente. Cuando Fzd4_{M157V} es sustituido por Fzd4 en la transfección, se reduce la activación de Norrin a ~2 veces con relación a sin ligando. La adición de P6C.51.61 rescata el señalamiento defectuoso de Fzd4_{M157V} hasta niveles que se asemejan a Fzd4 tipo salvaje (línea punteada). La Figura 8B muestra que el reemplazo de Norrin con Norrin_{C95R} conduce a una disminución significativa en la activación de la ruta en ausencia de anticuerpo pero en presencia de P6C.51.61, se restaura la activación de Norrin_{C95R} hasta el nivel asociado con Norrin tipo salvaje (línea punteada). Estos resultados demuestran que P6C.51.61 rescata mutaciones en componentes de receptores que reducen el agrupamiento de receptores.

A continuación analizamos el impacto de la valencia del anticuerpo de actividad. Descubrimos que se requiere unión bivalente para la potenciación anti-LRP5 del señalamiento de Norrin, aunque no la inhibición del señalamiento de Wnt3a. En placas de 24 pocillos, se transfectaron 1.6×10^5 células / pocillo con una mezcla de ADNs que contenía TOPFlash, pRL-CMV, y pCan-myc-lef-1, LRP5, y FZD-4. Veinticuatro horas después de la transfección, se agregó la cantidad indicada de cada anticuerpo LRP5. Una hora más tarde, se agregaron 125ng/ml de Norrin recombinante o 200ng/ml de Wnt3a. Después de una incubación adicional de 16 horas a 37°C, las células fueron lisadas y se midió la expresión de luciferasa de Luciérnaga y Renilla usando Reactivos Promega Dual-Glo®. Se normalizaron los valores de luciferasa de luciérnaga a la expresión de Renilla. La Figura 10A muestra que Norrin activa la expresión de genes informantes en ~8 veces con relación al control sin ligando. La adición de 10µg/ml de anticuerpo LRP5 bivalente (P6C.51) potencia la actividad de Norrin en >2 veces pero la adición de 10µg/ml de anticuerpo (Fab) LRP5 monovalente no puede potenciar el señalamiento de Norrin. La Figura 10B muestra que el anticuerpo anti-LRP5 antagoniza el señalamiento de Wnt3a en presencia de 10µg/ml de LRP5 bivalente o monovalente. Estos datos sugieren que se requiere la naturaleza bivalente del MAb anti-LRP5 MAb para el agrupamiento del complejo de receptores, lo cual se sabe que se requiere para el señalamiento de Norrin.

Si bien la invención que antecede ha sido descrita con ciertos detalles a modo de ilustración y ejemplo con el objetivo de comprenderla mejor, las descripciones y ejemplos no deberían interpretarse como una limitación al alcance de la invención. Las descripciones de toda patente y literatura científica mencionadas en esta invención se incorporan expresamente en su totalidad a modo de referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO

<130> P4855R1

<140>

<141>

<150> 61/588.100

<151> 18-01-2012

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln
115

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 2
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln
115

<210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 3
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln
115

<210> 4
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln
115

<210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ile Pro Gln Ser Tyr Pro Phe Ala Ser Tyr Lys Ser Gly
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ile Pro Gln Ser Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Lys Ser Gly
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ile Pro Gln Ser Tyr Pro Phe Ala Ser Tyr Lys Ser Gly
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ile Pro Gln Ser Tyr Pro Phe Ala Ser Tyr Lys Ser Gly
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ile Pro Gln Ser Tyr Pro Phe Ala Ser Tyr Lys Ser Gly
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115

<210> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ile Pro Gln Ser Tyr Pro Phe Ala Ser Tyr Lys Ser Gly
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ile Pro Gln Ser Tyr Pro Phe Ala Ser Tyr Lys Ser Gly
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 108

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

 <400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

 <210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<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 Arg Ala Ser Gln Val Met Gly Tyr Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 19

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 19

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 20

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Glu 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 21

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 23
Tyr Tyr Arg Tyr Ala Pro Tyr Arg Ser Leu Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazar="Arg"

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> /nota="Residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna con respecto a la anotación para dicha posición"

<400> 24
 Trp Ile Pro Gln Ser Tyr Pro Phe Ala Ser Tyr Lys Ser Gly Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

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

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="Ser"

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> /nota="Residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna con respecto a la anotación para dicha posición"

<400> 25
 Gln Gln Tyr Tyr Leu Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar="Gly"

<220>

<221> característica_misc

<222> (2)..(2)

<223> /nota="Residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna con respecto a la anotación para dicha posición"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(6)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> característica_misc

<222> (5)..(6)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Trp"

<220>

<221> característica_misc

<222> (8)..(8)

<223> /nota="Residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna con respecto a la anotación para dicha posición"

<400> 26

Gly	Ala	Ile	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5					10					15	

Lys Gly

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 27

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

Lys Gly

<210> 28

<211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar="Ser"

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> /nota="Residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna con respecto a la anotación para dicha posición"

<400> 28
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
 1 5 10

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 29
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="Gly" o "Ser" o "Val"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar="Met"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar="Gly" o "Ser" o "Tyr"

<220>
 <221> VARIANTE

<222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar="Ser" o "Tyr"

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (5)..(8)
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 30
 Arg Ala Ser Gln Ala Ile Phe Gly Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 31
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar="Thr"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="Arg"

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (4)..(5)
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 32
 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

```

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> característica_ misc
<222> (5)..(5)
<223> /nota="Residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
        con respecto a la anotación para dicha posición"

<400> 33
Gln Gln Tyr Tyr Leu Tyr Pro Phe Thr
1                5

<210> 34
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1                5                10                15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                20                25

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 35
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1                5                10

<210> 36
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 36
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1                5                10                15

```

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 37
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 37
 Trp Gly Gln
 1

<210> 38
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 39
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 40
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 41

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 42

<211> 1615

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Glu Ala Ala Pro Pro Gly Pro Pro Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ala Leu Cys Gly Cys Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser
 20 25 30

Pro Leu Leu Leu Phe Ala Asn Arg Arg Asp Val Arg Leu Val Asp Ala
 35 40 45

Gly Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Ile Val Val Ser Gly Leu Glu Asp
 50 55 60

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

Asp Val Ser Glu Glu Ala Ile Lys Gln Thr Tyr Leu Asn Gln Thr Gly
 85 90 95

Ala Ala Val Gln Asn Val Val Ile Ser Gly Leu Val Ser Pro Asp Gly
 100 105 110

Leu Ala Cys Asp Trp Val Gly Lys Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Glu
 115 120 125

Thr Asn Arg Ile Glu Val Ala Asn Leu Asn Gly Thr Ser Arg Lys Val
 130 135 140

Leu Phe Trp Gln Asp Leu Asp Gln Pro Arg Ala Ile Ala Leu Asp Pro
 145 150 155 160

Ala His Gly Tyr Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Glu Thr Pro Arg Ile

Thr Asp Thr Gly Thr Asp Arg Ile Glu Val Thr Arg Leu Asn Gly Thr
 435 440 445

Ser Arg Lys Ile Leu Val Ser Glu Asp Leu Asp Glu Pro Arg Ala Ile
 450 455 460

Ala Leu His Pro Val Met Gly Leu Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Glu
 465 470 475 480

Asn Pro Lys Ile Glu Cys Ala Asn Leu Asp Gly Gln Glu Arg Arg Val
 485 490 495

Leu Val Asn Ala Ser Leu Gly Trp Pro Asn Gly Leu Ala Leu Asp Leu
 500 505 510

Gln Glu Gly Lys Leu Tyr Trp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Lys Ile Glu
 515 520 525

Val Ile Asn Val Asp Gly Thr Lys Arg Arg Thr Leu Leu Glu Asp Lys
 530 535 540

Leu Pro His Ile Phe Gly Phe Thr Leu Leu Gly Asp Phe Ile Tyr Trp
 545 550 555 560

Thr Asp Trp Gln Arg Arg Ser Ile Glu Arg Val His Lys Val Lys Ala
 565 570 575

Ser Arg Asp Val Ile Ile Asp Gln Leu Pro Asp Leu Met Gly Leu Lys
 580 585 590

Ala Val Asn Val Ala Lys Val Val Gly Thr Asn Pro Cys Ala Asp Arg
 595 600 605

Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys Phe Phe Thr Pro His Ala Thr Arg
 610 615 620

Cys Gly Cys Pro Ile Gly Leu Glu Leu Leu Ser Asp Met Lys Thr Cys
 625 630 635 640

Ile Val Pro Glu Ala Phe Leu Val Phe Thr Ser Arg Ala Ala Ile His
 645 650 655

Arg Ile Ser Leu Glu Thr Asn Asn Asn Asp Val Ala Ile Pro Leu Thr
 660 665 670

Gly Val Lys Glu Ala Ser Ala Leu Asp Phe Asp Val Ser Asn Asn His
 675 680 685

Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Phe	Met	690	695	700	
Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	His	Val	Val	Glu	Phe	Gly	Leu	Asp	Tyr	Pro	705	710	715	720
Glu	Gly	Met	Ala	Val	Asp	Trp	Met	Gly	Lys	Asn	Leu	Tyr	Trp	Ala	Asp	725	730	735	
Thr	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Asp	Gly	Gln	Phe	Arg	740	745	750	
Gln	Val	Leu	Val	Trp	Arg	Asp	Leu	Asp	Asn	Pro	Arg	Ser	Leu	Ala	Leu	755	760	765	
Asp	Pro	Thr	Lys	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Glu	Trp	Gly	Gly	Lys	Pro	770	775	780	
Arg	Ile	Val	Arg	Ala	Phe	Met	Asp	Gly	Thr	Asn	Cys	Met	Thr	Leu	Val	785	790	795	800
Asp	Lys	Val	Gly	Arg	Ala	Asn	Asp	Leu	Thr	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gln	805	810	815	
Arg	Leu	Tyr	Trp	Thr	Asp	Leu	Asp	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Ser	Ser	Asn	820	825	830	
Met	Leu	Gly	Gln	Glu	Arg	Val	Val	Ile	Ala	Asp	Asp	Leu	Pro	His	Pro	835	840	845	
Phe	Gly	Leu	Thr	Gln	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Trp	Asn	850	855	860	
Leu	His	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala	Asp	Lys	Thr	Ser	Gly	Arg	Asn	Arg	Thr	865	870	875	880
Leu	Ile	Gln	Gly	His	Leu	Asp	Phe	Val	Met	Asp	Ile	Leu	Val	Phe	His	885	890	895	
Ser	Ser	Arg	Gln	Asp	Gly	Leu	Asn	Asp	Cys	Met	His	Asn	Asn	Gly	Gln	900	905	910	
Cys	Gly	Gln	Leu	Cys	Leu	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	His	Arg	Cys	Gly	Cys	915	920	925	
Ala	Ser	His	Tyr	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser	Ser	Arg	Asn	Cys	Ser	Pro	Pro	930	935	940	

Thr	Thr	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Gln	Lys	Ser	Ala	Ile	Ser	Arg	Met	Ile
945					950					955					960
Pro	Asp	Asp	Gln	His	Ser	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Pro	Leu	His	Gly	Leu
				965					970					975	
Arg	Asn	Val	Lys	Ala	Ile	Asp	Tyr	Asp	Pro	Leu	Asp	Lys	Phe	Ile	Tyr
			980					985					990		
Trp	Val	Asp	Gly	Arg	Gln	Asn	Ile	Lys	Arg	Ala	Lys	Asp	Asp	Gly	Thr
		995					1000						1005		
Gln	Pro	Phe	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser	Gln	Gly	Gln	Asn	Pro	Asp	
	1010					1015					1020				
Arg	Gln	Pro	His	Asp	Leu	Ser	Ile	Asp	Ile	Tyr	Ser	Arg	Thr	Leu	
	1025					1030					1035				
Phe	Trp	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Asn	Thr	Ile	Asn	Val	His	Arg	Leu	
	1040					1045					1050				
Ser	Gly	Glu	Ala	Met	Gly	Val	Val	Leu	Arg	Gly	Asp	Arg	Asp	Lys	
	1055					1060					1065				
Pro	Arg	Ala	Ile	Val	Val	Asn	Ala	Glu	Arg	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Phe	
	1070					1075					1080				
Thr	Asn	Met	Gln	Asp	Arg	Ala	Ala	Lys	Ile	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	
	1085					1090					1095				
Asp	Gly	Thr	Glu	Arg	Glu	Val	Leu	Phe	Thr	Thr	Gly	Leu	Ile	Arg	
	1100					1105					1110				
Pro	Val	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Thr	Leu	Gly	Lys	Leu	Phe	Trp	
	1115					1120					1125				
Val	Asp	Ala	Asp	Leu	Lys	Arg	Ile	Glu	Ser	Cys	Asp	Leu	Ser	Gly	
	1130					1135					1140				
Ala	Asn	Arg	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Ala	Asn	Ile	Val	Gln	Pro	Leu	
	1145					1150					1155				
Gly	Leu	Thr	Ile	Leu	Gly	Lys	His	Leu	Tyr	Trp	Ile	Asp	Arg	Gln	
	1160					1165					1170				
Gln	Gln	Met	Ile	Glu	Arg	Val	Glu	Lys	Thr	Thr	Gly	Asp	Lys	Arg	
	1175					1180					1185				
Thr	Arg	Ile	Gln	Gly	Arg	Val	Ala	His	Leu	Thr	Gly	Ile	His	Ala	

Gln	His	Gly	Pro	Phe	Thr	Gly	Ile	Ala	Cys	Gly	Lys	Ser	Met	Met
1445						1450					1455			
Ser	Ser	Val	Ser	Leu	Met	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Val	Pro	Leu	Tyr
1460						1465					1470			
Asp	Arg	Asn	His	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
1475						1480					1485			
Thr	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ile	Leu	Asn	Pro	Pro	Pro	Ser
1490						1495					1500			
Pro	Ala	Thr	Asp	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Met	Asp	Met	Phe	Tyr	Ser
1505						1510					1515			
Ser	Asn	Ile	Pro	Ala	Thr	Ala	Arg	Pro	Tyr	Arg	Pro	Tyr	Ile	Ile
1520						1525					1530			
Arg	Gly	Met	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Pro	Cys	Ser	Thr	Asp	Val	Cys
1535						1540					1545			
Asp	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ala	Ser	Arg	Trp	Lys	Ala	Ser	Lys	Tyr	Tyr
1550						1555					1560			
Leu	Asp	Leu	Asn	Ser	Asp	Ser	Asp	Pro	Tyr	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr
1565						1570					1575			
Pro	His	Ser	Gln	Tyr	Leu	Ser	Ala	Glu	Asp	Ser	Cys	Pro	Pro	Ser
1580						1585					1590			
Pro	Ala	Thr	Glu	Arg	Ser	Tyr	Phe	His	Leu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro
1595						1600					1605			
Ser	Pro	Cys	Thr	Asp	Ser	Ser								
1610						1615								

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a la proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP5), donde el anticuerpo potencia la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, el cual es un fragmento de anticuerpo que se une a LRP5.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende (a) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos YYRYAPYRSLGMDV (SEC ID NO: 23) o WIPQSYFPX₁SYKSGFDY, donde X₁ es A o R (SEC ID NO: 24), (b) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQYYX₁YPFT, donde X₁ es L o S (SEC ID NO: 25), y (c) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GX₁ISX₂X₃GX₄STYYADSVKG, donde X₁ es A o G, X₂ es A o S, X₃ es P o S, X₄ es S o W (SEC ID NO: 26), o SRISSNGGSTYYADSVKG (SEC ID NO: 27).
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYAMX₁, donde X₁ es H o S (SEC ID NO: 28), (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GX₁ISX₂X₃GX₄STYYADSVKG, donde X₁ es A o G, X₂ es A o S, X₃ es P o S, X₄ es S o W (SEC ID NO: 26), o SRISSNGGSTYYADSVKG (SEC ID NO: 27) y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos YYRYAPYRSLGMDV (SEC ID NO: 23) o WIPQSYFPX₁SYKSGFDY, donde X₁ es A o R (SEC ID NO: 24).
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, el cual comprende además (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQGISSYLA (SEC ID NO: 29) o RASQX₁X₂X₃X₄YLA, donde X₁ es A, G, S o V, X₂ es I o M, X₃ es F, G, S o Y, y X₄ es G, S o Y (SEC ID NO: 30); (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AASSLQS (SEC ID NO: 31) o DASX₁X₂ES, donde X₁ es S o T y X₂ es L o R (SEC ID NO: 32); y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQYYX₁YPFT, donde X₁ es L o S (SEC ID NO: 33).
8. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQGISSYLA (SEC ID NO: 29) o RASQX₁X₂X₃X₄YLA, donde X₁ es A, G, S o V, X₂ es I o M, X₃ es G, F, Y o S, y X₄

es G, Y o S (SEC ID NO: 30); (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AASSLQS (SEC ID NO: 31) o DASX₁X₂ES, donde X₁ es S o T y X₂ es L o R (SEC ID NO: 32); y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQYYX₁YPFT, donde X₁ es L o S (SEC ID NO: 33).

9. El anticuerpo de la reivindicación 6, el cual comprende además una o más secuencias estructurales de dominio variable de cadena pesada seleccionadas entre el grupo que consiste en SEC ID NO: 34–37.

10. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende (a) una secuencia VH que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno de SEC ID NOs: 1 a 11; (b) una secuencia VL que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno de SEC ID NOs: 12 a 22; o (c) una secuencia VH como en (a) y una secuencia VL como en (b).

11. El anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende una secuencia VH de uno de SEC ID NOs: 1 a 11.

12. El anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende una secuencia VL de uno de SEC ID NOs: 12 a 22.

13. Un anticuerpo que comprende una secuencia VH de uno de SEC ID NOs: 1 a 11 y una secuencia VL de uno de SEC ID NOs: 12 a 22.

14. El anticuerpo de la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo de IgG1 de longitud completa.

15. Ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1.

16. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.

17. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 16 de modo que se produzca el anticuerpo.

18. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un agente citotóxico.

19. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

20. El anticuerpo de la reivindicación 1 para utilizar como un medicamento.

21. El anticuerpo de la reivindicación 1 para utilizar en el tratamiento de una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia

patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, Enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva.

22. El anticuerpo de la reivindicación 1 para utilizar en la potenciación de la actividad de Norrin y/o señalamiento de Norrin/Fzd4.

23. El uso del anticuerpo de la reivindicación 1 en la manufactura de un medicamento.

24. El uso de la reivindicación 23, donde el medicamento es para el tratamiento de una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, Enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva.

25. El uso de la reivindicación 23, donde el medicamento es para la potenciación de la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4.

26. Un método para tratar a un individuo que tiene una retinopatía que incluye retinopatía diabética proliferativa, CNV, AMD, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, DME, miopia patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, CRVO, BRVO, neovascularización córnea, neovascularización de la retina, ROP, FEVR, Enfermedad de Coats, Enfermedad de Norrie, OPPG (Síndrome de Osteoporosis–Pseudoglioma), hemorragia de la subconjuntiva, o retinopatía hipertensiva que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de la reivindicación 1.

27. Un método para potenciar la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4 en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de la reivindicación 1 para potenciar la actividad de Norrin y/o el señalamiento de Norrin/Fzd4.

28. Un método para rescatar un defecto de señalamiento en un individuo causado por mutación en Norrin y/o Fzd4 que comprende administrar el anticuerpo de la reivindicación 1.

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpo anti-LRP5 y métodos para su preparación y uso.



61413
PR4855

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 8, 2013

PTAS

GRANT KALINOWSKI
1 DNA WAY
MS-49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

502185259

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/07/2013

REEL/FRAME: 029577/0130
NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR4855

ASSIGNOR:
YE, WEILAN

DOC DATE: 01/03/2013

ASSIGNOR:
BURTON, JEREMY BRYANT

DOC DATE: 01/03/2013

ASSIGNOR:
CHIU, CECILIA

DOC DATE: 01/04/2013

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
MS-49
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 61588100

FILING DATE: 01/18/2012

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTI-LRP5 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1

Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
CONVEYING PARTY DATA	
Name	Execution Date
Weilan Ye	01/03/2013
Jeremy Bryant Burton	01/03/2013
Cecilia Chiu	01/04/2013
RECEIVING PARTY DATA	
Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	MS-49
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080
PROPERTY NUMBERS Total: 1	
Property Type	Number
Application Number:	61588100
CORRESPONDENCE DATA	
Fax Number:	6509529881
<i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>	
Phone:	650-467-2607
Email:	pgolden@gene.com
Correspondent Name:	Grant Kalinowski
Address Line 1:	1 DNA Way
Address Line 2:	MS-49
Address Line 4:	South San Francisco, CALIFORNIA 94080
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR4855
NAME OF SUBMITTER:	Grant Kalinowski
Total Attachments: 4 source=Assignment I#page1.tif source=Assignment I#page2.tif source=Assignment I#page3.tif source=Assignment I#page4.tif	

CH \$40.00 61588100

ASSIGNMENT

WHEREAS, Weilan Ye and Jeremy Bryant Burton (an "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

ANTI-LRP5 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

for which an application Serial No. 61/588,100 (Docket No. PR4855) for Letters Patent has been filed by them on January 18, 2012; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;



Weilan Ye

01-03-13

Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US



Jeremy Bryant Burton

01-03-13

Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

ASSIGNMENT

WHEREAS, Weilan Ye, Yan Yu, Jeremy Bryant Burton and Cecilia Chiu (an "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

ANTI-LRP5 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

for which an application Serial No. 61/588,100 (Docket No. PR4855) for Letters Patent has been filed by them on January 18, 2012; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Weilan Ye Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

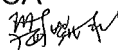
Yan Wu Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Jeremy Bryant Burton Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US



Jan 4th, 2013

Cecilia Chiu Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: ~~US~~ CA

 01/04/2013



PR 4855

GK/JWD

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICEUNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 11, 2013

PTAS

GRANT KALINOWSKI
1 DNA WAY
MS-49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080**502190104**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENTTHE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE
ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION
CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT
AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE
QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION
BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT
AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX
1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/10/2013

REEL/FRAME: 029603/0368
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR4855

ASSIGNOR:
WU, YAN

DOC DATE: 01/09/2013

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
MS-49
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 61588100

FILING DATE: 01/18/2012

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTI-LRP5 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
 Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
CONVEYING PARTY DATA	
Name	Execution Date
Yan Wu	01/09/2013
RECEIVING PARTY DATA	
Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
Internal Address:	MS-49
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080
PROPERTY NUMBERS Total: 1	
Property Type	Number
Application Number:	61588100
CORRESPONDENCE DATA	
Fax Number:	6509529881
<i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>	
Phone:	650-467-2607
Email:	pgolden@gene.com
Correspondent Name:	Grant Kalinowski
Address Line 1:	1 DNA Way
Address Line 2:	MS-49
Address Line 4:	South San Francisco, CALIFORNIA 94080
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR4855
NAME OF SUBMITTER:	Grant Kalinowski
Total Attachments: 2 source=Wu_Assignment#page1.tif source=Wu_Assignment#page2.tif	

CH \$40.00 61588100

ASSIGNMENT

WHEREAS, Yan Yu, (an "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

ANTI-LRP5 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

for which an application Serial No. 61/588,100 (Docket No. PR4855) for Letters Patent has been filed by them on January 18, 2012; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Yan Wu

Mailing address:

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US

Date

1/9/2013

Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

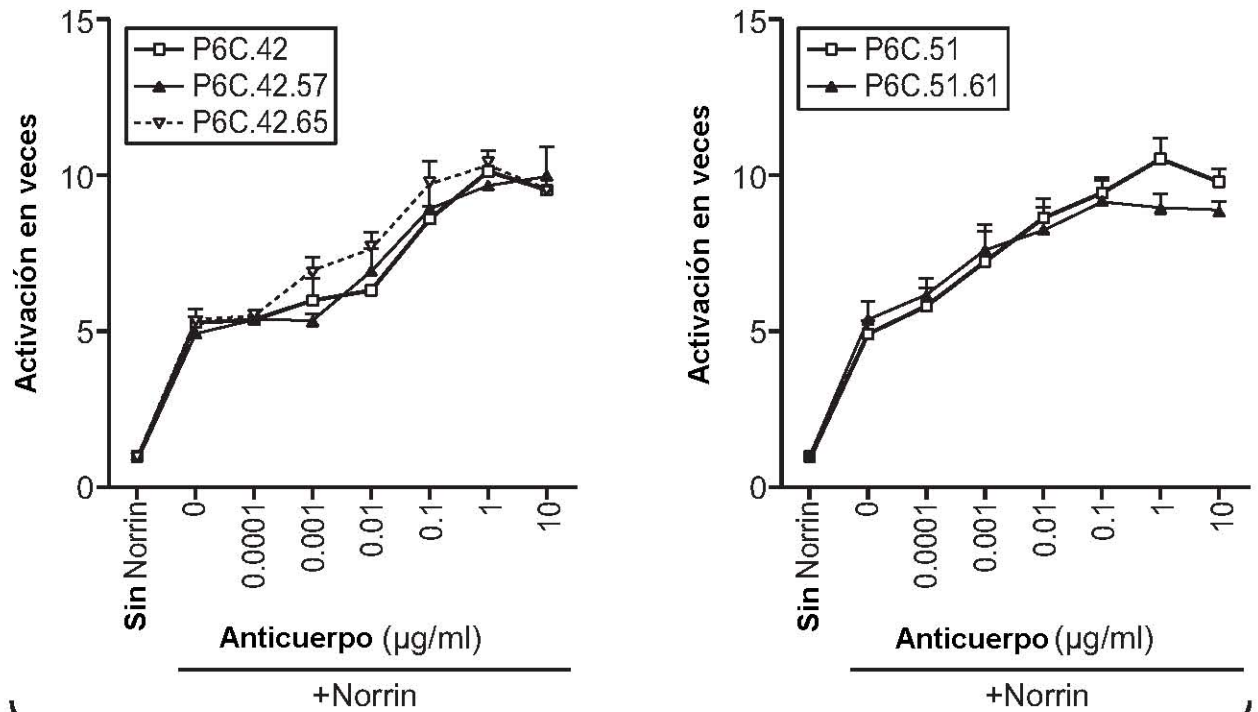
Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

this 6th day of December 2005

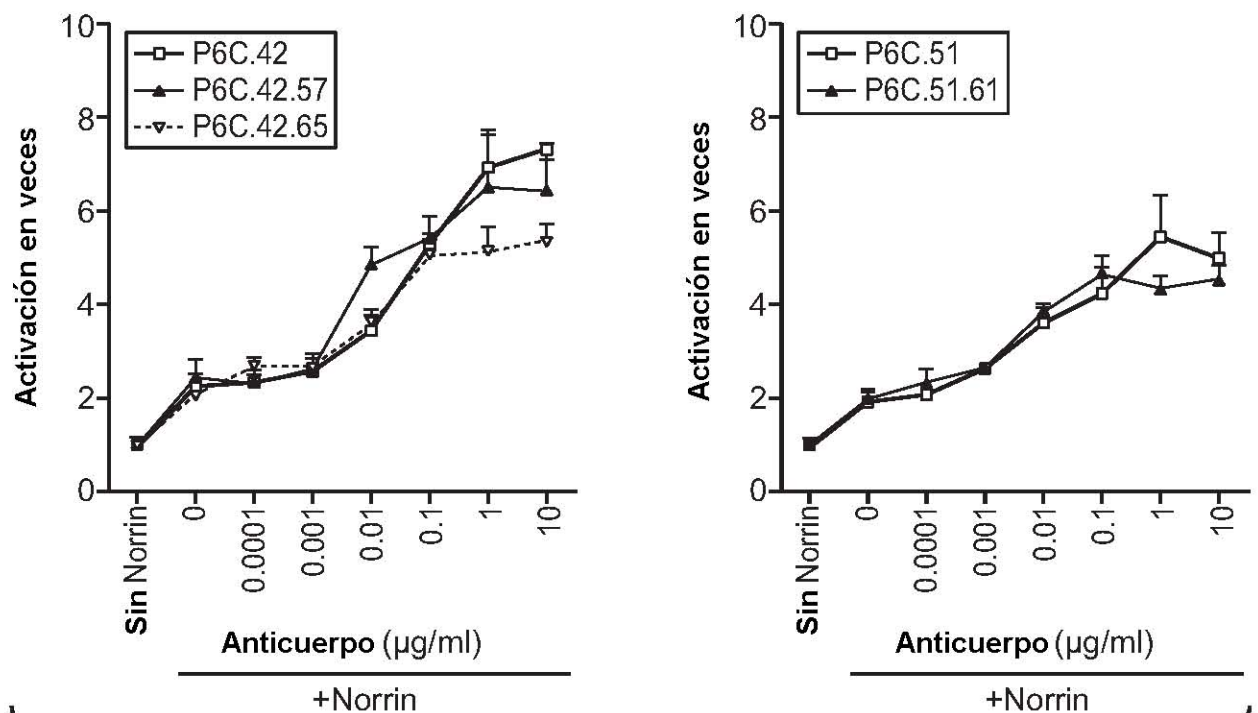
Signature

Name **Timothy R. Schwartz, Ph.D.**
Title **Section Patent Counsel**
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.

Anticuerpos de LRP5 Rescatan Mutación Fzd4_{M157V} en Ensayo 293T Topflash



Anticuerpos de LRP5 Rescatan Mutación Fzd4_{M157V} en Ensayo 293T Topflash



Anticuerpos LRP5 Potencian la Actividad de Norrin y Rescatan la Pérdida de TSpan12 en HREMVC in vitro

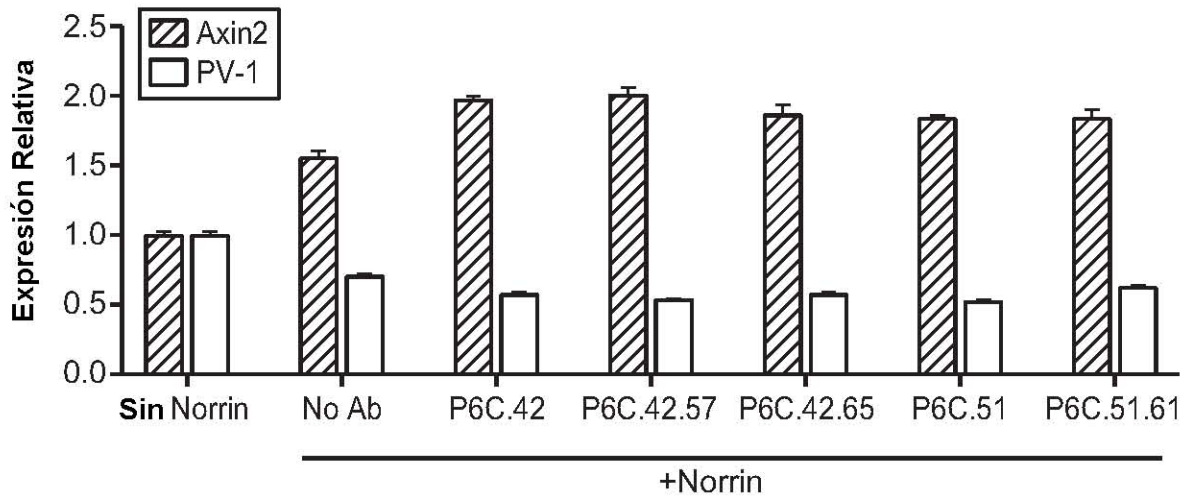


FIG. 2A

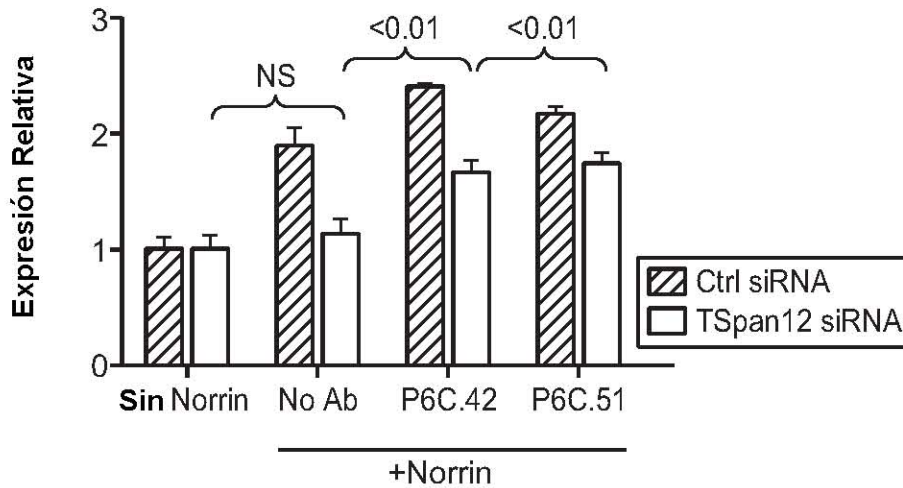


FIG. 2B

Anticuerpo en LRP5, P6C42, Rescata Parcialmente Defectos Vasculares en los Ratones con inactivación (Knockout) de TSpan12 in vivo

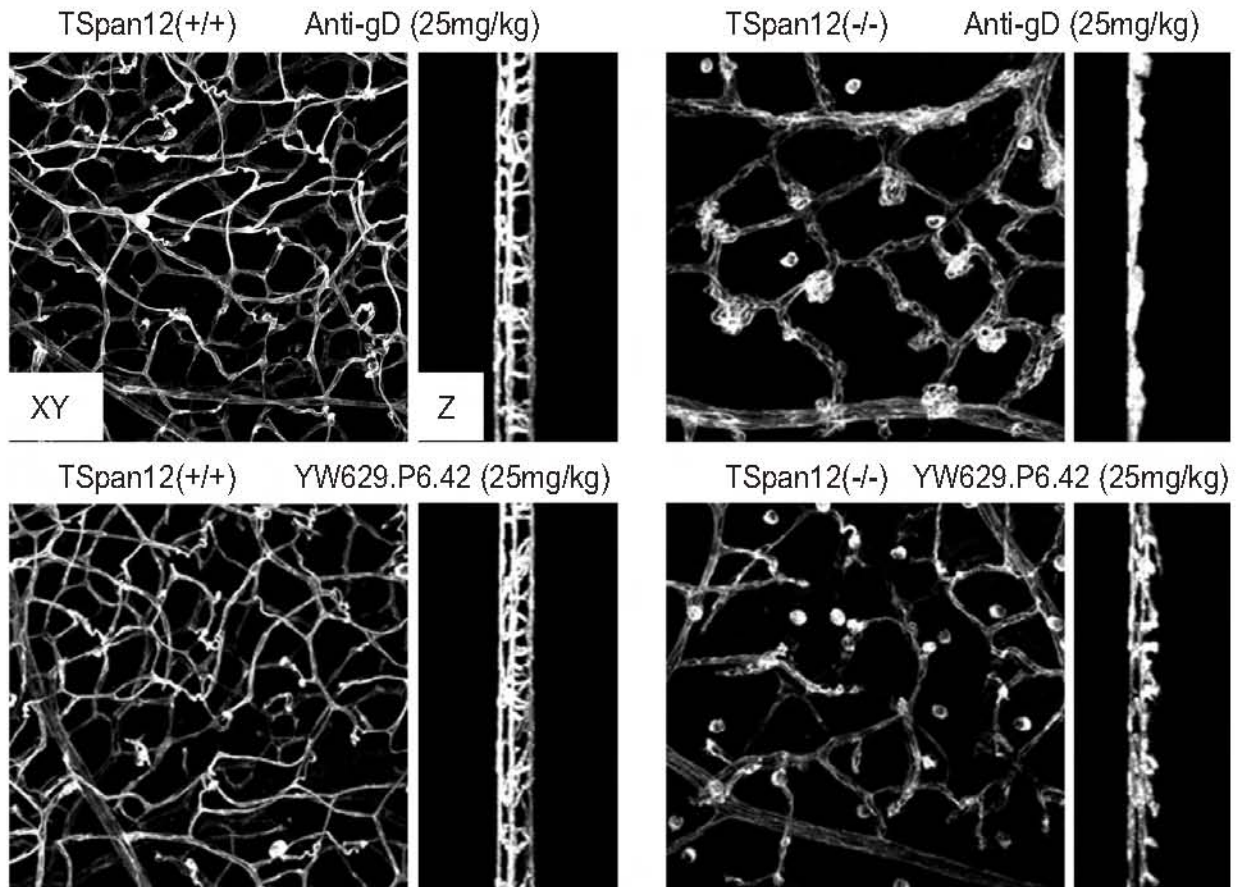


FIG. 3A

Anticuerpo en LRP5, P6C42, Rescata Parcialmente Defectos Vasculares en los Ratones con inactivación (Knockout) de TSpan12 in vivo

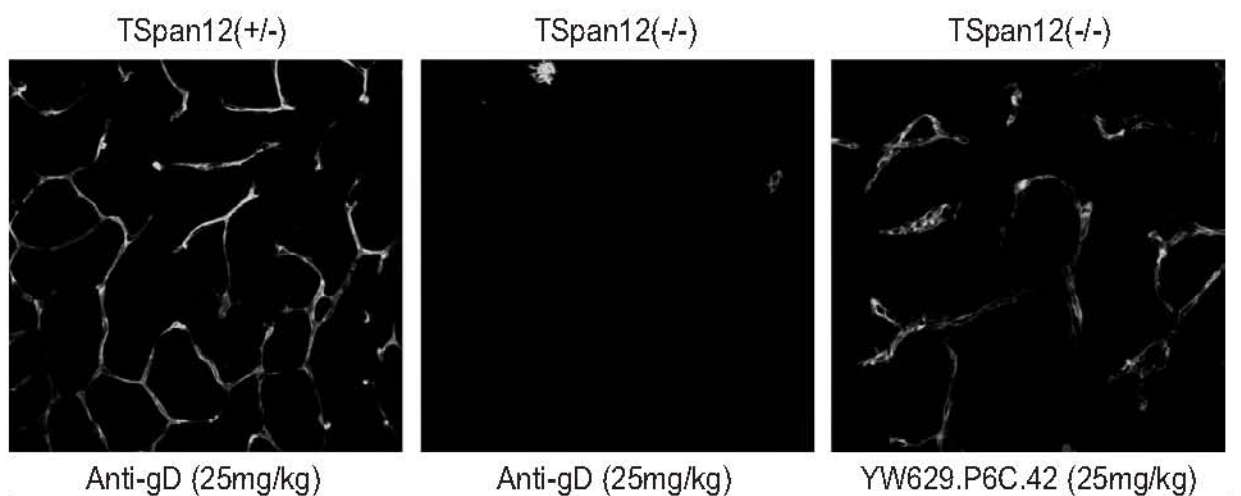


FIG. 3B

FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A
YW629.42	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A
YW629.42.57	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A
YW629.42.58	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A
YW629.42.65	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A
YW629.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A
YW629.51.13	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A
YW629.51.61	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A
YW629.51.63	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A
YW629.51.77	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A
YW629.51.78	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A
YW629.51.80	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	H	W	V	R	Q	A

FIG. 4A

Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
	Kabat - CDR H2																																									
	Chothia - CDR H2																																									
	Contact - CDR H2																																									
YW629.42	P	G	K	G	L	E	W	V	G	A	I	S	S	S	S	G	S	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	
YW629.42.57	P	G	K	G	L	E	W	V	G	A	I	S	S	S	S	G	S	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	
YW629.42.58	P	G	K	G	L	E	W	V	G	A	I	S	S	S	S	G	S	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	
YW629.42.65	P	G	K	G	L	E	W	V	G	A	I	S	S	S	S	G	S	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	
YW629.51	P	G	K	G	L	E	W	V	S	R	I	S	S	S	N	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L		
YW629.51.13	P	G	K	G	L	E	W	V	S	R	I	S	S	S	N	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L		
YW629.51.61	P	G	K	G	L	E	W	V	S	R	I	S	S	S	N	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L		
YW629.51.63	P	G	K	G	L	E	W	V	S	R	I	S	S	S	N	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L		
YW629.51.77	P	G	K	G	L	E	W	V	S	R	I	S	S	S	N	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L		
YW629.51.78	P	G	K	G	L	E	W	V	S	R	I	S	S	S	N	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L		
YW629.51.80	P	G	K	G	L	E	W	V	S	R	I	S	S	S	N	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L		
Kabat#	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	101	102	103	104	105	106			
	Kabat - CDR H3																																									
	Chothia - CDR H3																																									
	Contact - CDR H3																																									
YW629.42	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												Q
YW629.42.57	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												G
YW629.42.58	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												G
YW629.42.65	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												G
YW629.51	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												Q
YW629.51.13	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												Q
YW629.51.61	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												Q
YW629.51.63	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												Q
YW629.51.77	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												Q
YW629.51.78	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												Q
YW629.51.80	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Y	Y	Q	Y	A	P	Y	R	S	L	G												Q

FIG. 4B

FIG. 5A

FIG. 5B

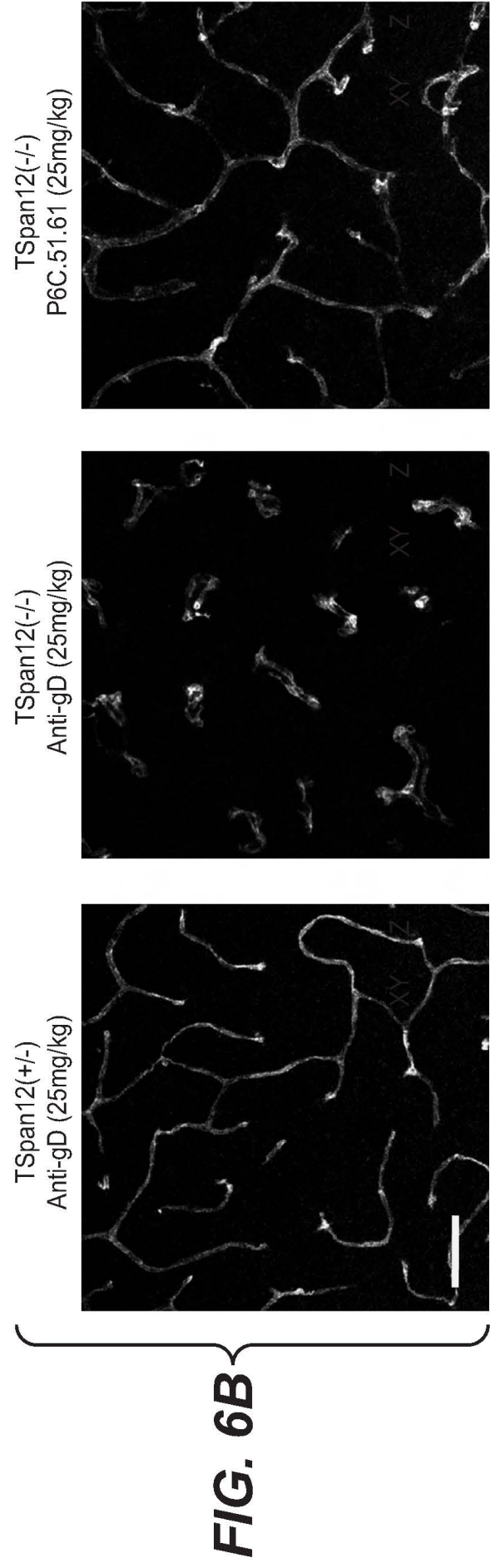
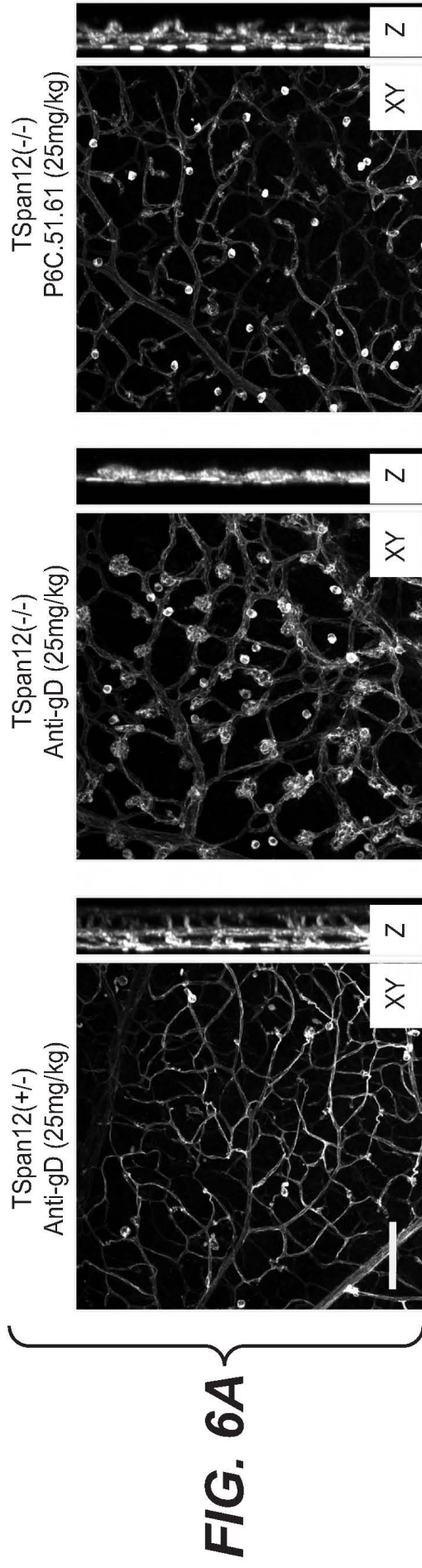
FIG. 5

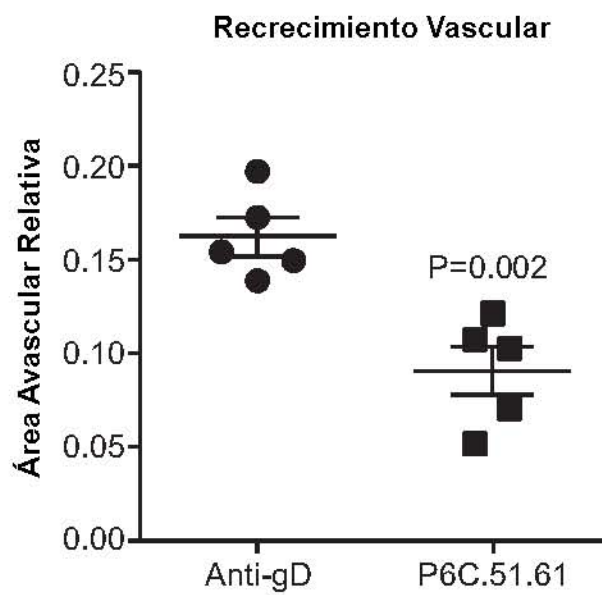
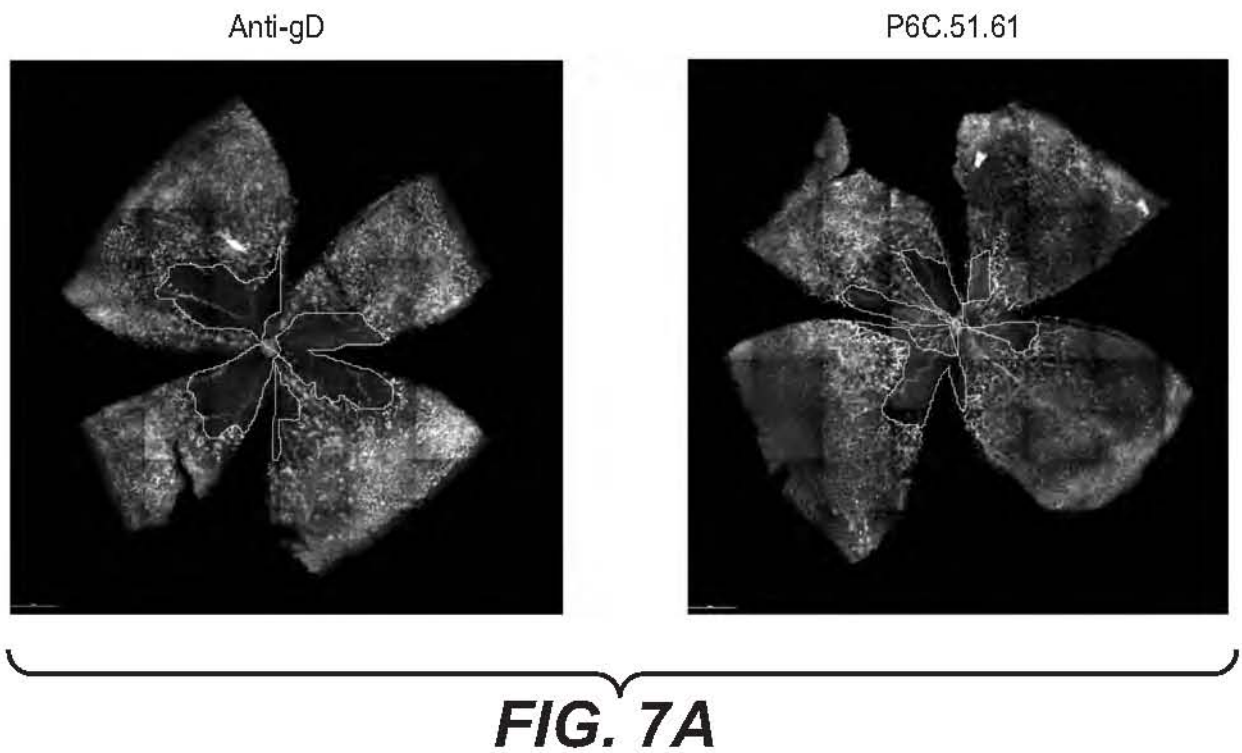
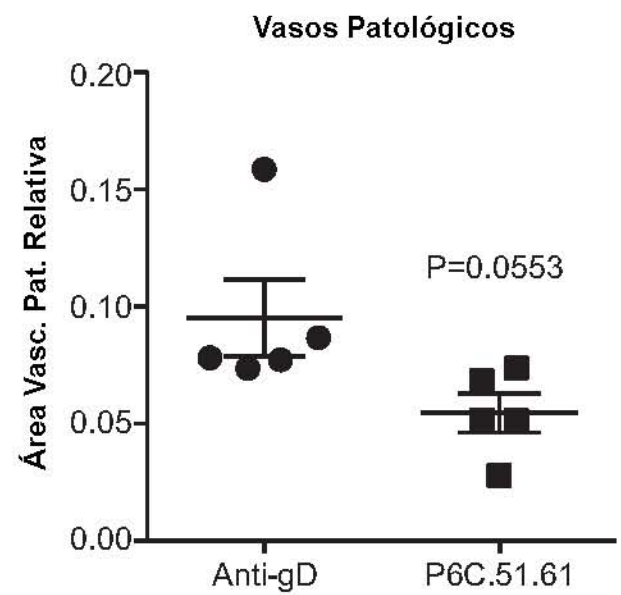
Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
	Kabat - CDR L1																																											
	Chothia - CDR L1																																											
	Contact - CDR L1																																											
YW629.42	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q							G	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	
YW629.42.57	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								G	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.42.58	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								G	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.42.65	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								G	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.51	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								G	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.51.13	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								G	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.51.61	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								V	M	G	Y	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.51.63	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								S	I	Y	Y	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.51.77	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								V	I	Y	G	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.51.78	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								G	I	F	Y	Y	L	A	W	Y	Q
YW629.51.80	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								A	I	Y	S	Y	L	A	W	Y	Q

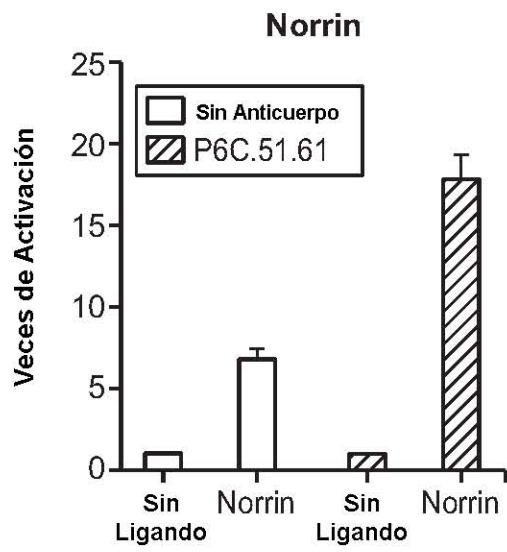
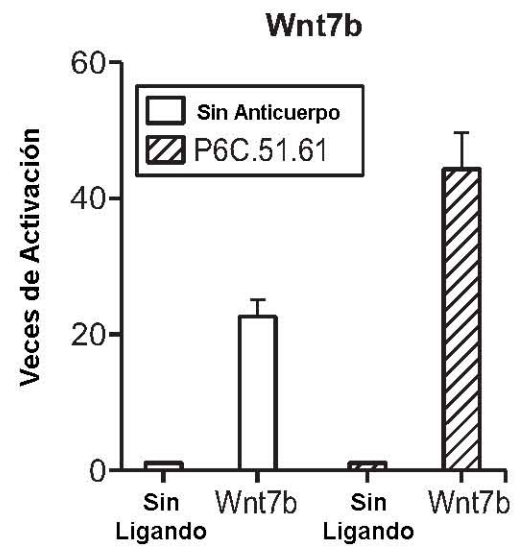
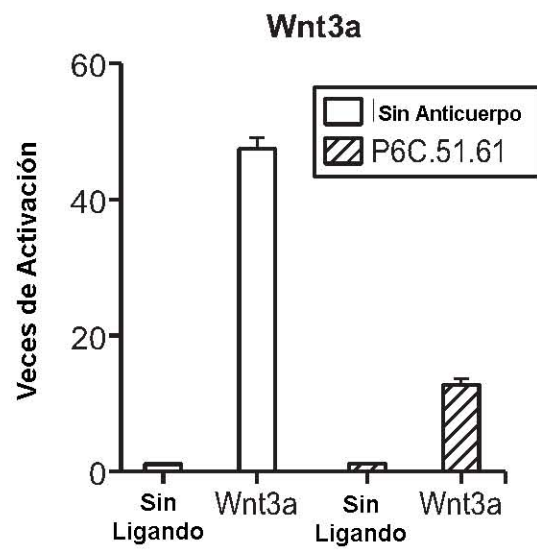
FIG. 5A

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	YW629.42	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.42.57	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.42.58	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.42.65	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.51	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.51.13	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.51.61	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.51.63	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.51.77	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.51.78	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
	YW629.51.80	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108															
	YW629.42	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.42.57	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.42.58	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.42.65	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	[L]	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.51	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.51.13	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.51.61	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.51.63	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.51.77	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.51.78	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														
	YW629.51.80	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R														

FIG. 5B



**FIG. 7B****FIG. 7C**

**FIG. 8A****FIG. 8B****FIG. 8C**

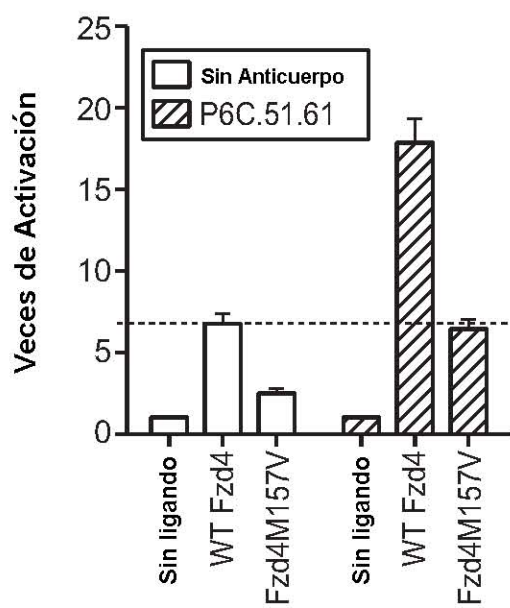


FIG. 9A

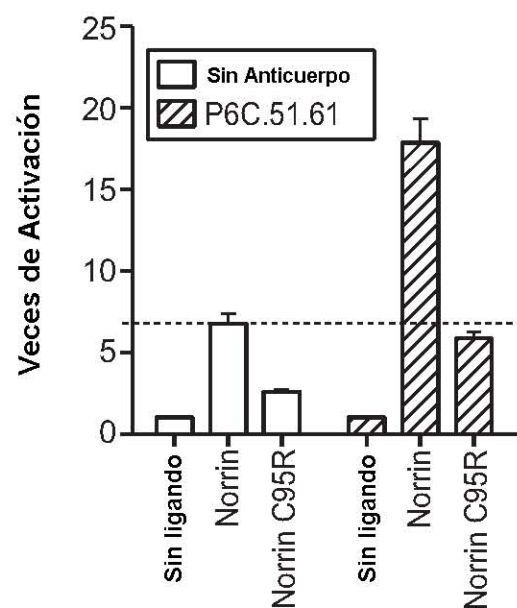


FIG. 9B

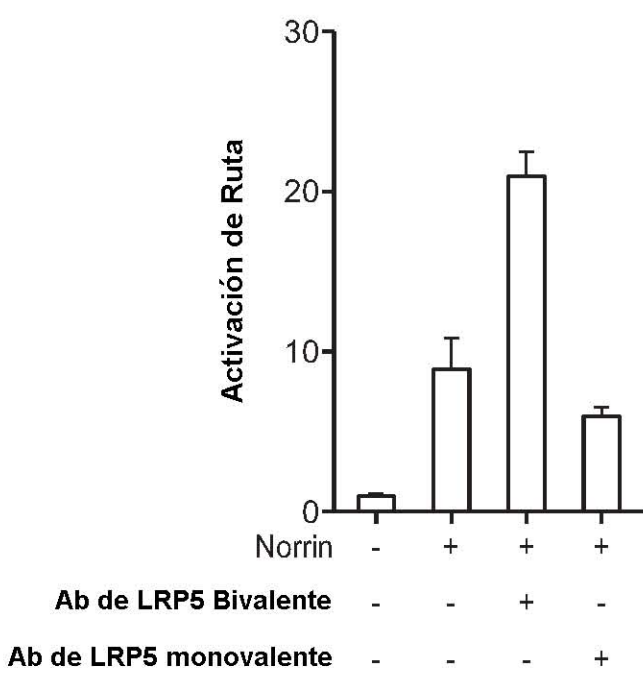


FIG. 10A

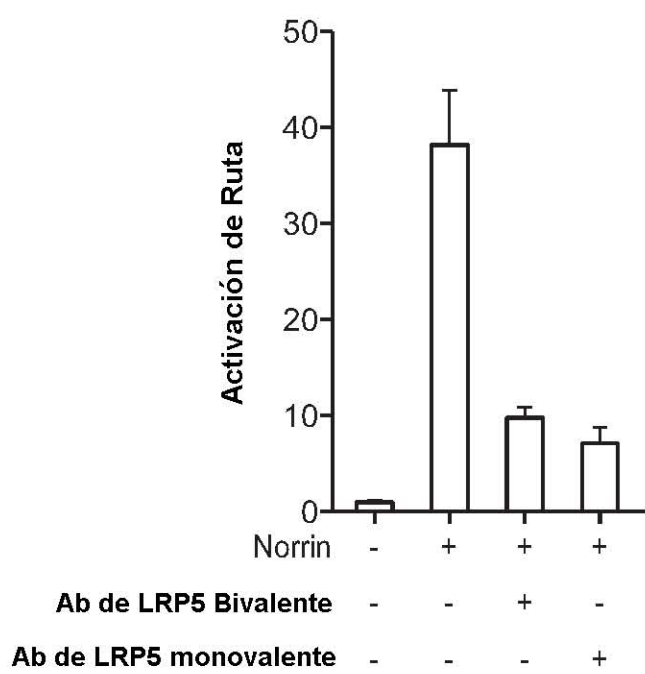


FIG. 10B

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A
GENENTECH, INC., firmado por los cedentes y el cesionario.

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES ESTADOS UNIDOS
Bajo el Secretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Marcas y Patentes
de los Estados Unidos

Enero 8, 2013

PTAS

GRANT KALINOWSKI
1 DNA Way
MS-49
South San Francisco, CA 94080

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos
Notificación de Registro de Documento de Cesión

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos. Una copia microfilmada completa se encuentra disponible en la Sala de Búsquedas de Cesiones en el rollo y cuadro cuyo nombre de referencia aparece más adelante.

Por favor revise toda la información que contiene esta notificación. La información contenida refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Marcas y Patentes. Si encuentra errores o tiene preguntas con respecto a este documento, puede contactar al funcionario cuyo nombre aparece en esta notificación, marcando el 571-272-3350. Las solicitudes de corrección se pueden enviar a: U.S. Patent and Trademark Office, Mail Stop: Assignment Services Branch, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313.

Fecha de Registro: 07/01/2013

Rollo/Cuadro: 029577/0130
Número de páginas: 5

Resumen: Cesión de interés del cedente (véase documento para detalles)
Número de Expediente de Abogado: PR4855

Cedente:
Ye, Weilan

Fecha Del Documento: 01/03/2013

Cedente:
Burton, Jeremy Bryant

Fecha Del Documento: 01/03/2013

Cedente:
Chiu, Cecilia

Fecha Del Documento: 01/04/2013

Cesionario:
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
MS-49
South San Francisco, CA 94080

Número de solicitud: 61588100
Número de patente:

Fecha de presentación: 01/18/2012
Fecha de expedición:

Título: ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO

SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESIONES
DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de ejecución
Weilan Ye	01/03/2013
Jeremy Bryant Burton	01/03/2013
Cecilia Chiu	01/04/2013

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección interna:	MS-49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080

NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	61588100

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (650) 952 9881

La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Teléfono: 650 467 2607

Correo electrónico: pggolden@gene.com

Nombre del destinatario: Grant Kalinowski

Dirección Línea 1: 1 DNA Way

Dirección Línea 2: MS-49

Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	PR4855
NOMBRE DEL REMITENTE:	Grant Kalinowski

Total adjuntos: 4

Fuente: Assignment l#page1.tif

Fuente: Assignment l#page2.tif

Fuente: Assignment l#page3.tif

Fuente: Assignment l#page4.tif

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Weilan Ye y Jeremy Bryant Burton** (cada uno "CEDENTE), han inventado una invención útil y nueva en

ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO

para la cual se presentó una solicitud con Serial No. 61/588,100 (Expediente de abogado No. PR4855) el 18 de enero de 2012 para Título de Patentes; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Los CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

(firma)

Fecha: 01/03/2013

Weilan Ye

Dirección de correspondencia:

1 DNA Way

South San Francisco, CA 940801

Ciudadanía: US

(firma)

Fecha: 01/03/2013

Jeremy Bryant Burton

Dirección de correspondencia:

1 DNA Way

South San Francisco, CA 940801

Ciudadanía: US

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Weilan Ye, Yan Yu, Jeremy Bryant Burton y Cecilia Chiu** (cada uno "CEDENTE), han inventado una invención útil y nueva en

ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO

para la cual se presentó una solicitud con Serial No. 61/588,100 (Expediente de abogado No. PR4855) el 18 de enero de 2012 para Título de Patentes; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Los CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

Weilan Ye
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 940801
Ciudadanía: US

Fecha:

Yan Wu
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 940801
Ciudadanía: US

Fecha:

Jeremy Bryant Burton
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 940801
Ciudadanía: US

Fecha:

(firma)
Cecilia Chiu
Dirección de correspondencia:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 940801
Ciudadanía: CA

Fecha: 01/04/2013

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A
GENENTECH, INC., firmado por los cedentes y el cesionario.

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES ESTADOS UNIDOS
Bajo el Secretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Marcas y Patentes
de los Estados Unidos

Enero 11, 2013

PTAS

GRANT KALINOWSKI
1 DNA Way
MS-49
South San Francisco, CA 94080

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos
Notificación de Registro de Documento de Cesión

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos. Una copia microfilmada completa se encuentra disponible en la Sala de Búsquedas de Cesiones en el rollo y cuadro cuyo nombre de referencia aparece más adelante.

Por favor revise toda la información que contiene esta notificación. La información contenida refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Marcas y Patentes. Si encuentra errores o tiene preguntas con respecto a este documento, puede contactar al funcionario cuyo nombre aparece en esta notificación, marcando el 571-272-3350. Las solicitudes de corrección se pueden enviar a: U.S. Patent and Trademark Office, Mail Stop: Assignment Services Branch, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313.

Fecha de Registro: 01/10/2013

Rollo/Cuadro: 029603/0368
Número de páginas: 3

Resumen: Cesión de interés del cedente (véase documento para detalles)
Número de Expediente de Abogado: PR4855

Cedente:
Wu, Yan

Fecha Del Documento: 01/09/2013

Cesionario:
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
MS-49
South San Francisco, CA 94080

Número de solicitud: 61588100
Número de patente:

Fecha de presentación: 01/18/2012
Fecha de expedición:

Título: ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO

SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESIONES
DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

CESIÓN DE PATENTE	
Versión electrónica v1.1	
Versión de la hoja v1.1	
TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN
DATOS DE LA PARTE CEDENTE	
Nombre	Fecha de ejecución
Yan Wu	01/09/2013
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección interna:	MS-49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080
NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	61588100
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número de Fax: (650) 952 9881	
La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.	
Teléfono: 650 467 2607	
Correo electrónico: pgolden@gene.com	
Nombre del destinatario: Grant Kalinowski	
Dirección Línea 1: 1 DNA Way	
Dirección Línea 2: MS-49	
Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080	
NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	PR4855
NOMBRE DEL REMITENTE:	Grant Kalinowski
Total adjuntos: 2	
Fuente: Wu_Assignment#page1.tif	
Fuente: Wu_Assignment#page2.tif	

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Yan Wu** (un“CEDENTE), ha inventado una invención útil y nueva en

ANTICUERPOS ANTI-LRP5 Y MÉTODOS DE USO

para la cual se presentó una solicitud con Serial No. 61/588,100 (Expediente de abogado No. PR4855) el 18 de enero de 2012 para Título de Patentes; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Los CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

(firma)

Fecha: 01/09/2013

Yan Wu

Dirección de correspondencia:

1 DNA Way

South San Francisco, CA 940801

Ciudadanía: US