



(12) Oversettelse av
europeisk patentskrift

(11) NO/EP 2203478 B1

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/663 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.04.14
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.11.20
(86)	Europeisk søknadsnr	08838428.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.10.10
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.07.07
(30)	Prioritet	2007.10.12, EP, 07118414 2008.02.25, EP, 08151911 2008.07.29, EP, 08161342
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA RS
(73)	Innehaver	Novartis AG, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Sveits
(72)	Oppfinner	KNEISSEL, Michaela, Breisacherstrasse 35, CH-4057 Basel, Sveits HALLEUX, Christine, Saffretweg 3d, CH-4143 Dornach, Sveits HU, Shou-lh, 171 The Fellsway, New ProvidenceNew Jersey 07974, USA DIEFENBACH-STREIBER, Beate, Reiherweg 6, 86949 Windach, Tyskland PRASSLER, Josef, Kriegerstrasse 8a, 82110 Germering, Tyskland
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	SAMMENSETNINGER OG FREMGANGSMÅTER FOR ANVENDELSE AV ANTISTOFFER MOT SKLEROSTIN
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2006/119062 B1 H.Z. KE ET AL: "BONE ANABOLISM ACHEIVED BY REDUCING SCLEROSTIN BIOAVAILABILITY WITH AN ANTI-sclerostin antibody" 36TH INTERNATIONAL SUN VALLEY WORKSHOP ON SKELETAL TISSUE BIOLOGY, 30 July 2006 (2006-07-30), page 02.08.2006, XP002469781 HOLDSWORTH GILL ET AL: "Characterization of the interaction of sclerostin with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) family of Wnt co-receptors.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 3 AUG 2012, vol. 287, no. 32, 3 August 2012 (2012-08-03), pages 26464-26477, ISSN: 1083-351X I. KYOJI: "Physiological function of osteocytes" CLINICAL CALCIUM, vol. 17, no. 10, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 1554-1558, XP008088787 LEWIECKI E MICHAEL: "Sclerostin monoclonal antibody therapy with AMG 785: a potential treatment for osteoporosis", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, INFORMA HEALTHCARE, UK, vol. 11, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 117-127, XP009160541, ISSN: 1744-7682, DOI: 10.1517/14712598.2011.540565 LINTERN KATHERINE B ET AL: "Characterization of Wise Protein and Its Molecular Mechanism to Interact with both Wnt and BMP Signals", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 34, August 2009

(2009-08), pages 23159-23168, ISSN: 0021-9258

OMINSKY M S ET AL: "SCLEROSTIN MONOCLONAL ANTIBODY TREATMENT INCREASES BONE STRENGTH IN AGED OSTEOPENIC OVARECTOMIZED RATS" JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 1, 18 September 2006 (2006-09-18), page S44PRES1161, XP008078247 ISSN: 0884-0431

VAN BEZOOIJEN R L ET AL: "BONE MORPHOGENETIC PROTEINS AND THEIR ANTAGONISTS: THE SCLEROSTIN PARADIGM" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION, KURTIS, MILAN, IT, vol. 28, no. 8, 2005, pages 15-17, XP008078167 ISSN: 0391-4097

VEVERKA VACLAV ET AL: "Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 284, no. 16, 17 April 2009 (2009-04-17), pages 10890-10900, XP002594504, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M807994200 [retrieved on 2009-02-10]

WARMINGTON K ET AL: "SCLEROSTIN ANTAGONISM IN ADULT RODENTS, VIA MONOCLONAL ANTIBODY MEDIATED BLOCKADE, INCREASES BONE MINERAL DENSITY AND IMPLICATES SCLEROSTIN AS A KEY REGULATOR OF BONE MASS DURING ADULTHOOD" JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 19, 5 October 2004 (2004-10-05), pages S56-S57, ABSTRA, XP009072609 ISSN: 0884-0431

WARMINGTON K ET AL: "SCLEROSTIN MONOCLONAL ANTIBODY TREATMENT OF OSTEOPOROTIC RATS COMPLETELY REVERSES ONE YEAR OF OVARECTOMY-INDUCED SYSTEMIC BONE LOSS" JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 20, no. 9, 25 September 2005 (2005-09-25), pages S22-PRES1082, XP008078248 ISSN: 0884-0431

SAMMENSETNINGER OG FREMGANGSMÅTER FOR ANVENDELSE AV ANTISTOFFER MOT SKLEROSTIN

Teknisk område

5 Den foreliggende oppfinnelsen vedrører antistoffer mot sklerostin og sammensetninger og fremgangsmåter for anvendelse av antistoffene for å behandle en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin eller sykdom knyttet til benabnormaliteter slik som osteoporose.

Oppfinnelsens bakgrunn

15 SOST-genet koder for proteinet sklerostin, som er et utskilt glykoprotein med 213 aminosyrer. Sklerostin er et medlem av superfamilien av cystinknuteholdige faktorer. Sklerostin er knyttet til DAN/Cerberus-proteinfamilien, som direkte forstyrrer BMP-signaleringskaskaden (Avsian-Kretchmer, Mol Endocrinol 2004, 18(1):1-12).

20 Sklerostin-mRNA-ekspresjon detekteres hos voksne mennesker hovedsakelig i ben og nyre. Sklerostinprotein er detekterbart hovedsakelig i ben. I ben er dets ekspresjon begrenset til de modne og terminalt differensierte bendannende cellene, osteocytene.

25 Sklerostin er en sterk negativ regulator av bendannelse hos mennesker og mus. Mangel på SOST-ekspresjon gir opphav til sklerosteose (Balemans et al. Hum Mol Genet., 2001, 10(5):537-43; Brunkow et al. Am J Hum Genet, 2001, 68(3):577-89). Pasienter lider av livslang benovervekst, hvilket resulterer i økt benmineraldensitet og -styrke. De viser ingen andre endokrinologiske abnormaliteter – alle komplikasjonene de opplever i løpet av livet, er knyttet til den abnormale akkumuleringen av ben. Heterozygotiske bærere for denne recessive lidelsen viser også økt benmasse (Gardner et al. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(12):6392-5). Denne fenotypen kan rekapituleres hos mus som mangler SOST, og dens overekspresjon resulterer i osteopeni. Van Buchems sykdom [MIM 239100] – en fenotypisk kopi av sklerosteose – skyldes videre
35 SOST-misregulering på grunn av den genomiske delesjonen av en

langdistansebenenhancer (Balemans et al. J Med Gene, 2002, 39(2):91–7; Loots et al., Genome Res, 2005, 15(7):928–35). SOST nedreguleres til slutt ved paratyroidhormon – et klinisk validert bendannelsesprinsipp – under bendannelse, som antyder at deler av den anabole virkningen av PTH kan være mediert via SOST (Keller and Kneissel Bone, 2005, 37(2):148–58).

Sklerostin binder BMP-er (benmorfogene proteiner) og kan fungere som en BMP-antagonist *in vitro* (Winkler et al. EMBO J., 2003, 22(23):6267–76). Sklerostin virker også som en negativ regulator av kanonisk Wnt-signalerings, enten direkte ved binding til LRP5/LRP6 (Li et al. J Biol Chem., 2005, 280(20); Semenov, J Biol Chem. 19. oktober 2006; van Bezooijen et al. J Bone Miner Res, 2006, 21(10. oktober), eller indirekte (Winkler et al. J Biol Chem., 2005, 280(4):2498–502).

Mangel på sklerostinekspresjon resulterer i høy bendannelse, mens benresorpsjon er uforstyrret (Sklerosteose, Van Buchem sykdom) (Balemans et al. 2001; Brunkow et al. Am J Hum Genet, 2001, 68(3):577–89, Balemans et al. 2006; Loots et al., Genome Res, 2005, 15(7):928–35).

Få av de aktuelt tilgjengelige behandlingene for skjelettlidelser kan øke bendensiteten hos voksne, og flesteparten av de aktuelt tilgjengelige behandlingene virker primært ved inhibering av ytterligere benresorpsjon i stedet for å stimulere ny bendannelse.

Ett eksempel på et medikament som anvendes for behandling av bentap, er østrogen. Det er imidlertid ikke klart hvorvidt østrogen har gunstige langtidseffekter. Østrogen kan videre bære risikoen for å øke prevalensen av forskjellige tumortyper, slik som bryst- og endometrialcancer. Andre nåværende terapeutiske tilnærminger for osteoporose inkluderer bisfosfonater (f.eks. FosamaxTM, ActonelTM, BonvivaTM, ZometaTM, olpadronat, neridronat, skelid, bonefos), paratyroidhormon, kalsilytika, kalsimimetika (f.eks. cinacalcet), statiner, anabole steroider, lantanum- og strontiumsalter og natriumfluorid. Slik terapeutikk er imidlertid ofte assosiert med uønskede bivirkninger.

Kort beskrivelse av oppfinnelsen

Oppfinnelsen tilveiebringer et antistoff mot sklerostin omfattende en polypeptidsekvens i tungkjedens variable region omfattende SEQ ID NO: 70 og en polypeptidsekvens i lettkjedens variable region omfattende SEQ ID NO: 81.

5 En utførelsesform beskrevet heri tilveiebringer et antistoff eller et funksjonelt protein omfattende en antigenbindende porsjon av antistoffet for et mål i sklerostinpolypeptid (SEQ ID NO:155), karakterisert ved at antistoffet eller det funksjonelle proteinet spesifikt binder til sklerostinpolypeptid og kan øke minst én parameter av bendannelse, benmineraldensitet, benmineralinnhold, 10 benmasse, benkvalitet og benstyrke hos et pattedyr.

I én utførelsesform kan de beskrevne antistoffene reversere sklerostininhibering av benmineralisering *in vitro*. I en relatert utførelsesform kan de reversere sklerostininhibering av den wnt-1-medierte signaleringsreaksjonsveien. I en 15 annen relatert utførelsesform avbryter de sklerostin LRP6-binding og kan blokkere den inhiberende effekten som sklerostin har ved høye doser på BMP-indusert Smad1-fosorylering. I en annen utførelsesform binder de beskrevne antistoffene til en region av sklerostin mellom aminosyrene 112 og 126 (dvs. regionen består av aminosyrene 112 til 126 med SEQ ID NO:155) med SEQ ID 20 NO:155 og/eller regionen mellom aminosyrene 160–174 (dvs. regionen består av aminosyrene 160 til 174 med SEQ ID NO:155) med SEQ ID NO:155, og binder nærmere bestemt til en region omfattende både ARLLPNAIGRGKWWRR (SEQ ID NO 156) og RLVASCKCKRLTRFH (SEQ ID NO 157).

25 Sklerostin inhiberer wnt1-mediert aktivering av STF (Supertopftash, reporteravlesning for kanonisk wnt-signalerings) i HEK293-celler. I noen utførelsesformer gjenoppretter de beskrevne antistoffene wnt-signaleringsreporteravlesningen på en svært reproducerbar måte.

30 Den observerte inhiberende effekten av de beskrevne antistoffene på sklerostinvirkning i Wnt-signaleringsreporterassayet i ikke-osteoblastceller er funnet å translatere til induksjon av bendannelsesresponser på grunn av sklerostininhibering *in vivo*. *In vivo*-forsøk på eldre gnagere viser da også at antistoffene ifølge oppfinnelsen fremmer sterk benanabolisme. 35 Benmasseøkningen nådde effektnivået for daglig intermitterende behandling med ekstremt høye anabole doser av paratyroidhormon (som ble anvendt som positiv kontroll).

Ifølge en annen foretrukket utførelsesform har derfor de beskrevne antistoffene affinitet for sklerostin i det lave pM-området og inhiberer sklerostininnflytelse på wnt-signalerings med en IC_{50} på ca. 10 nM.

5

I en annen foretrukket utførelsesform binder de beskrevne antistoffene mer fortrukket til en region av sklerostin omfattet henholdsvis mellom aminosyrene 112 og 126 (dvs. regionen består av aminosyrene 112 til 126 med SEQ ID NO:155) og mellom aminosyrene 160 og 174 (dvs. regionen består av aminosyrene 160 til 174 med SEQ ID NO:155) med SEQ ID NO:155, og nærmere bestemt en region som overlapper minst følgende peptider ARLLPNAIGRGKWWWR (SEQ ID NO: 156) og RLVASCKCKRLTRFH (SEQ ID NO:157), og har affinitet for sklerostin i det lave pM-området og inhiberer sklerostininnflytelse på wnt-signalerings med en IC_{50} på ca. 10 nM. Slike antistoffer har kapasitet til å øke benmassen i det aksiale og appendikulære skjelettet i en dyremodell for mus ved effektnivået for daglig subkutan behandling med en ekstremt høy anabol dose av paratyroidhormon (positiv kontroll) og er derfor nyttige i behandlingen av sykdom knyttet til benabnormaliteter slik som osteoporose.

10

15

20

Ytterligere utførelsesformer inkluderer sammensetninger omfattende antistoffene ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med alternative behandlinger for behandling av osteoporose, slik som bisfosfonater, paratyroidhormon, paratyroidhormonfrisettende middel (kalsilytika), LRP4-nøytraliserende antistoffer og DKK-1-nøytraliserende antistoffer.

25

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1: Effekt av MOR05813_IgG2Iambda i wnt-1-assayet

30

Figur 2: MOR05813_IgG2Iambda i BMP-2-indusert mineralisering i MC3T3-1b-celler

Figur 3: Effekt av MOR05813_IgG2Iambda i LRP6-SOST-ELISA

Figur 4: Effekt av MOR05813_IgG2Iambda i Phospho-Smad1-assayet

Figur 5: A – Effekt av LRP4-knockdown (siRNA) på SOST-inhiberende virkning i wnt-1-assayet i Hek293-celler (svarte tall: i forhold til STF-aktivitet i fravær av

35

SOST, **halvfete svarte tall:** STF-aktivitetsforhold i nærvær/fravær av SOST); B-spesifisitet for effekten av LRP4-overekspresjon på SOST IC₅₀ og Dkk1 IC₅₀ i wnt-1-assayet i Hek293-celler; C-spesifisitet for effekten av LRP4-overekspresjon på SOST- og Dkk1-inhiberende virkning i wnt-1-assayet i C28a2-celler; D--spesifisitet for effekten av LRP4-knockdown (siRNA) på SOST- og Dkk1-inhiberende virkning i wnt-1-assayet i Hek293-celler; E-modulering av aktiviteten av MOR05813 av LRP4

Figur 6: Studie på mus, *in vivo* pQCT – 2, 5 ukers behandling med MOR05813 øker det totale benmineralinnholdet i den proksimale tibiametafysen

Figur 7: Studie på mus, *in vivo* pQCT – 2, 5 ukers behandling med MOR05813 øker den totale benmineraldensiteten i den proksimale tibiametafysen

Figur 8: Studie på mus, *in vivo* pQCT – 2, 5 ukers behandling med MOR05813 øker den kortikale tykkelsen i den proksimale tibiametafysen

Figur 9: Studie på mus, *in vivo* uQCT – 2, 5 ukers behandling med MOR05813 øker det spongiøse benvolumet i den proksimale tibiametafysen

Figur 10: Studie på mus, *in vivo* uQCT – 2, 5 ukers behandling med MOR05813 øker den trabekulære tykkelsen i den proksimale tibiametafysen

Figur 11: Studie på mus, *in vivo* pQCT – 5 ukers behandling med MOR05813 øker den totale benmineraldensiteten ytterligere i den proksimale tibiametafysen

Figur 12: Studie på mus, *ex vivo* DEXA – 5 ukers behandling med MOR05813 øker benmineraldensiteten ytterligere i tibia

Figur 13: Studie på mus, *ex vivo* DEXA – 5 ukers behandling med MOR05813 øker benmineraldensiteten ytterligere i femur

Figur 14: Studie på mus, *ex vivo* DEXA – 5 ukers behandling med MOR05813 øker benmineraldensiteten ytterligere i ryggraden

Figur 15: Studie på mus, *ex vivo* histomorfometri – 2,5 ukers behandling med MOR05813 øker bendannelsesratene i det appendikulære skjelettet (distal femurmetafyse)

Figur 16: Studie på mus, *ex vivo* histomorfometri – 2,5 ukers behandling med MOR05813 øker mineralapposisjonsraten i det appendikulære skjelettet (distal femurmetafyse)

Figur 17: Studie på mus, *ex vivo* histomorfometri – 2,5 ukers behandling med MOR05813 øker mineraliseringsoverflaten i det appendikulære skjelettet (distal femurmetafyse)

Figur 18: Studie på mus, *ex vivo* histomorfometri – 2,5 ukers behandling med MOR05813 øker bendannelsesratene i det aksiale skjelettet (lengdevirvel)

Figur 19: Studie på mus, *ex vivo* histomorfometri – 2,5 ukers behandling med MOR05813 påvirker ikke benresorpsjonen i det appendikulære skjelettet (distal femurmetafyse), som målt ved osteoklastisk overflate

Figur 20: ELISA som viser effekt av MOR05813_IgG2Iambda på SOST-binding av LRP6. 0,9 nM SOST ble anvendt i hvert tilfelle

Figur 21: Studie på mus, *in vivo* pQCT etter parallell behandling med MOR05813 og zoledronsyre, (A) total benmineraldensitet, (B) totalt benmineralinnhold, (C) kortikal tykkelse og (D) spongiøs benmineraldensitet

Figur 22: Studie på mus, *in vivo* pQCT: Behandling med MOR05813 etter forbehandling med alendronat (alen), (A) total benmineraldensitet, (B) totalt benmineralinnhold, (C) kortikal tykkelse og (D) spongiøs benmineraldensitet

Figur 23: Studie på mus, *in vivo* pQCT etter anabolsk parallell behandling med MOR05813 og (i) anti-DKK1 eller (ii) PTH, (A) total benmineraldensitet, (B) totalt benmineralinnhold, (C) kortikal tykkelse og (D) spongiøs benmineraldensitet

Detaljert beskrivelse

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører isolerte antistoffer, særlig humane antistoffer, som binder spesifikt til sklerostin, og som inhiberer funksjonelle egenskaper ved sklerostin. I visse utførelsesformer er de beskrevne antistoffene avledet fra særlige tung- og lett kjedesequenser og/eller omfatter særlige strukturelle trekk slik som CDR-regioner omfattende særlige aminosyresequenser. Oppfinnelsen tilveiebringer et antistoff mot sklerostin omfattende en polypeptidsequens i tungkjedens variable region omfattende SEQ ID NO: 70 og en polypeptidsequens i lett kjedens variable region omfattende SEQ ID NO: 81. Det beskrives også isolerte antistoffer, fremgangsmåter for fremstilling av slike antistoffer, immunkonjugater og multivalente eller multispesifikke molekyler omfattende slike antistoffer og farmasøytiske sammensetninger inneholdende antistoffene, immunkonjugatene eller de bispesifikke molekylerne ifølge oppfinnelsen. Oppfinnelsen vedrører også fremgangsmåter for anvendelse av antistoffene for å inhibere en lidelse eller tilstand assosiert med nærværet av sklerostinekspressjon, f.eks. i behandlingen

av en patologisk lidelse som medieres av sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin; f.eks. en benrelatert sykdom slik som osteoporose.

5 For å lette forståelsen av den foreliggende oppfinnelsen defineres først visse betegnelser. Ytterligere definisjoner gis gjennom hele den detaljerte beskrivelsen.

10 Betegnelsen "omfattende" omfatter "inkludert" samt "bestående", f.eks. en sammensetning "omfattende" X kan bestå utelukkende av X eller kan inkludere noe i tillegg f.eks. X + Y.

Betegnelsen "ca." i forbindelse med en tallverdi x betyr for eksempel $x \pm 10\%$.

15 Betegnelsen "i det vesentlige" ekskluderer ikke "fullstendig", f.eks. en sammensetning som er "i det vesentlige fri" for Y, kan være fullstendig fri for Y. Hvis det er nødvendig, kan betegnelsen "i det vesentlige" utelates fra definisjonen ifølge oppfinnelsen.

20 Betegnelsen "immunrespons" betyr påvirkning av for eksempel lymfocytter, antigenpresenterende celler, fagocytiske celler, granulocytter og løselige makromolekyler produsert av ovenstående celler eller leveren (inkludert antistoffer, cytokiner og komplement) som resulterer i selektiv skade på, destruksjon av eller eliminering fra menneskekroppen av invaderende
25 patogener, celler eller vev infisert med patogener, cancerfremkallende celler, eller, ved autoimmunitet eller patologisk inflammasjon, normale humane celler eller vev.

30 Betegnelsen sklerostin betyr humant sklerostin som definert i SEQ ID NO: 155. Rekombinant humant sklerostin kan skaffes fra R&D Systems (Minneapolis, MN, USA; 2006 kat.nr. 1406-ST-025). Rekombinant murint sklerostin / SOST er kommersielt tilgjengelig fra R&D Systems (Minneapolis, MN, USA; 2006 kat.nr. 1589-ST-025). US-patentnr. 6,395,511 og 6,803,453, og US-patentpublikasjon 20040009535 og 20050106683 vedrører antistoffer mot sklerostin generelt.

35 Betegnelsen "antistoff" inkluderer som anvendt heri hele antistoffer og hvilket som helst antigenbindende fragment (dvs. "antigenbindende porsjon") eller enkeltkjeder derav. Et naturlig forekommende "antistoff" er et glykoprotein

omfattende minst to tunge (H) kjeder og to lette (L) kjeder sammenbundet av disulfidbindinger. Hver tungkjede består av en variabel region i tungkjeden (forkortet heri som VH) og en konstant region i tungkjeden. Tungkjedens konstante region består av tre domener, CH1, CH2 og CH3. Hver lettkjede består av en variabel region i lettkjeden (forkortet heri som VL) og en konstant region i lettkjeden. Lettkjedens konstante region består av ett domene, CL. VH- og VL-regionene kan videre oppdeles i hypervariabilitetsregioner, kalt komplementaritetsbestemmende regioner (CDR), ispedd regioner som er mer konservert, kalt strukturregioner (FR). Hver VH og VL er omfattet av tre CDR-er og fire FR-er, ordnet fra amino-terminal til karboksy-terminal i følgende rekkefølge: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Tung- og lettkjedenes variable regioner inneholder et bindingsdomene som interagerer med et antigen. Antistoffenes konstante regioner kan mediere bindingen av immunglobulinet til vevsvev eller -faktorer, inkludert forskjellige immunsystemceller (f.eks. effektorceller) og den første komponenten (C1q) i det klassiske komplementsystemet.

Betegnelsen "antigenbindende porsjon" av et antistoff (eller bare "antigenporsjon") betyr som anvendt heri hele lengden eller én eller flere fragmenter av et antistoff som bevarer evnen til spesifikt å binde til et antigen (f.eks. sklerostin). Det er vist at et antistoffs antigenbindende funksjon kan utføres av fragmenter av et antistoff av full lengde. Eksempel på bindingsfragmenter omfattet av betegnelsen "antigenbindende porsjon" av et antistoff inkluderer et Fab-fragment, et monovalent fragment bestående av domenene V_L , V_H , C_L CH1; et $F(ab)_2$ -fragment, et bivalent fragment omfattende to Fab-fragmenter bundet av en disulfidbro ved hengselregionen; et Fd-fragment bestående av domenene V_H og CH1; et Fv-fragment bestående av domenene V_L og V_H med en enkelt arm av et antistoff; et dAb-fragment (Ward et al., 1989 Nature 341:544–546), som består av et VH-domene; og en isolert komplementaritetsbestemmende region (CDR).

Selv om de to domenene av Fv-fragmentet, V_L og V_H , er kodet av separate gener, kan de videre bindes ved anvendelse av rekombinante fremgangsmåter ved en syntetisk binding som gjør det mulig å fremstille dem som en enkelt proteinkjede i hvilken V_L - og V_H -regionene parer seg for å danne monovalente molekyler (kjent som enkeltkjedet Fv (scFv); se for eksempel Bird et al., 1988 Science 242:423–426; og Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879–

5883). Slike enkeltkjedede antistoffer er også ment å være omfattet av betegnelsen "antigenbindende region" av et antistoff. Disse antistofffragmentene oppnås ved anvendelse av konvensjonelle teknikker som er kjent for fagmannen, og fragmentene screenes for å være nyttige på samme måte som intakte antistoffer.

Et "isolert antistoff" betyr som anvendt heri et antistoff som er i det vesentlige fritt for andre antistoffer som har en annen antigenspesifisitet (f.eks. et isolert antistoff som spesifikt binder sklerostin, er i det vesentlige fritt for antistoffer som spesifikt binder andre antigener enn sklerostin). Et isolert antistoff som spesifikt binder sklerostin, kan imidlertid ha kryssreaktivitet overfor andre antigener, slik som sklerostinmolekyler fra andre arter. Et isolert antistoff kan videre være i det vesentlige fritt for annet cellulært materiale og/eller andre kjemikalier.

Betegnelsene "monoklonalt antistoff" eller "monoklonal antistoffsammensetning" betyr som anvendt heri en fremstilling av antistoffmolekyler av enkel molekyllær sammensetning. En monoklonal antistoffsammensetning viser en enkelt bindingsspesifisitet og affinitet for en særlig epitop.

Betegnelsen "humant antistoff" er som anvendt heri ment å inkludere antistoffer som har variable regioner i hvilke både struktur- og CDR-regionene er avledet fra sekvenser av human opprinnelse. Hvis antistoffet inneholder en konstant region, er den konstante regionen videre også avledet fra slike humane sekvenser, f.eks. humane kjønncellesekvenser, eller muterte versjoner av humane kjønncellesekvenser eller antistoffholdige konsensusstrukturekvenser avledet fra human strukturekvenseranalyse som beskrevet i Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296,57-86).

De beskrevne humane antistoffene kan inkludere aminosyrerester som ikke kodes av humane sekvenser (f.eks. mutasjoner introdusert ved tilfeldig eller stedsspesifikk mutagenese *in vitro* eller ved somatisk mutasjon *in vivo*). Betegnelsen "humant antistoff" er som anvendt heri imidlertid ikke ment å inkludere antistoffer i hvilke CDR-sekvenser avledet fra kjønncellen fra en annen mammalsk art, slik som en mus, er podet på humane strukturekvenser.

Betegnelsen "humant monoklonalt antistoff" betyr antistoffer som viser en enkelt bindingsspesifisitet, og som har variable regioner i hvilke både struktur- og CDR-regionene er avledet fra humane sekvenser. I én utførelsesform produseres de humane monoklonale antistoffene av et hybridom som inkluderer en B-celle oppnådd fra et transgent ikke-humant dyr, f.eks. en transgen mus, som har et genom omfattende et humant tungkjedetransgen og et lettkjedetransgen fusjonert til en immortalisert celle.

Betegnelsen "rekombinant humant antistoff" inkluderer som anvendt heri alle humane antistoffer som fremstilles, uttrykkes, dannes eller isoleres ved rekombinante middel, slik som antistoffer isolert fra et dyr (f.eks. en mus) som er transgene eller transkromosomale for humane immunglobulingener eller et hydrom fremstilt derfra, antistoffer isolerte fra en vertscelle transformert for å uttrykke det humane antistoffet, f.eks. fra et transfektom, antistoffer isolert fra et rekombinant, kombinatorialt humant antistoffbibliotek og antistoffer fremstilt, uttrykt, dannet eller isolert ved hvilke som helst andre middel som involverer spleising av alle, eller en porsjon av et humant immunglobulingen, sekvenser til andre DNA-sekvenser. Slike rekombinante humane antistoffer har variable regioner i hvilke struktur- og CDR-regionene er avledet fra humane kjønnselleimmunglobulinsekvenser. I visse utførelsesformer kan imidlertid slike rekombinante humane antistoffer utsettes for *in vitro*-mutagenese (eller når det anvendes et dyr som er transgent for humane Ig-sekvenser, *in vivo*-somatisk metagenese), og aminosyresekvensene i V_H- og V_L-regionene i de rekombinante antistoffene er således sekvenser som selv om de er avledet fra og relatert til humane V_H- og V_L-kjønnsellesekvenser, ikke nødvendigvis finnes naturlig i det humane antistoffets kjønnsellerepertoar *in vivo*.

"Isotype" betyr som anvendt heri antistoffklassen (f.eks. IgM, IgE, IgG slik som IgG1 eller IgG2) som tilveiebringes ved genene i tungkjedens konstante region.

Betegnelsene "et antistoff som gjenkjenner et antigen" og "et antistoff som er spesifikt for et antigen" anvendes om hverandre heri med betegnelsen "et antistoff som binder spesifikt til et antigen".

Et antistoff som "spesifikt binder til sklerostinpolypeptid", er som anvendt heri ment å bety et antistoff som binder til sklerostinpolypeptid med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre, 1×10^{-9} M eller mindre, eller 1×10^{-10} M eller mindre. Et

antistoff som "kryssreagerer med et annet antigen enn sklerostin", er ment å bety et antistoff som binder det antigenet med en K_D på $0,5 \times 10^{-8}$ M eller mindre, 5×10^{-9} M eller mindre, eller 2×10^{-9} M eller mindre. Et antistoff som "ikke kryssreagerer med et særlig antigen", er ment å bety et antistoff som binder til det antigenet med en K_D på $1,5 \times 10^{-8}$ M eller mer, eller en K_D på mellom 5×10^{-8} M og 10×10^{-8} M, eller 1×10^{-7} M eller mer. I visse utførelsesformer viser slike antistoffer som ikke kryssreagerer med antigenet, i det vesentlige udetekterbar binding mot disse proteinene i standardbindingsassay.

Et antistoff som "blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert wnt-signaleringsassay", er som anvendt heri ment å bety et antistoff som gjenoppretter wnt-indusert signalering i nærvær av sklerostin i et cellebasert STF-assay med en IC_{50} under 1 mM, 100 nM, 20 nM, 10 nM eller mindre. Slike STF-assay er nærmere beskrevet i eksemplene nedenfor.

Et antistoff som "blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert mineraliseringsassay", er som anvendt heri ment å bety et antistoff som gjenoppretter BMP2-indusert mineralisering i nærvær av sklerostin i et cellebasert assay med en IC_{50} under 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM eller mindre. Et slikt assay er nærmere beskrevet i eksemplene nedenfor.

Et antistoff som "blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i Smad1-fosforyleringsassay", er som anvendt heri ment å bety et antistoff som gjenoppretter BMP6-indusert Smad1-fosforylering i nærvær av sklerostin i et cellebasert assay med en IC_{50} under 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM eller mindre. Et slikt assay er nærmere beskrevet i eksemplene nedenfor.

Et antistoff som "inhiberer binding av sklerostin til LRP-6", betyr som anvendt heri et antistoff som inhiberer sklerostinbinding til LRP-6 med en IC_{50} på 1 mM, 500 nM, 100 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 1 nM eller mindre. Et slikt assay er nærmere beskrevet i eksemplene nedenfor.

Et antistoff som "øker bendannelse og -masse og -densitet", betyr som anvendt heri et antistoff som er i stand til å nå bendannelse, -masse og -densitet på nivået for daglig intermitterende behandling med høy anabol dose av PTH som vist i eksempel 10.

Betegnelsen " K_{assoc} " eller " K_a " er som anvendt heri ment å bety assosiasjonsraten til en særlig antistoff-antigen-interaksjon, mens betegnelsen " K_{dis} " eller " K_D " som anvendt heri er ment å bety dissosiasjonsraten til en særlig antistoff-antigen-interaksjon. Betegnelsen " K_D " er som anvendt heri ment å bety dissosiasjonskonstanten, som oppnås fra forholdet mellom K_d og K_a (dvs. K_d/K_a) og uttrykkes som en molkonsentrasjon (M). K_D -verdier for antistoffer kan bestemmes ved anvendelse av fremgangsmåter som er veletablert i teknikken. En fremgangsmåte for bestemmelse av K_D for et antistoff er ved anvendelse av overflateplasmonresonans, eller ved anvendelse av et biosensorsystem slik som et Biacore[®]-system.

Betegnelsen "affinitet" betyr som anvendt heri interaksjonsstyrken mellom antistoff og antigen ved enkelte antigeniske steder. Innenfor hvert antigenisk sted interagerer den variable regionen i antistoffets "arm" gjennom svake ikke-kovalente krefter med antigen ved atskillige steder; jo flere interaksjoner det er, desto sterkere er affiniteten.

Betegnelsen "aviditet" betyr som anvendt heri en informativ måling av antistoff-antigen-kompleksets samlede stabilitet eller styrke. Den reguleres av tre viktige faktorer: antistoffepitopaffinitet; både antigenets og antistoffets valens; og det strukturelle arrangementet av de interagerende delene. Disse faktorene definerer til slutt antistoffets spesifisitet, dvs. sannsynligheten for at det særlige antistoffet binder til en presis antigenepitop.

For å oppnå en probe med høyere aviditet kan det konstrueres et dimerkonjugat, hvilket således gjør at interaksjoner med lav affinitet (slik som med kjønnselleantistoffet) enklere detekteres av FACS. Et annet middel for å øke antigenbindingens aviditet involverer i tillegg generering av dimerer, trimerer eller multimerer av hvilke som helst av konstruksjonene beskrevet heri av antistoffene mot sklerostin. Slike multimerer kan genereres gjennom kovalent binding mellom individuelle moduler, f.eks. ved å imitere den naturlige C-til-N-terminale bindingen eller ved å imitere antistoffdimerer som holdes sammen gjennom deres konstante regioner. Bindingene konstruert inn i Fc/Fc-grensesnittet kan være kovalente eller ikke-kovalente. Andre dimeriserings- eller multimeriseringspartnere enn Fc kan i tillegg anvendes i sklerostinhybrider for å danne slike strukturer av høyere orden. Det er for eksempel mulig å anvende

multimeriseringsdomener slik som trimeriseringsdomenet beskrevet i Borean (W02004039841) eller pentameriseringsdomenet beskrevet i den publiserte patentsøknaden WO98/18943.

5 Betegnelsen "kryssreaktivitet" betyr som anvendt heri et antistoff eller en populasjon av antistoffer som binder til epitoper på andre antigener. Dette kan være forårsaket enten av antistoffets lave aviditet eller spesifisitet eller av flere distinktive antigener som har identiske eller svært lignende epitoper. Kryssreaktivitet er av og til ønskelig når det ønskes generell binding til en
10 relatert gruppe av antigener eller ved forsøk på kryssmerking av arter når antigenepitopsekvensen ikke er svært konserverert i evolusjon.

Betegnelsen "høy affinitet" for et IgG-antistoff betyr som anvendt heri et antistoff som har en K_D på 10^{-8} M eller mindre, 10^{-9} M eller mindre, eller 10^{-10} M
15 eller mindre for et målantigen. Binding med "høy affinitet" kan imidlertid variere for andre antistoffisotyper. Binding med "høy affinitet" for en IgM-isotype betyr for eksempel et antistoff som har en K_D på 10^{-7} M eller mindre, eller 10^{-8} M eller mindre.

20 Betegnelsen "individ" inkluderer som anvendt heri hvilke som helst humane eller ikke-humane dyr. Betegnelsen "ikke-humane dyr" inkluderer alle virveldyr, f.eks. pattedyr og ikke-pattedyr, slik som ikke-humane primater, sauer, hunder, katter, hester, kyr, kyllinger, amfibier, reptiler osv.

25 Betegnelsen "optimalisert" betyr som anvendt heri at en nukleotidsekvens er endret for å kode for en aminosyresekvens ved anvendelse av kodoner som foretrukket er i produksjonscellen eller -organismen, generelt en eukaryotisk celle, f.eks. en celle av *Pichia* eller *Trichoderma*, en eggstokkcelle fra kinesisk hamster (CHO) eller en human celle. Den optimaliserte nukleotidsekvensen er
30 konstruert for å bevare hele eller så mye som mulig av aminosyresekvensen opprinnelig kodet av startnukleotidsekvensen, som også er kjent som "parental"-sekvensen. De optimaliserte sekvensene heri er konstruert for å ha kodoner som er foretrukket i pattedyrceller, men optimalisert ekspresjon av disse sekvensene i andre eukaryotiske celler er imidlertid også betraktet heri.
35 Aminosyresekvensene kodet av optimaliserte nukleotidsekvenser betegnes også optimaliserte.

Forskjellige aspekter ved oppfinnelsen er nærmere beskrevet i følgende underavsnitt.

5 Standardassay for å evaluere bindingsevnen til antistoffene mot sklerostin av forskjellig art er kjent i teknikken, inkludert for eksempel ELISA, Western blot og RIA. Egnede assay er nærmere beskrevet i eksemplene. Antistoffenes bindingskinetikk (f.eks. bindingsaffiniteten) kan også vurderes ved standardassay som er kjent i teknikken, slik som ved Biacore-analyse. Assay for å evaluere antistoffenes effekter på funksjonelle egenskaper ved sklerostin (f.eks. reseptorbinding, forebygging eller forbedring av osteolyse) er nærmere beskrevet i eksemplene.

15 Et antistoff som "inhiberer" én eller flere av disse funksjonelle sklerostinegenskapene (f.eks. biokjemiske, immunkjemiske, cellulære, fysiologiske eller andre biologiske aktiviteter eller lignende) som bestemt ifølge metoder som er kjent i teknikken og beskrevet heri, skal følgelig forstås å vedrøre en statistisk signifikant reduksjon i den særlige aktiviteten i forhold til den observert i fravær av antistoffet (eller når et kontrollantistoff av irrelevant spesifisitet er til stede). Et antistoff som inhiberer sklerostinaktivitet påvirker 20 sådan statistisk signifikant reduksjon med minst 10 % av den målte parameteren, med minst 50 %, 80 % eller 90 %, og i visse utførelsesformer kan et antistoff ifølge oppfinnelsen inhibere mer enn 95 %, 98 % eller 99% av funksjonell sklerostinaktivitet.

25 Betegnelsene "kryssblokkere", "kryssblokkert" og "kryssblokkering" anvendes om hverandre heri for å bety et antistoffs eller andre bindemiddels evne til å interferere med bindingen av andre antistoffer eller bindemiddel til sklerostin i et standard kompetitivt bindingsassay.

30 Den evne eller grad til hvilken et antistoff eller andre bindemiddel er i stand til å interferere med bindingen av et annet antistoff eller bindingsmolekyl til sklerostin, og derfor hvorvidt det kan sies å kryssblokkere ifølge beskrivelsen, kan bestemmes ved anvendelse av standard kompetitive bindingsassay. Ett egnet assay involverer anvendelsen av Biacore-teknologien (f.eks. ved 35 anvendelse av BIAcore 3000-instrumentet (Biacore, Uppsala, Sverige)), som kan måle omfanget av interaksjoner ved anvendelse av

overflateplasmonresonansteknologi. Et annet assay for måling av kryssblokkering anvender en ELISA-basert fremgangsmåte.

Ytterligere detaljer om begge fremgangsmåtene gis i eksemplene.

5

Ifølge beskrivelsen binder et kryssblokkeringsantistoff eller annet bindemiddel til sklerostin i det beskrevne BIAcore-kryssblokkeringsassayet slik at den registrerte bindingen av kombinasjonen (blandingen) av antistoffene eller bindemidlene er mellom 80 % og 0,1 % (f.eks. 80 % til 4 %) av den maksimale teoretiske bindingen, spesifikt mellom 75 % og 0,1 % (f.eks. 75 % til 4 %) av den maksimale teoretiske bindingen, og nærmere bestemt mellom 70 % og 0,1 % (f.eks. 70 % til 4 %), og nærmere bestemt mellom 65 % og 0,1 % (f.eks. 65 % til 4 %) av den maksimale teoretiske bindingen (som definert ovenfor) av de to antistoffene eller bindemidlene i kombinasjon.

15

Et antistoff er definert som å kryssblokkere i ELISA-assayet som beskrevet i eksemplene hvis antistoffet mot sklerostin i løsningsfase er i stand til å forårsake en reduksjon på mellom 60 % og 100 %, spesifikt mellom 70 % og 100 % og nærmere bestemt mellom 80 % og 100 % av sklerostindetekteringssignalet (dvs. mengden av sklerostin bundet av det overtrukne antistoffet) sammenlignet med sklerostindetekteringssignalet oppnådd i fravær av antistoffet mot sklerostin i løsningsfase (dvs. de positive kontrollbrønnene).

20

Monoklonale antistoffer

25

Antistoffer beskrevet heri inkluderer de humane monoklonale antistoffene, isolert som beskrevet i eksemplene. V_H-aminoesyresekvensene i de beskrevne isolerte antistoffene er vist i SEQ ID NO: 69–77. V_L-aminoesyresekvensene i de beskrevne isolerte antistoffene er vist i henholdsvis SEQ ID NO: 80–88. De tilsvarende foretrukne aminoesyresekvensene i tungkjeden av full lengde i beskrevne antistoffer er vist i SEQ ID NO:113–121. De tilsvarende foretrukne aminoesyresekvensene i lett kjeden av full lengde av beskrevne antistoffer er vist i henholdsvis SEQ ID NO:124–132. Andre antistoffer inkluderer aminosyrer som er mutert, men som likevel har minst 60, 70, 80, 90 eller 95 prosent eller mer identitet i CDR-regionene med CDR-regionene illustrert i sekvensene beskrevet ovenfor. I noen utførelsesformer inkluderer beskrivelsen

30

35

mutantaminosyresekvenser hvori høyst 1, 2, 3, 4 eller 5 aminosyrer er mutert i CDR-regionene ved sammenligning med CDR-regionene illustrert i sekvensen beskrevet ovenfor.

5 Tungkjedens variable parental-nukleotidsekvenser er vist i SEQ ID NO 89–90. Tungkjedens variable parental-nukleotidsekvenser er vist i SEQ ID NO 100–101. Nukleotidsekvenser i lettkjeden av full lengde optimalisert for ekspresjon i en pattedyrce

10 143. Aminosyresekvenser i lettkjeden av full lengde kodet av optimaliserte nukleotidsekvenser i lettkjeden er vist i SEQ ID NO 124–132. Aminosyresekvenser i tungkjeden av full lengde kodet av optimaliserte nukleotidsekvenser i tungkjeden er vist i SEQ ID NO 113–121. Andre antistoffer inkluderer aminosyrer eller nukleinsyrer som er mutert, men som likevel har

15 minst 60, 70, 80, 90 eller 95 prosent eller mer identitet med sekvensene beskrevet ovenfor. I noen utførelsesformer inkluderer oppfinnelsen mutantaminosyresekvenser hvori ikke mer enn 1, 2, 3, 4 eller 5 aminosyrer er mutert i de variable regionene ved sammenligning med de variable regionene illustrert i sekvensen beskrevet ovenfor, samtidig som i det vesentlige samme

20 terapeutiske aktivitet beholdes.

Siden hvert av disse antistoffene kan binde til sklerostin, kan V_H , V_L , lettkjedese

25 kvensen av full lengde og tungkjedese

30 kvensene av full lengde (nukleotidsekvenser og aminosyresekvenser) "blandes og matches" for å danne andre antisklerostinbindende molekyler ifølge oppfinnelsen. Sklerostinbinding av slike "blandede og matchede" antistoffer kan testes ved anvendelse av bindingsassayet beskrevet ovenfor og i eksemplene (f.eks. ELISA). Når disse kjedene blandes og matches, bør en V_H -sekvens fra en særlig V_H/V_L -paring erstattes med en strukturelt lignende V_H -sekvens. Likeledes bør en tungkjedese

35 kvens av full lengde fra en særlig tungkjede/lettkjede-paring av full lengde erstattes med en strukturelt lignende tungkjedese

40 kvens av full lengde. En V_L -sekvens fra en særlig V_H/V_L -paring bør likeledes erstattes med en strukturelt lignende V_L -sekvens. Likeledes bør en lettkjedese

45 kvens av full lengde fra en særlig tungkjede/lettkjede-paring av full lengde utbyttes med en strukturelt lignende lettkjedese

50 kvens av full lengde. I ett aspekt tilveiebringer beskrivelsen følgelig et isolert monoklonalt antistoff eller antigenbindingsregion derav som har: en tungkjedes variable region omfattende en aminosyresekvens valgt fra

gruppen bestående av SEQ ID NO: 69–77; og en lettkjedes variable region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 80–88; hvori antistoffet spesifikt binder til sklerostin.

5 I et annet aspekt tilveiebringer beskrivelsen:

(i) et isolert monoklonalt antistoff som har: en tungkjede av full lengde omfattende en aminosyresekvens som er optimalisert for ekspresjon i en pattedyrceile valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO:113–121; og en lettkjede av full lengde omfattende en aminosyresekvens som er optimalisert for ekspresjon i en pattedyrceile valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO:124–132; eller

(ii) et funksjonelt protein omfattende en antigenbindingsporsjon derav.

I et annet aspekt tilveiebringer beskrivelsen:

15 (i) et isolert monoklonalt antistoff som har: en tungkjede av full lengde omfattende en nukleotidsekvens som er optimalisert for ekspresjon i en pattedyrceile valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO:135–143; og en lettkjede av full lengde omfattende en nukleotidsekvens som er optimalisert for ekspresjon i en pattedyrceile valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO:146–154; eller

(ii) et funksjonelt protein omfattende en antigenbindingsporsjon derav.

I enda et annet aspekt tilveiebringer beskrivelsen antistoffer som omfatter CDR1-ene, CDR2-ene og CDR3-ene i tung- og lettkjeden i antistoffene, eller kombinasjoner derav. Aminosyresekvensene i V_H CDR1-ene i antistoffene er vist i SEQ ID NO: 1–11. Aminosyresekvensene i V_H CDR2-ene i antistoffene er vist i SEQ ID NO: 12–22. Aminosyresekvensene i V_H CDR3-ene i antistoffene er vist i SEQ ID NO: 23–33. Aminosyresekvensene i V_L CDR1-ene i antistoffene er vist i SEQ ID NO: 34–44. Aminosyresekvensene i V_L CDR2-ene i antistoffene er vist i SEQ ID NO: 45–55. Aminosyresekvensene i V_L CDR3-ene i antistoffene er vist i SEQ ID NO: 56–66. CDR-regionene er avgrenset ved anvendelse av Kabat-systemet (Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg., U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nr. 91–3242).

Forutsatt at hvert av disse antistoffene kan binde til sklerostin, og at antigenbindende spesifisitet tilveiebringes primært ved CDR1-, -2- og -3-regionene, kan V_H CDR1-, 2- og 3-sekvensene og V_L CDR1-, 2- og 3-sekvensene "blandes og matches" (dvs. CDR-er fra forskjellige antistoffer kan blandes og matches), selv om hvert antistoff må inneholde en V_H CDR1, -2 og -3 og en V_L CDR1, -2 og -3 for å danne andre antisklerostinbindingsmolekyler ifølge oppfinnelsen. Sklerostinbinding av slike "blandede og matchede" antistoffer kan testes ved anvendelse av bindingsassayet beskrevet ovenfor og i eksemplene (f.eks. ELISA). Når V_H CDR-sekvenser blandes og matches, bør CDR1-, CDR2- og/eller CDR3-sekvensen fra en særlig V_H -sekvens erstattes med strukturelt lignende CDR-sekvens(er). Når V_L CDR-sekvenser blandes og matches, bør likeledes CDR1-, CDR2- og/eller CDR3-sekvensen fra en særlig V_L -sekvens erstattes med strukturelt lignende CDR-sekvens(er). Det vil uten videre være åpenbart for fagmannen at hittil ukjente V_H - og V_L -sekvenser kan dannes ved substituering av én eller flere V_H og/eller V_L CDR-regionsekvenser med strukturelt lignende sekvenser fra CDR-sekvensene vist heri for monoklonale antistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

Et isolert monoklonalt antistoff, eller en antigenbindingsregion derav, har: en CDR1 i tungkjedens variable region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 1–11; en CDR2 i tungkjedens variable region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 12–22; en CDR3 i tungkjedens variable region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 23–33; en CDR1 i lettkjedens variable region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 34–44; en CDR2 i lettkjedens variable region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 45–55; og en CDR3 i lettkjedens variable region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 56–66; hvori antistoffet spesifikt binder sklerostin.

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 3; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 14; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 25; en CDR1 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 36; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 47; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 58.

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 4; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 15; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 26; en CDR1 i
5 lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 37; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 48; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 59.

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 5; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 16; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 27; en CDR1 i
10 lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 38; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 49; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 60.

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 6; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 17; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 28; en CDR1 i
15 lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 39; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 50; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 61.

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 7; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 18; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 29; en CDR1 i
25 lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 40; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 51; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 62.

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 8; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 19; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 30; en CDR1 i
30 lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 41; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 52; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 63.

35

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 9; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 20; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 31; en CDR1 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 42; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 53; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 64.

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 10; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 21; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 32; en CDR1 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 43; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 54; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 65.

I en viss utførelsesform omfatter antistoffet: en CDR1 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 11; en CDR2 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 22; en CDR3 i tungkjedens variable region med SEQ ID NO: 33; en CDR1 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 44; en CDR2 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 55; og en CDR3 i lettkjedens variable region med SEQ ID NO: 66.

Et humant antistoff omfatter som anvendt heri tung- eller lettkjedens variable regioner eller tung- eller lettkjeder av full lengde som er "produktet av" eller "avledet fra" en særlig kjønnsellesekvens hvis antistoffets variable regioner eller kjeder av full lengde oppnås fra et system som anvender humane kjønnselleimmunglobulingener. Slike systemer inkluderer immunisering av en transgen mus som bærer humane immunglobulingener med antigenet av interesse eller screening av et humant immunglobulingenbibliotek vist på fag med antigenet av interesse. Et humant antistoff som er "produktet av" eller "avledet fra" en human kjønnselleimmunglobulinsekvens, kan identifiseres som sådant ved å sammenligne aminosyresekvensen av det humane antistoffet mot aminosyresekvensene av humane kjønnselleimmunglobuliner og seleksjon av den humane kjønnselleimmunglobulinsekvensen som i sekvens er nærmest (dvs. størst % identitet) sekvensen i det humane antistoffet. Et humant antistoff som er "produktet av" eller "avledet fra" en særlig human kjønnselleimmunglobulinsekvens, kan inneholde aminosyreforskjeller sammenlignet med kjønnsellesekvensen, på grunn av for eksempel naturlig

forekommende somatiske mutasjoner eller bevisst introduksjon av stedsrettet mutasjon. Et valgt humant antistoff er imidlertid typisk minst 90 % identisk i aminosyresekvens med en aminosyresekvens som er kodet av et humant kjønnselleimmunglobulingen, og inneholder aminosyrerester som identifiserer det humane antistoffet som humant ved sammenligning med kjønnselleimmunglobulinaminosyresekvensene av andre arter (f.eks. murine kjønnsellesekvenser). I visse tilfeller kan et humant antistoff være minst 60 %, 70 %, 80 %, 90 % eller minst 95 %, eller også minst 96 %, 97 %, 98 % eller 99 % identisk i aminosyresekvens med aminosyresekvensen som er kodet av kjønnselleimmunglobulingenet. Et humant antistoff avledet fra en særlig human kjønnsellesekvens vil typisk vise høyst 10 aminosyreforskjeller fra aminosyresekvensen som er kodet av det humane kjønnselleimmunglobulingenet. I visse tilfeller kan det humane antistoffet vise høyst 5, eller også høyst 4, 3, 2 eller 1 aminosyreforskjell fra aminosyresekvensen som er kodet av kjønnselleimmunglobulingenet. I noen utførelsesformer er kjønnselleimmunglobulinaminosyresekvenser valgt fra dem omfattende de variable tungkjedeselekvensene bestående av henholdsvis SEQ ID NO:67–68, og de variable lettkjedeselekvensene bestående av henholdsvis SEQ ID NO:78–79.

Homologe antistoffer

I enda en annen utførelsesform har et beskrevet antistoff tung- og lettkjedeaminosyresekvenser av full lengde; tung- og lettkjedenukleotidsekvenser av full lengde, tung- og lettkjedenukleotidsekvenser i den variable regionen eller tung- og lettkjedeaminosyresekvenser i den variable regionen som er homologe med aminosyre- og nukleotidsekvensene i antistoffene beskrevet heri, og hvori antistoffene bevarer de ønskede funksjonelle egenskapene til antistoffene mot sklerostin ifølge oppfinnelsen.

Beskrivelsen tilveiebringer for eksempel et isolert monoklonalt antistoff (eller et funksjonelt protein omfattende en antigenbindingsporsjon derav) omfattende en variabel region i tungkjeden og en variabel region i lettkjeden, hvori: tungkjedens variable region omfatter en aminosyresekvens som er minst 80 % identisk med en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 67–77; lettkjedens variable region omfatter en aminosyresekvens som er minst

- 80 % identisk med en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 78–88; antistoffet binder spesifikt til sklerostin, og antistoffet viser minst én av følgende funksjonelle egenskaper: antistoffet blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert wnt-signaleringsassay, antistoffet blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i et cellebasert mineraliseringsassay eller blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i Smad1-fosforyleringsassay eller antistoffet inhiberer binding av sklerostin til LRP-6 eller antistoffet øker bendannelse og -masse og -densitet.
- 5
- 10 I et ytterligere eksempel tilveiebringer beskrivelsen et isolert monoklonalt antistoff, (eller et funksjonelt protein omfattende en antigenbindingsporsjon derav) omfattende en tungkjede av full lengde og en lettkjede av full lengde, hvori: tungkjeden av full lengde omfatter en aminosyresekvens som er minst 80 % identisk med en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID
- 15 NO 111–121; lettkjeden av full lengde omfatter en aminosyresekvens som er minst 80 % identisk med en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO 122–132; antistoffet binder spesifikt til sklerostin og antistoffet viser minst én av følgende funksjonelle egenskaper: antistoffet blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert wnt-signaleringsassay,
- 20 antistoffet blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i et cellebasert mineraliseringsassay eller blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i Smad1-fosforyleringsassay eller antistoffet inhiberer binding av sklerostin til LRP-6 eller antistoffet øker bendannelse og -masse og -densitet.
- 25 I et annet eksempel tilveiebringer beskrivelsen et isolert monoklonalt antistoff (eller et funksjonelt protein omfattende en antigenbindingsporsjon derav) omfattende en tungkjede av full lengde og en lettkjede av full lengde, hvori: tungkjeden av full lengde kodes av en nukleotidsekvens som er minst 80 %
- 30 identisk med en nukleotidsekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO 133–143; lettkjeden av full lengde omfatter en nukleotidsekvens som er minst 80 % identisk med en nukleotidsekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO 144–154; antistoffet binder spesifikt til sklerostin og antistoffet viser minst én av følgende funksjonelle egenskaper: antistoffet blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert wnt-signaleringsassay, antistoffet blokkerer
- 35 inhiberende effekt av sklerostin i et cellebasert mineraliseringsassay eller blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i Smad1-fosforyleringsassay eller

antistoffet inhiberer binding av sklerostin til LRP-6 eller antistoffet øker bendannelse og -masse og -densitet.

5 I forskjellige utførelsesformer kan antistoffet vise én eller flere, to eller flere eller tre av de funksjonelle egenskapene drøftet ovenfor. Antistoffet kan være for eksempel et humant antistoff, et humanisert antistoff eller et kimært antistoff.

10 I andre utførelsesformer kan V_H- og/eller V_L-aminosyresekvensene være 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 % identisk med sekvensene anført ovenfor. I andre utførelsesformer kan V_H-og/eller V_L-aminosyresekvensene være identiske bortsett fra en aminosyresubstitusjon i høyst 1, 2, 3, 4 eller 5 aminosyreposisjoner. Et antistoff som har V_H- og V_L-regioner som har høy (dvs. 80 % eller større) identitet med V_H- og V_L-regionene med henholdsvis SEQ ID NO 67–77 og SEQ ID NO 78–88, kan oppnås ved
15 mutagenese (f.eks. stedsrettet eller PCR-mediert mutagenese) av nukleinsyremolekyler som koder for henholdsvis SEQ ID NO: 89–99 og 100–110, etterfulgt av testing av det kodede endrede antistoffet for tilbakeholdt funksjon (dvs. funksjonene anført ovenfor) ved anvendelse av de funksjonelle assayene beskrevet heri.

20 I andre utførelsesformer kan aminosyresekvensene i tung- og/eller lettkjeden av full lengde være 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 % identisk med sekvensene anført ovenfor. Et antistoff som har en tungkjede av full lengde og en lettkjede av full lengde som har høy (dvs. 80 % eller større)
25 identitet med henholdsvis tungkjedene av full lengde med en av SEQ ID NO 111–121 og lettkjeder av full lengde med en av SEQ ID NO 122–132, kan oppnås ved mutagenese (f.eks. stedsrettet eller PCR-mediert mutagenese) av nukleinsyremolekyler som koder for henholdsvis SEQ ID NO 133–143 og SEQ ID NO 144–154, etterfulgt av testing av det kodede endrede antistoffet for bevart
30 funksjon (dvs. funksjonene anført ovenfor) ved anvendelse av det funksjonelle assayet beskrevet heri.

I andre utførelsesformer kan nukleotidsekvensene i tung- og/eller lettkjeden av full lengde være 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 %
35 identisk med sekvensene anført ovenfor.

I andre utførelsesformer kan nukleotidsekvensene i tung- og/eller lettkjedens variable regioner være 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 % identisk med sekvensene anført ovenfor.

5 Prosentidentiteten mellom de to sekvensene er som anvendt heri en funksjon av antallet av identiske posisjoner delt mellom sekvensene (dvs. % identitet = antall av identiske posisjoner / totalt antall av posisjoner x 100), idet det tas hensyn til antallet gap og lengden av hvert gap, som må introduseres for optimal sammenstilling av de to sekvensene. Sammenligningen av sekvenser og
10 bestemmelsen av prosentvis identitet mellom to sekvenser kan oppnås ved anvendelse av en matematisk algoritme, som beskrevet i de ikke-begrensede eksemplene nedenfor.

15 Den prosentvise identiteten mellom to aminosyresekvenser kan bestemmes ved anvendelse av algoritmen i E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) som er inkorporert i ALIGN-programmet (versjon 2.0), ved anvendelse av en PAM120 vektresttabell, en gaplengdestraff på 12 og en gapstraff på 4. Den prosentvise identiteten mellom to aminosyresekvenser kan i tillegg bestemmes ved anvendelse av Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol.
20 48:444-453, 1970)-algoritmen som er inkorporert i GAP-programmet i GCG-programvarepakken (tilgjengelig på <http://www.gcg.com>), ved anvendelse av enten en Blossum 62-matrise eller en PAM250-matrise, og en gapvekt på 16, 14, 12, 10, 8, 6 eller 4 og en lengdevekt på 1, 2, 3, 4, 5 eller 6.

25 Proteinsekvensene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan i tillegg eller alternativt ytterligere anvendes som en "søkesekvens" for å utføre et søk mot offentlige databaser for eksempel for å identifisere relaterte sekvenser. Slike søk kan utføres ved anvendelse av XBLAST-programmet (versjon 2.0) fra Altschul, et al., 1990 J.Mol. Biol. 215:403-10. BLAST-proteinsøk kan utføres med XBLAST-
30 programmet, score = 50, ordlengde = 3 for å oppnå aminosyresekvenser som er homologe med antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen. For å oppnå gappede sammenstillinger for sammenligningsformål kan Gapped BLAST benyttes som beskrevet i Altschul et al., 1997 Nucleic Acid Res. 25(17):3389-3402. Ved anvendelse av BLAST- og Gapped BLAST-programmer kan det anvendes
35 standardparametere av de respektive programmer (f.eks. XBLAST og NBLAST). Se <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Antistoffer med konservative modifiseringer

I visse utførelsesformer har et beskrevet antistoff en variabel region i tungkjeden omfattende CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvenser og en variabel region i lettkjeden omfattende CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvenser, hvori én eller flere av disse CDR-sekvensene har spesifiserte aminosyresekvenser basert på antistoffene beskrevet heri eller konservative modifiseringer derav, og hvori antistoffene bevarer de ønskede funksjonelle egenskapene til antistoffer mot sklerostin ifølge oppfinnelsen. Beskrivelsen tilveiebringer følgelig et isolert monoklonalt antistoff, eller et funksjonelt protein omfattende en antigenbindingsporsjon derav, bestående av en tungkjedes variable region omfattende CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvenser og en lettkjedes variable region omfattende CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvenser, hvori: CDR1-aminosyresekvensene i tungkjedens variable region er valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 1–11, og konservative modifiseringer derav; CDR2-aminosyresekvensene i tungkjedens variable region er valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 12–22, og konservative modifiseringer derav; CDR3-aminosyresekvensene i tungkjedens variable region er valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 23–33, og konservative modifiseringer derav; CDR1-aminosyresekvensene i lettkjedens variable regioner er valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 34–44, og konservative modifiseringer derav; CDR2-aminosyresekvensene i lettkjedens variable regioner er valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 45–55, og konservative modifiseringer derav; CDR3-aminosyresekvensene i lettkjedens variable regioner er valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 56–66, og konservative modifiseringer derav; antistoffet binder spesifikt til sklerostin, og antistoffet viser minst én av følgende funksjonelle egenskaper: antistoffet blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert wnt-signaleringsassay, antistoffet blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i et cellebasert mineraliseringsassay eller blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i Smad1-fosforyleringsassay eller antistoffet inhiberer binding av sklerostin til LRP-6 eller antistoffet øker bendannelse og -masse og -densitet.

I forskjellige utførelsesformer kan antistoffet vise én eller flere, to eller flere eller tre eller flere av de funksjonelle egenskapene anført og drøftet ovenfor. Slik antistoffer kan være for eksempel humane antistoffer, humaniserte antistoffer eller kimære antistoffer.

I andre utførelsesformer har et beskrevet antistoff optimalisert for ekspresjon i en pattedyrceelle en tungkjedesequens av full lengde og en lettsekjedesequens av full lengde, hvori én eller flere av disse sequevensene har spesifiserte aminosyresequenser basert på antistoffene beskrevet heri eller konservative modifiseringer derav, og hvori antistoffene bevarer de ønskede funksjonelle egenskapene til antistoffene mot sklerostin ifølge oppfinnelsen. Beskrivelsen tilveiebringer følgelig et isolert monoklonalt antistoff optimalisert for ekspresjon i en pattedyrceelle bestående av en tungkjede av full lengde og en lettsekjede av full lengde hvori: tungkjeden av full lengde har aminosyresequenser valgt fra gruppen av SEQ ID NO: 111–121, og konservative modifiseringer derav; og lettsekjeden av full lengde har aminosyresequenser valgt fra gruppen av SEQ ID NO: 122–132, og konservative modifiseringer derav; antistoffet binder spesifikt til sklerostin, og antistoffet viser minst én av følgende funksjonelle egenskaper: antistoffet blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert wnt-signaleringsassay, antistoffet blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert mineraliseringsassay eller blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i Smad1-fosoryleringsassay eller antistoffet inhiberer binding av sklerostin til LRP-6, eller antistoffet øker bendannelse og -masse og -densitet.

I forskjellige utførelsesformer kan antistoffet vise én eller flere, to eller flere eller tre eller flere av de funksjonelle egenskapene anført og drøftet ovenfor. Slik antistoffer kan være for eksempel humane antistoffer, humaniserte antistoffer eller kimære antistoffer.

Betegnelsen "konservative sequevensmodifiseringer" er som anvendt heri ment å bety aminosyremodifiseringer som ikke signifikant påvirker eller endrer bindingsegenskapene til antistoffet inneholdende aminosyresequensen. Slike konservative modifiseringer inkluderer aminosyresubstitusjoner, -addisjoner og -delesjoner. Modifikasjoner kan introduseres i et antistoff ifølge oppfinnelsen ved kjente standardteknikker, slik som stedsrettet mutagenese og PCR-mediert mutagenese.

Konservative aminosyresubstitusjoner er dem i hvilke aminosyreresten erstattes med en aminosyrerest som har en lignende sidekjede. Familier av aminosyrerester som har lignende sidekjeder, er definert i teknikken. Disse familiene inkluderer aminosyrer med basiske sidekjeder (f.eks. lysin, arginin,

histidin), sure sidekjeder (f.eks. asparginsyre, glutaminsyre), uladde polare sidekjeder (f.eks. glycin, asparagin, glutamin, serin, treonin, tyrosin, cystein, tryptofan), ikke-polare sidekjeder (f.eks. alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, metionin), beta-forgrenede sidekjeder (f.eks. treonin, valin, isoleucin) og aromatiske sidekjeder (f.eks. tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Én eller flere aminosyrerester innenfor CDR-regionene av et antistoff ifølge oppfinnelsen kan erstattes med andre aminosyrerester fra samme sidekjedefamilie, og det endrede antistoffet kan testes for bevart funksjon ved anvendelse av de funksjonelle assayene beskrevet heri.

Antistoffer som binder til samme epitop som antistoffer mot sklerostin ifølge oppfinnelsen

I en annen utførelsesform tilveiebringer beskrivelsen antistoffer som binder til samme epitop som de forskjellige spesifikke antistoffene mot sklerostin beskrevet heri. Det er faktisk overraskende blitt funnet at alle antistoffene beskrevet i eksemplene er i stand til å:

(i) blokkere den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert wnt-signaleringsassay;

(ii) blokkere den inhiberende effekten i et cellebasert mineraliseringsassay;

(iii) inhibere binding av sklerostin til LRP-6; og

(iv) øke bendannelse, masse og densitet,

binde samme epitop i sklerostin med høy affinitet, idet epitopen er en konformasjonell epitop som inkluderer aminosyrer fra både SEQ ID NO:156 og SEQ ID NO:157. Uten å være bundet av noen som helst spesifikk modell foreslås det her at aminosyresekvensene SEQ ID NO:156 og SEQ ID NO:157 avgrenser én konformasjonell epitopregion i sklerostinpolypeptidet som gjenkjennes av de beskrevne antistoffene.

Ytterligere antistoffer kan derfor identifiseres basert på deres evne til å krysskonkurrere (f.eks. til kompetitivt å inhibere bindingen av, på en statistisk signifikant måte) med andre antistoffer ifølge oppfinnelsen i standard sklerostinbindingsassayer. Et testantistoffs evne til å inhibere bindingen av antistoffer ifølge den foreliggende beskrivelsen til humant sklerostin viser at testantistoffet kan konkurrere med det antistoffet om binding til humant

sklerostin; et slikt antistoff kan ifølge ikke-begrensede teori binde til samme eller en relatert (f.eks. en strukturelt lignende eller romlig proksimal) epitop på humant sklerostin som antistoffet med hvilket det konkurrerer. I en viss utførelsesform er antistoffet som binder til samme epitop på humant sklerostin som antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, et humant monoklonalt antistoff. Slike humane monoklonale antistoffer kan fremstilles og isoleres som beskrevet i eksemplene.

Konstruerte og modifiserte antistoffer

Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan videre fremstilles ved anvendelse av et antistoff som har én eller flere av VH- og/eller VL-sekvensene vist heri som utgangsmateriale for å konstruere et modifisert antistoff, hvilket modifisert antistoff kan ha endrede egenskaper fra utgangsantistoffet. Et antistoff kan være konstruert ved modifisering av én eller flere rester innenfor én eller begge variable regioner (dvs. VH og/eller VL), f.eks. innenfor én eller flere CDR-regioner og/eller innenfor én eller flere struktureregioner. Et antistoff kan i tillegg eller alternativt konstrueres ved modifisering av rester innenfor de konstante regionene, f.eks. for å endre antistoffets effektorfunksjoner.

Én type konstruksjon av variabel region som kan utføres, er CDR-poding. Antistoffer interagerer med målantigener hovedsakelig gjennom aminosyrerester som er lokalisert i de seks tung- og lettkjedens komplementaritetsbestemmende regionene (CDR-er). Av denne grunn er aminosyresekvensene innenfor CDR-ene mer ulike mellom individuelle antistoffer enn sekvenser utenfor CDR-ene. Siden CDR-sekvenser er ansvarlige for de fleste antistoff-antigen-interaksjoner, er det mulig å uttrykke rekombinante antistoffer som etterligner egenskapene til spesifikt naturlig forekommende antistoffer, ved å konstruere ekspresjonsvektorer som inkluderer CDR-sekvenser fra det spesifikke naturlig forekommende antistoffet podet på strukturesekvenser fra et annet antistoff med andre egenskaper (se for eksempel Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323–327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522–525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Se USA 86:10029–10033; US-patentnr. 5,225,539 av Winter og US-patentnr. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 og 6,180,370 av Queen et al.)

En annen utførelsesform ifølge beskrivelsen vedrører følgelig et isolert monoklonalt antistoff, eller et funksjonelt protein omfattende en antigenbindingsporsjon derav, omfattende en tungkjedes variable region omfattende henholdsvis CDR1-sekvenser som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 1–11; CDR2-sekvenser som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 12–22; CDR3-sekvenser som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 23–33; og en lett kjedes variable region som har henholdsvis CDR1-sekvenser som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 34–44; CDR2-sekvenser som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 45–55; og CDR3-sekvenser bestående av en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 56–66. Slike antistoffer inneholder således V_H og V_L CDR-sekvensene i monoklonale antistoffer, men kan likevel inneholde andre struktursekvenser enn disse antistoffene.

Slike struktursekvenser kan oppnås fra offentlig DNA-databaser eller publiserte referanser som inkluderer kjønnselleantistoffgensekvenser. Kjønnselle-DNA-sekvenser for humane gener i tung- og lett kjedens variable region finnes for eksempel i databasen for humane kjønnsellesekvenser "VBase" (tilgjengelig på Internett på www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), samt i Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utgave, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikasjon nr. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. fol. Biol. 227:776–798; og Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827–836.

Et eksempel på struktursekvenser for anvendelse i de beskrevne antistoffene er dem som ligner strukturelt på struktursekvensene anvendt av valgte antistoffer ifølge oppfinnelsen, f.eks. konsensussekvenser og/eller struktursekvenser anvendt av monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen. V_H CDR1-, 2- og -3-sekvensene, og V_L CDR1-, 2- og -3-sekvensene, kan podes på strukturregionene som har identisk sekvens med den funnet i kjønnselleimmunoglobulingenet fra hvilket struktursekvensen er avledet, eller CDR-sekvensene kan podes på strukturregioner som inneholder én eller flere mutasjoner sammenlignet med kjønnsellesekvensene. Det er for eksempel funnet at i visse tilfeller er det gunstig å mutere rester innenfor strukturregionene for å opprettholde eller

forbedre antistoffets antigenbindingsevne (se for eksempel US-patentnr. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 og 6,180,370 av Queen et al).

En annen type modifisering av variabel region er å mutere aminosyrerester innenfor V_H og/eller V_L CDR1-, CDR2- og/eller CDR3-regionene for derved å forbedre én eller flere bindingsegenskaper (f.eks. affiniteten) ved antistoffet av interesse, kjent som "affinitetsmodning". Stedsrettet mutagenese eller PCR-mediert mutagenese kan utføres for å introdusere mutasjon(e)n(e) og effekten på antistoffbinding, eller en annen funksjonell egenskap av interesse, kan evalueres i *in vitro*- eller *in vivo*-assayer som beskrevet heri og tilveiebrakt i eksemplene. Konservative modifiseringer (som drøftet ovenfor) kan introduseres. Mutasjonene kan være aminosyresubstitusjoner, -addisjoner eller -delesjoner. Typisk endres videre ikke mer enn én, to, tre, fire eller fem rester innenfor en CDR-region.

I en annen utførelsesform tilveiebringer beskrivelsen følgende isolerte monoklonale antistoffer mot sklerostin, eller et funksjonelt protein omfattende en antigenbindingsporsjon derav, bestående av en tungkjedes variable region som har: en V_H CDR1-region bestående av en aminosyresekvens valgt fra gruppen som har SEQ ID NO: 1–11 eller en aminosyresekvens som har én, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, -delesjoner eller -addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 1–11; en V_H CDR2-region som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 12–22, eller en aminosyresekvens som har én, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, -delesjoner eller -addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 12–22; en V_H CDR3-region som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 23–33, eller en aminosyresekvens som har én, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, -delesjoner eller -addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 23–33; en V_L CDR1-region som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 34–44, eller en aminosyresekvens som har én, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, -delesjoner eller -addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 34–44; en V_L CDR2-region som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 45–55, eller en aminosyresekvens som har én, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, -delesjoner eller -addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 45–55; og en V_L CDR3-region som har en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 56–66, eller en aminosyresekvens som har én, to, tre, fire eller fem

aminosyresubstitusjoner, -delesjoner eller -addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 56-66.

Struktur- eller Fc-konstruksjon

5

Konstruerte antistoffer beskrevet heri inkluderer dem i hvilke modifiseringer er foretatt på strukturester innenfor V_H og/eller V_L , f.eks. for å forbedre antistoffets egenskaper. Slike strukturmodifiseringer er typisk fremstilt for å redusere antistoffets immunogenisitet. Én fremgangsmåte er for eksempel å "tilbakemutere" én eller flere strukturester til den tilsvarende kjønnsellesekvensen. Et antistoff som har gjennomgått somatisk mutasjon, kan nærmere bestemt inneholde strukturester som skiller seg fra kjønnsellesekvensen fra hvilken antistoffet er avledet. Slike rester kan identifiseres ved sammenligning av antistoffstrukturekvensene med kjønnsellesekvensene fra hvilke antistoffet er avledet. For å returnere struktureregionsekvensene til deres kjønnsellekonfigurasjon kan de somatiske mutasjonene "tilbakemuteres" til kjønnsellesekvensen ved for eksempel stedsrettet mutagenese eller PCR-mediert mutagenese.

10

15

20

En annen type strukturmodifisering involverer mutasjon av én eller flere rester innenfor struktureregionen, eller også innenfor én eller flere CDR-regioner, for å fjerne T-celle-epitoper for derved å redusere antistoffets potensielle immunogenisitet. Denne fremgangsmåten betegnes også "deimmunisering" og er nærmere beskrevet i US-publikasjonsnr. 20030153043 av Carr et al.

25

Antistoffer beskrevet heri kan i tillegg eller alternativt til modifiseringer foretatt innenfor struktur- eller CDR-regionene konstrueres for å inkludere modifiseringer innenfor Fc-regionen, typisk for å endre én eller flere funksjonelle egenskaper ved antistoffet, slik som halveringstid i serum, komplementfiksering, Fc-reseptorbinding og/eller antigenavhengig cellulær cytotoxicitet. Et beskrevet antistoff kan videre være kjemisk modifisert (f.eks. én eller flere kjemiske enheter kan være bundet til antistoffet) eller være modifisert for å endre dets glykosylering, igjen for å endre én eller flere funksjonelle egenskaper ved antistoffet. Hver av disse utførelsesformene beskrives nærmere nedenfor.

30

35

Nummereringen av rester i Fc-regionen er den for Kabats EU-indeks.

I én utførelsesform modifiseres hengselregionen i CH1 slik at antallet av cysteinrester i hengselregionen endres, f.eks. økes eller reduseres. Denne fremgangsmåten er nærmere beskrevet i US-patentnr. 5,677,425 av Bodmer et al. Antallet av cysteinrester i hengselregionen av CH1 endres for eksempel for å

5 lette sammenstillingen av lett- og tungkjedene eller for å øke eller redusere antistoffets stabilitet.

I en annen utførelsesform muteres et antistoffs Fc-hengselregion for å redusere antistoffets biologiske halveringstid. Én eller flere aminosyremutasjoner introduseres nærmere bestemt i Fc-hengselfragmentets CH2-CH3-

10 domenegrensesnittregion slik at antistoffet har svekket stafylokokkylprotein A (SpA)-binding i forhold tilativ Fc-hengsel-domene-SpA-binding. Denne fremgangsmåten er nærmere beskrevet i US-patentnr. 6,165,745 av Ward et al.

I en annen utførelsesform modifiseres antistoffet for å øke dets biologiske halveringstid. Forskjellige tilnærminger er mulig. Én eller flere av følgende mutasjoner kan for eksempel introduseres: T252L, T254S, T256F, som beskrevet i US-patentnr. 6,277,375 av Ward. For å øke den biologiske halveringstiden kan antistoffet alternativt endres innenfor CH1- eller CL-regionen for å inneholde en

15 redningsreseptorbindingsepitop tatt fra to sløyfer av et CH2-domene av en Fc-region av et IgG, som beskrevet i US-patentnr. 5,869,046 og 6,121,022 av Presta et al.

20

I enda andre utførelsesformer endres Fc-regionen ved erstatning av minst én aminosyrerest med en annen aminosyrerest for å endre antistoffets effektorfunksjoner. Én eller flere aminosyrer kan for eksempel erstattes med en annen aminosyrerest slik at antistoffet har en endret affinitet for en effektorligand, men bevarer parental-antistoffets antigenbindende evne. Effektorliganden for hvilken affiniteten endres, kan være for eksempel en Fc-

25 reseptor eller C1-komponenten av komplementet. Denne fremgangsmåten er nærmere beskrevet i US-patentnr. 5,624,821 og 5,648,260, begge av Winter et al.

30

I en annen utførelsesform kan én eller flere aminosyrer valgt fra aminosyrerester erstattes med en annen aminosyrerest slik at antistoffet har endret C1q-binding og/eller redusert eller fjernet komplementavhengig cytotoksitet (CDC). Denne

35

fremgangsmåten er nærmere beskrevet i US-patentnr. 6,194,551 av Idusogie et al.

5 I en annen utførelsesform endres én eller flere aminosyrerester for derved å endre antistoffets evne til å fikse komplementet. Denne fremgangsmåten er nærmere beskrevet i PCT-publikasjon WO 94/29351 av Bodmer et al.

10 I enda en annen utførelsesform modifiseres Fc-regionen for å øke antistoffets evne til å mediere antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC) og/eller for å øke antistoffets affinitet for en Fcγ-reseptor ved modifisering av én eller flere aminosyrer. Denne fremgangsmåten er nærmere beskrevet i PCT-publikasjon WO 00/42072 av Presta. Bindingsstedene på humant IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII og FcRn er videre kartlagt, og varianter med forbedret binding er beskrevet (se Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591–6604).

15 I enda en annen utførelsesform modifiseres glykosyleringen av et antistoff. Et aglykosylert antistoff kan for eksempel fremstilles (dvs. antistoffet mangler glykosylering). Glykosylering kan endres for eksempel for å øke antistoffets affinitet for "antigen". Slike karbohydratmodifiseringer kan oppnås ved for eksempel endring av ett eller flere glykosyleringssteder innenfor antistoffsekvensen. Det kan for eksempel fremstilles én eller flere aminosyresubstitusjoner som resulterer i eliminering av én eller flere av den variable regionens strukturglykosyleringssteder for derved å eliminere glykosylering på stedet. Slik aglykosylering kan øke antistoffets affinitet for antigen. En slik fremgangsmåte er nærmere beskrevet i US-patentnr. 5,714,350 og 6,350,861 av Co et al.

20

25

Det kan i tillegg eller alternativt fremstilles et antistoff som har en endret type av glykosylering, slik som et hypofukosylert antistoff som har reduserte mengder av fukosylrester, eller et antistoff som har økte halverende GlcNac-strukturer. Slike endrede glykosyleringsmønstre er vist å øke antistoffenes ADCC-evne. Slike karbohydratmodifiseringer kan oppnås ved for eksempel ekspresjon av antistoffet i en vertscelle med endret glykosyleringsmaskineri. Celler med endret glykosyleringsmaskineri er beskrevet i teknikken og kan anvendes som vertsceller i hvilke rekombinante antistoffer uttrykkes for derved å produsere et antistoff med endret glykosylering. EP 1,176,195 av Hang et al. beskriver for eksempel en cellelinje med et funksjonelt forstyrret FUT8-gen, som koder for en fukosyltransferase, slik at antistoffer uttrykt i en slik cellelinje viser

30

35

hypofukosylering. PCT-publikasjon WO 03/035835 av Presta beskriver en variant av CHO-cellelinje, Lec13-celler, med redusert evne til å binde fukose til Asn(297)-bundne karbohydrater, hvilket også resulterer i hypofukosylering av antistoffer uttrykt i den vertscellen (se også Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733–26740). PCT-publikasjon WO 99/54342 av Umana et al. beskriver cellelinjer konstruert for å uttrykke glykoproteinmodifisering av glykosyltransferaser (f.eks. beta(1,4)-N-acetylglukosaminyltransferase III (GnTIII)) slik at antistoffer uttrykt i de konstruerte cellelinjene viser økte todelte GlcNac-strukturer som resulterer i økt ADCC-aktivitet av antistoffene (se også Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176–180).

En annen modifisering av antistoffene heri som er betraktet, er pegylering. Et antistoff kan pegyleres for eksempel for å øke antistoffets biologiske (f.eks. serum) halveringstid. For å pegylere et antistoff reageres typisk antistoffet, eller et fragment derav, med polyetylenglykol (PEG), slik som en reaktiv ester eller et aldehydderivat av PEG, under betingelser i hvilke én eller flere PEG-grupper blir bundet til antistoffet eller antistofffragmentet. Pegyleringen kan utføres ved en acyleringsreaksjon eller en alkyleringsreaksjon med et reaktivt PEG-molekyl (eller en analog reaktiv vannløselig polymer). Betegnelsen "polyetylenglykol" er som anvendt heri ment å omfatte hvilke som helst av formene av PEG som er anvendt for å derivatisere andre proteiner, slik som mono-(C1-C10)-alkoksy- eller aryloksy-polyetylenglykol eller polyetylenglykol-maleimid. I visse utførelsesformer er antistoffet som skal pegyleres, et aglykosylert antistoff. Fremgangsmåter for pegylering av proteiner er kjent i teknikken og kan anvendes på antistoffene ifølge oppfinnelsen. Se for eksempel EP 0 154 316 av Nishimura et al. og EP 0 401 384 av Ishikawa et al.

En annen modifisering av antistoffene som er betraktet, er et konjugat eller en proteinfusjon av minst den antigenbindende regionen av antistoffet ifølge oppfinnelsen til serumprotein, slik som humant serumalbumin eller et fragment derav for å øke det resulterende molekylets halveringstid. Slik tilnærming er for eksempel beskrevet i Ballance et al. EP0322094.

En annen mulighet er en fusjon av minst den antigenbindende regionen av antistoffet til proteiner i stand til å binde til serumproteiner, slik som humant serumalbumin, for å øke det resulterende molekylets halveringstid. Slik fremgangsmåte er for eksempel beskrevet i Nygren et al., EP 0 486 525.

Fremgangsmåter for konstruksjon av endrede antistoffer

- 5 Som drøftet ovenfor kan antistoffene mot sklerostin som har V_H - og V_L -sekvenser eller tung- og lettkjedesekvenser av full lengde vist heri, anvendes for å danne nye antistoffer mot sklerostin ved modifisering av tungkjede- og/eller lettkjedesekvensene av full lengde, V_H - og/eller V_L -sekvensene eller de konstante regionene bundet dertil. I et annet aspekt anvendes således det strukturelle trekket ved et antistoff mot sklerostin ifølge oppfinnelsen for å danne strukturelt
- 10 relaterte antistoffer mot sklerostin som bevarer minst én funksjonell egenskap ved antistoffene ifølge oppfinnelsen, slik som binding til humant sklerostin og også inhibering av én eller flere funksjonelle egenskaper ved sklerostin (f.eks. reseptorbinding, forebygging eller forbedring av osteolyse).
- 15 Én eller flere CDR-regioner av de beskrevne antistoffene, eller mutasjoner derav, kan for eksempel kombineres rekombinant med kjente struktureregioner og/eller andre CDR-er for å danne ytterligere rekombinant konstruerte antistoffer mot sklerostin ifølge oppfinnelsen, som drøftet ovenfor. Andre typer av modifiseringer inkluderer dem beskrevet i det forrige avsnittet.
- 20 Utgangsmaterialet for konstruksjonsfremgangsmåten er én eller flere av V_H - og/eller V_L -sekvensene tilveiebrakt heri, eller én eller flere CDR-regioner derav. For å danne det konstruerte antistoffet er det ikke nødvendig faktisk å fremstille (dvs. uttrykke som et protein) et antistoff som har én eller flere av V_H - og/eller V_L -sekvensene tilveiebrakt heri, eller én eller flere CDR-regioner derav.
- 25 Informasjonen inneholdt i sekvensen(e) anvendes i stedet som utgangsmateriale for å danne "andre generasjons" sekvens(er) avledet fra opprinnelig sekvens(er), og deretter fremstilles "andre generasjons" sekvensen(e) og uttrykkes som et protein.
- 30 I en annen utførelsesform tilveiebringer beskrivelsen følgende en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff mot sklerostin bestående av: en antistoffsekvens i tungkjedens variable region som har en CDR1-sekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 1–11, en CDR2-sekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 12–22 og/eller en CDR3-sekvens valgt fra gruppen bestående av
- 35 SEQ ID NO: 23–33; og en antistoffsekvens i lettkjedens variable region som har en CDR1-sekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 34–44, en CDR2-

5 sekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 45–55 og/eller en CDR3-sekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 56–66; endring av minst én aminosyrerest innenfor antistoffsekvensen i tungkjedens variable region og/eller antistoffsekvensen i lettkjedens variable region for å danne minst én endret antistoffsekvens; og ekspresjon av den endrede antistoffsekvensen som et protein.

10 I en annen utførelsesform tilveiebringer beskrivelsen følgende en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff mot sklerostin optimalisert for ekspresjon i en pattedyrceelle bestående av: en antistoffsekvens i tungkjeden av full lengde som har en sekvens valgt fra gruppen av SEQ ID NO: 111–121; og en antistoffsekvens i lettkjeden av full lengde som har en sekvens valgt fra gruppen av 122–132; endring av minst én aminosyrerest innenfor antistoffsekvensen i tungkjeden av full lengde og/eller antistoffsekvensen i lettkjeden av full lengde for å danne minst én endret antistoffsekvens; og ekspresjon av den endrede antistoffsekvensen som et protein.

20 Den endrede antistoffsekvensen kan også fremstilles ved screening av antistoffbiblioteker som har fikserte CDR3-sekvenser valgt blant gruppen bestående av SEQ ID NO:23–33 eller minimale vesentlige bindingsdeterminanter som beskrevet i US20050255552 og mangfold på CDR1- og CDR2-sekvenser. Screening kan utføres ifølge hvilken som helst screeningsteknologi egnet for screening av antistoffer fra antistoffbiblioteker, slik som fagvisningsteknologi.

25 Standardteknikker i molekylær biologi kan anvendes for å fremstille og uttrykke den endrede antistoffsekvensen. Antistoffet kodet av endret antistoffsekvensen(er) er ett som bevarer én av, noen av eller alle de funksjonelle egenskapene ved antistoffene mot sklerostin beskrevet heri, hvilke funksjonelle egenskaper inkluderer, men ikke er begrenset til, spesifikk binding til humant sklerostin; og antistoffet viser minst én av følgende funksjonelle egenskaper: antistoffet blokkerer den inhiberende effekten av sklerostin i et cellebasert wnt-signaleringsassay, antistoffet blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i et cellebasert mineraliseringsassay eller blokkerer inhiberende effekt av sklerostin i Smad1-fosoryleringsassay eller antistoffet inhiberer binding av sklerostin til LRP-6 eller antistoffet øker bendannelse og -masse og -densitet.

Det endrede antistoffet kan vise én eller flere, to eller flere eller tre eller flere av de funksjonelle egenskapene drøftet ovenfor.

5 De funksjonelle egenskapene ved de endrede antistoffene kan vurderes ved anvendelse av standardassay som er tilgjengelige i teknikken og/eller beskrevet heri, slik som dem anført i eksemplene (f.eks. ELISA).

10 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene for konstruksjon av antistoffer kan mutasjoner introduseres tilfeldig eller selektivt langs hele eller deler av en kodingssekvens for antistoff mot sklerostin, og de resulterende modifiserte antistoffene mot sklerostin kan screenes for bindingsaktivitet og/eller andre funksjonelle egenskaper som beskrevet heri. Mutasjonsfremgangsmåter er beskrevet i teknikken. PCT-publikasjon WO 02/092780 av Short beskriver for eksempel fremgangsmåter for opprettelse og screening av antistoffmutasjoner ved anvendelse av metningsmutagenese, syntetisk ligeringssammenstilling eller 15 en kombinasjon derav. PCT-publikasjon WO 03/074679 av Lazar et al. beskriver alternativt fremgangsmåter for anvendelse av datascreeningsfremgangsmåter for å optimalisere fysiokjemiske egenskaper ved antistoffene.

20 **Nukleinsyremolekyler som koder for antistoffer ifølge oppfinnelsen**

Et annet aspekt ved oppfinnelsen vedrører nukleinsyremolekyler som koder for antistoffet ifølge oppfinnelsen. Eksempel på parental-nukleotidsekvenser i lettkjeden av full lengde er vist i SEQ ID NO 144–145. Eksempel på parental-nukleotidsekvenser i tungkjeden av full lengde er vist i SEQ ID NO 133–134. Eksempel på nukleotidsekvenser i lettkjeden av full lengde optimalisert for ekspresjon i en pattedyr-celle er vist i SEQ ID NO: 146–154. Eksempel på nukleotidsekvenser i tungkjeden av full lengde optimalisert for ekspresjon i en pattedyr-celle er vist i SEQ ID NO: 135–143.

30 Nukleinsyrene kan være til stede i hele celler, i et cellelysatsat eller kan være nukleinsyrer i en delvis rensset eller i det vesentlige ren form. En nukleinsyre er "isolert" eller "gjort i det vesentlige ren" når den er rensset vekk fra andre cellulære komponenter eller andre kontaminanter, f.eks. andre cellulære nukleinsyrer eller proteiner ved standardteknikker, inkludert alkali/SDS-behandling, CsCl-banding, kolonnekromatografi, agarosegelelektroforese og 35

andre som er velkjent i teknikken. Se F. Ausubel, et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. En nukleinsyre ifølge oppfinnelsen kan være for eksempel DNA eller RNA og kan, men ikke nødvendigvis, inneholde introniske sekvenser. I en utførelsesform er nukleinsyren et cDNA-molekyl. Nukleinsyren kan være til stede i en vektor, slik som en fagvisningsvektor, eller i en rekombinant plasmidvektor.

Nukleinsyrene ifølge oppfinnelsen kan oppnås ved anvendelse av standardteknikker i molekylær biologi. For antistoffer som uttrykkes av hybridomer (f.eks. hybridomer fremstilt fra transgene mus som bærer humane immunglobuliner som beskrevet nærmere nedenfor), kan cDNA-er som koder for antistoffets lett- og tungkjeder fremstilt av hybridomet, oppnås ved standard PCR-amplifikasjon eller cDNA-kloningsteknikker. For antistoffer oppnådd fra et immunglobulinerbibliotek (f.eks. ved anvendelse av fagvisningsteknikker) kan nukleinsyre som koder for antistoffet, gjenvinnes fra forskjellige fagkloner som er medlemmer av biblioteket.

Når DNA-fragmenter som koder for V_H - og V_L -segmenter oppnås, kan disse DNA-fragmentene manipuleres ytterligere ved standard rekombinante DNA-teknikker, for eksempel for å konvertere de variable regionene til antistoffkjedegener av full lengde, til Fab-fragmentgener eller til et scFv-gen. I disse manipulasjonene er V_L -en eller V_H -en som koder for DNA-fragmentet, operativt bundet til et annet DNA-molekyl, eller til et fragment som koder for et annet protein, slik som et antistoffs konstante region eller en fleksibel binding. Betegnelsen "operativt bundet" er som anvendt i denne sammenhengen ment å bety at de to DNA-fragmentene er bundet på en funksjonell måte, f.eks. slik at aminosyresekvensene kodet av de to DNA-fragmentene forblir i rammen, eller slik at proteinet uttrykkes under kontroll av en ønsket promotor.

Det isolerte DNA-et som koder for V_H -regionen, kan konverteres til et tungkjedegen av full lengde ved operativt å binde V_H -en som koder for DNA-et til et annet DNA-molekyl som koder for tungkjedens konstante regioner (CH1, CH2 og CH3). Sekvensene av humane gener i tungkjedens konstante region er kjent i teknikken (se f.eks. Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utgave, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikasjon nr. 91-3242), og DNA-fragmenter omfattende disse regionene kan oppnås ved standard PCR-amplifikasjon. Tungkjedens konstante

region kan være en konstant region i IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM eller IgD. Tungkjedens konstante region er foretrukket valgt blant IgG2-isotypene. For et Fab-fragment-tungkjedegen kan V_H -en som koder for DNA-et, være operativt bundet til et annet DNA-molekyl som koder for bare den konstante regionen i tungkjedens CH1.

Det isolerte DNA-et som koder for V_L -regionen, kan konverteres til et lettkjedegen av full lengde (samt til et Fab-lettkjedegen) ved operativt å binde V_L -en som koder for DNA-et til et annet DNA-molekyl som koder for lettkjedens konstante region, CL. Sekvensene av humane gener i lettkjedens konstante region er kjent i teknikken (se for eksempel Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utgave, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikasjon nr. 91-3242), og DNA-fragmenter omfattende disse regionene kan oppnås ved standard PCR-amplifikasjon. Lettkjedens konstant region kan være en kappa- eller en lambda-konstant region.

For å danne et scFv-gen bindes V_H og V_L som koder for DNA-fragmenter, operativt til et annet fragment som koder for en fleksibel binding, f.eks. som koder for aminosyresekvensen (Gly4 -Ser)₃, slik at V_H - og V_L -sekvensene kan uttrykkes som et tilgrensende enkeltkjedet protein, med V_L - og V_H -regionene bundet av den fleksible bindingen (se for eksempel Bird et al., 1988 Science 242:423-426; Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990 Nature 348:552-554).

Generering av monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen

Monoklonale antistoffer (mAb-er) kan produseres ved en rekke teknikker, inkludert konvensjonell metode for monoklonale antistoffer, f.eks. den standard somatiske cellehybridiseringsteknikken i Kohler og Milstein, 1975 Nature 256: 495. Mange teknikker for produksjon av monoklonalt antistoff kan benyttes, f.eks. viral eller onkogen transformasjon av B-lymfocytter.

Et dyresystem for fremstilling av hybridomer er det murine systemet. Hybridomproduksjon hos mus er en veletablert prosedyre. Immuniseringsprotokoller og teknikker for isolering av immuniserte splenocytter

for fusjon er kjent i teknikken. Fusjonspartnere (f.eks. murine myelomceller) og fusjonsprosedyrer er også kjent.

Kimære eller humaniserte antistoffer kan fremstilles basert på sekvensen i et murint monoklonalt antistoff fremstilt som beskrevet ovenfor. DNA som koder for tung- og lettkjede-immunglobuliner, kan oppnås fra det murine hybridomet av interesse og konstrueres for å inneholde ikke-murine (f.eks. humane) immunglobulinsekvenser ved anvendelse av standardteknikker i molekylær biologi. For å danne et kimært antistoff kan de murine variable regionene for eksempel være bundet til humane konstante regioner ved anvendelse av fremgangsmåter som er kjent i teknikken (se for eksempel US-patentnr. 4,816,567 av Cabilly et al.). For å danne et humanisert antistoff kan de murine CDR-regionene innsettes i en human struktur ved anvendelse av fremgangsmåter som er kjent i teknikken. Se for eksempel US-patentnr. 5225539 av Winter og US-patentnr. 5530101; 5585089; 5693762 og 6180370 av Queen et al.

I en viss utførelsesform er antistoffene ifølge oppfinnelsen humane monoklonale antistoffer. Slike humane monoklonale antistoffer rettet mot sklerostin kan genereres ved anvendelse av transgene eller transkromosome mus som er bærere av deler av det humane immunsystemet i stedet for musesystemet. Disse transgene og transkromosome musene inkluderer mus betegnet heri henholdsvis HuMAb-mus og KM-mus, og betegnes sammen heri "humane Ig-mus".

HuMAb mouse[®] (Medarex, Inc.) inneholder humant immunglobulingen-miniloci som koder for ikke-rearrangerte humane tung- (μ og γ) og κ -lettkjedeimmunglobulinsekvenser, sammen med målrettede mutasjoner som inaktiverer endogene μ - og κ -kjede-loki (se for eksempel Lonberg, et al., 1994 Nature 368(6474): 856–859). Musene viser følgelig redusert ekspresjon av murint IgM eller κ , og som respons på immunisering gjennomgår de introduserte humane transgenene i tung- og lettkjeden klassebytte og somatisk mutasjon for å generere humant monoklonalt IgG κ med høy affinitet (Lonberg, N. *et al.*, 1994 *ovenfor*; gjennomgått i Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49–101; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol.13: 65–93, og Harding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536–546). Fremstillingen og anvendelsen av HuMAb-mus, og de genomiske

modifiseringene båret av slike mus, er beskrevet nærmere i Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; og Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851. Se også US-patentnr. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; og 5,770,429; alle av Lonberg og Kay; US-patentnr. 5,545,807 av Surani et al.; PCT-publikasjonsnr. WO 92/103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/113852, WO 98/24884 og WO 99/45962, alle av Lonberg og Kay; og PCT-publikasjonsnr. WO 01/14424 av Korman et al.

I en annen utførelsesform kan humane antistoffer ifølge oppfinnelsen dyrkes ved anvendelse av en mus som er bærer av humane immunglobulinsekvenser på transgener og transkromosomer slik som en mus som er bærer av et menneskes tungkjedetransgen og et menneskes lettkjedetranskromosom. Slike mus, heri betegnet "KM-mus", er nærmere beskrevet i PCT-publikasjon WO 02/43478 av Ishida et al.

Alternative transgene dyresystemer som uttrykker humane immunglobulingener, er enda videre tilgjengelige i teknikken og kan anvendes for å dyrke antistoffer mot sklerostin ifølge oppfinnelsen. Et alternativt transgent system betegnet Xenomouse (Abgenix, Inc.) kan for eksempel anvendes. Slike mus er beskrevet i for eksempel US-patentnr. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 og 6,162,963 av Kucherlapati et al.

Alternative transkromosomiske dyresystemer som uttrykker humane immunglobulingener, er dessuten tilgjengelige i teknikken og kan anvendes for å dyrke antistoffer mot sklerostin ifølge oppfinnelsen. Det kan for eksempel anvendes mus som er bærer av både et humant tungkjedetranskromosom og et humant lettkjedetranskromosom, betegnet "TC-mus"; slike mus er beskrevet i Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Kyr som bærer humane tung- og lettkjedetranskromosomer, er videre beskrevet i teknikken (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894) og kan anvendes for å dyrke antistoffer mot sklerostin ifølge oppfinnelsen.

Humane monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen kan også fremstilles ved anvendelse av fagvisningsfremgangsmåter for screeningbiblioteker av humane immunglobuliner. Slike fagvisningsfremgangsmåter for isolering av humane antistoffer er etablert i teknikken eller beskrevet i eksemplene nedenfor. Se for eksempel: US-patentnr. 5,223,409; 5,403,484; og 5,571,698 av Ladner et al.; US-patentnr. 5,427,908 og 5,580,717 av Dower et al.; US-patentnr. 5,969,108 og 6,172,197 av McCafferty et al.; og US-patentnr. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 og 6,593,081 av Griffiths et al.

Humane monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen kan også fremstilles ved anvendelse av SCID-mus hvori humane immunceller rekonstitueres slik at en human antistoffrespons kan genereres ved immunisering. Slike mus beskrives i for eksempel US-patentnr. 5,476,996 og 5,698,767 av Wilson et al.

Generering av hybridomer som produserer humane monoklonale antistoffer

For å generere hybridomer som produserer humane monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen, kan splenocytter og/eller lymfeknuteceller fra immuniserte mus isoleres og fusjoneres til en egnet udødeliggjort cellelinje, slik som en murin myelomcellelinje. De resulterende hybridomene kan screenes for produksjon av antigenspesifikke antistoffer. Enkelte celsuspensjoner av lymfocytter i milt fra immuniserte mus kan for eksempel fusjoneres til én sjettedel av antallet av P3X63-Ag8.653 ikke-utskillende murine myelomceller (ATCC, CRL 1580) med 50 % PEG. Celler plasseres ved ca. 2 x 145 i flatbunnede mikrotiterplater, etterfulgt av en to ukers inkubering i selektivt medium inneholdende 20 % klonfosterserum, 18 % "653" kondisjonert medium, 5 % origen (IGEN), 4 mM L-glutamin, 1 mM natriumpyruvat, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-merkaptoetanol, 50 enheter/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 50 mg/ml gentamycin og 1X HAT (Sigma; HAT tilsettes 24 timer etter fusjonen). Etter ca. to uker kan celler dyrkes i medium i hvilket HAT er erstattet med HT. Individuelle brønner kan deretter screenes ved ELISA for humane monoklonale IgM- og IgG-antistoffer. Når omfattende hybridomvekst forekommer, kan medium vanligvis observeres etter 10–14 dager. De antistoffutskillende hybridomene kan plasseres på nytt og screenes igjen, og hvis de monoklonale antistoffene fremdeles er positive for humant IgG, kan de subklones minst to ganger ved begrensende fortykning. De

stabile subklonene kan deretter dyrkes *in vitro* for å generere små mengder av antistoff i vevskulturmedium for karakterisering.

5 For å rense humane monoklonale antistoffer kan valgte hybridomer dyrkes i to-liters spinnerkolber for monoklonal antistoffrensing. Supernatanter kan filtreres og konsentreres før affinitetskromatografi med protein A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Eluert IgG kan kontrolleres ved gelelektroforese og høytytelsesvæskeskromatografi for å sikre renhet. Bufferløsningen kan byttes til PBS, og konsentrasjonen kan bestemmes ved OD₂₈₀ ved anvendelse av 1,43
10 ekstinksjonskoeffisient. De monoklonale antistoffene kan alikvoterer og oppbevares ved -80 °C.

Generering av transfektomer som produserer monoklonale antistoffer

15 Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan også produseres i et vertscelletransfektom ved anvendelse av for eksempel en kombinasjon av rekombinante DNA-teknikker og gentransfeksjonsfremgangsmåter som er velkjent i teknikken (f.eks. Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

20 For å uttrykke antistoffene, eller antistofffragmenter derav, kan DNA-er som koder for partielle lett- og tungkjeder eller lett- og tungkjeder av full lengde, for eksempel oppnås ved standardteknikker i molekylær biologi (f.eks. PCR-amplifikasjon eller cDNA-kloning ved anvendelse av et hybridom som uttrykker antistoffet av interesse), og DNA-ene kan innsettes i ekspresjonsvektorer slik at
25 genene er operativt bundet til transkripsjonale og translasjonale kontrollsekvenser. Betegnelsen "operativt bundet" er i denne sammenhengen ment å bety at et antistoffgen ligger i en vektor slik at transkripsjonale og translasjonale kontrollsekvenser i vektoren tjener deres tiltenkte funksjon for regulering av transkripsjon og translasjon av antistoffgenet.
30 Ekspresjonsvektoren og ekspresjonskontrollsekvensene er valgt å være kompatible med den anvendte ekspresjonsvertscellen. Antistoffets lettkjedegen og antistoffets tungkjedegen kan være innsatt i separat vektor, eller mer typisk innsettes begge gener i samme ekspresjonsvektor. Antistoffgenene innsettes i ekspresjonsvektoren ved standard fremgangsmåter (f.eks. ligering av
35 komplementære restriksjonssteder på antistoffgenfragmentet og vektoren, eller stump endelivering hvis ingen restriksjonssteder er til stede). Lett- og

tungkjedens variable regioner i antistoffene beskrevet heri kan anvendes for å danne antistoffgener av full lengde av hvilken som helst antistoffisotype ved å innsette dem i ekspresjonsvektorer som allerede koder for tung- og lettkjedens konstante regioner av den ønskede isotypen, slik at V_H -segmentet er operativt bundet til CH-segmentene i vektoren og V_L -segmentet er operativt bundet til CL-segmentet i vektoren. Den rekombinante ekspresjonsvektoren kan i tillegg eller alternativt kode for et signalpeptid som letter sekresjon av antistoffkjeden fra en vertscelle. Antistoffkjedegenet kan være klonet i vektoren slik at signalpeptidet bindes i rammen til antistoffkjedegenets aminoterminal. Signalpeptidet kan være et immunglobulinsignalpeptid eller et heterologt signalpeptid (dvs. et signalpeptid fra et ikke-immunglobulinprotein).

I tillegg til antistoffkjedegenene bærer de rekombinante ekspresjonsvektorene ifølge oppfinnelsen regulerende sekvenser som kontrollerer ekspresjonen av antistoffkjedegenene i en vertscelle. Betegnelsen "regulerende sekvens" er beregnet på å inkludere promotere, enhancere og andre ekspresjonsreguleringslementer (f.eks. polyadenylasjonssignaler) som regulerer transkripsjonen eller translasjonen av antistoffkjedegenene. Slike regulerende sekvenser er for eksempel beskrevet i Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Fagmannen vil forstå at utformingen av ekspresjonsvektoren, inkludert seleksjonen av regulerende sekvenser, kan avhenge av slike faktorer som valget av vertscellen som skal transformeres, ønsket ekspresjonsnivå osv. Regulerende sekvenser for mammalsk vertscelleekspresjon inkluderer virale elementer som styrer høye nivåer av proteinekspresjon i pattedyrceller, slik som promotere og/eller enhancere avledet fra cytomegalovirus (CMV), simianvirus 40 (SV40), adenovirus (f.eks. AdMLP (adenovirus major late promoter)) og polyoma. Ikke-virale regulerende sekvenser kan alternativt anvendes, slik som ubiquitinpromoteren eller P-globinpromoteren. Regulerende elementer sammensatt av sekvenser fra forskjellige kilder, slik som SRa-promotersystemet, som enda videre inneholder sekvenser fra den tidlige SV40-promoteren og den lange terminale repetisjonen av humant T-celleleukemivirus type 1 (Takebe, Y. et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

I tillegg til antistoffkjedegenene og de regulerende sekvensene kan de rekombinante ekspresjonsvektorene ifølge oppfinnelsen bære ytterligere sekvenser, slik som sekvenser som regulerer replikasjon av vektoren i

vertscellene (f.eks. replikasjonsoriginer) og valgbare markørgener. Det valgbare markørgenet letter seleksjon av vertsceller hvori vektoren er introdusert (se for eksempel US- patentnr. 4,399,216, 4,634,665 og 5,179,017, alle av Axel *et al.*). Typisk gir det valgbare markørgenet resistens overfor for eksempel legemiddel,

5 slik som G418, hygromycin eller metotreksat, på en vertscelle hvori vektoren er blitt introdusert. Valgbare markørgener inkluderer dihydrofolatreduktase (DHFR)-genet (for anvendelse i dhfr- vertsceller med metotreksatseleksjon/-amplifikasjon) og neogenet (for G418-seleksjon).

10 For ekspresjon av lett- og tungkjedene tranfekteres ekspresjonsvektorene som koder for tung- og lettkjedene i en vertscelle ved standardteknikker. De forskjellige formene av betegnelsen "transfeksjon" er å ment å omfatte en lang rekke teknikker vanligvis anvendt for introduksjon av eksogent DNA i en prokaryotisk eller eukaryotisk vertscelle, f.eks. elektroporering,

15 kalsiumfosfatutfelling, DEAE-dekstrantransfeksjon og lignende. Det er teoretisk mulig å uttrykke antistoffene ifølge oppfinnelsen i enten prokaryotiske eller eukaryotiske vertsceller. Ekspresjon av antistoffer i eukaryotiske celler, særlig mammalske vertsceller, drøftes siden slike eukaryotiske celler, og særlig pattedyrceller, er mer sannsynlige enn prokaryotiske celler for å sammenstille og

20 utskille et riktig foldet og immunologisk aktivt antistoff. Prokaryotisk ekspresjon av antistoffgener er rapportert å være ineffektivt for produksjon av høyt utbytte av aktivt antistoff (Boss, M. A. and Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13).

25 Mammalske vertsceller for ekspresjon av de rekombinante antistoffene ifølge oppfinnelsen inkluderer eggstokkcelle fra kinesisk hamster (CHO-celler) (inkludert dhfr-CHO-celler, beskrevet i Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 anvendt med en DH FR-valgbar markør, f.eks. som beskrevet i R.J. Kaufman and P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621, NSO-

30 myelomceller, COS-celler og SP2-celler. For anvendelse med NSO-myelomceller er et annet ekspresjonssystem særlig GS-genekspresjonssystemet vist i WO 87/04462, WO 89/01036 og EP 338,841. Når rekombinante ekspresjonsvektorer som koder for antistoffgener, introduseres inn i pattedyrvertsceller, produseres antistoffene ved dyrking av vertscellene i en tilstrekkelig periode til å gi mulighet

35 for ekspresjon av antistoffet i vertscellene eller sekresjon av antistoffet i kulturmediet hvor vertscellene dyrkes. Antistoffer kan gjenvinnes fra kulturmediet ved anvendelse av standard proteinrensingsfremgangsmåter.

Bispesifikke molekyler

I et annet aspekt inneholder den foreliggende beskrivelsen bispesifikke eller multispesifikke molekyler omfattende et antistoff mot sklerostin, eller et fragment derav, ifølge oppfinnelsen. Et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller antigenbindende regioner derav, kan være avledet fra eller bundet til et annet funksjonelt molekyl, f.eks. et annet peptid eller protein (f.eks. et annet antistoff eller en ligand for en reseptor) for å generere et bispesifikt molekyl som binder til minst to forskjellige bindingssteder eller målmolekyler. Antistoffet ifølge oppfinnelsen kan faktisk være avledet fra eller bundet til mer enn ett annet funksjonelt molekyl for å generere multispesifikke molekyler som binder til mer enn to forskjellige bindingssteder og/eller målmolekyler; slike multispesifikke molekyler er også ment å være omfattet av betegnelsen "bispesifikt molekyl" som anvendt heri. For å danne et bispesifikt molekyl kan et antistoff ifølge oppfinnelsen være funksjonelt bundet (f.eks. ved kjemisk binding, genetisk fusjon, ikke-kovalent forbindelse eller på annen måte) til ett eller flere andre bindingsmolekyler, slik som et annet antistoff, antistofffragment, peptid eller bindingsmimetikum, slik at et bispesifikt molekyl blir resultatet.

Den foreliggende beskrivelsen inkluderer følgelig bispesifikke molekyler omfattende minst én første bindingsspesifisitet for sklerostin og en andre bindingsspesifisitet for en andre målepitop. Den andre målepitopen er for eksempel en annen sklerostinepitop som er forskjellig fra den første målepitopen. Et annet eksempel er et bispesifikt molekyl omfattende minst én første bindingsspesifisitet for sklerostin og en andre bindingsspesifisitet for en epitop i Dkk-1. Et annet eksempel er et bispesifikt molekyl omfattende minst én første bindingsspesifisitet for sklerostin og en andre bindingsspesifisitet for en epitop i LRP4.

For beskrivelsen i hvilken det bispesifikke molekylet er multispesifikt kan molekylet i tillegg videre inkludere en tredje bindingsspesifisitet, i tillegg til den først og andre målepitopen.

I én utførelsesform omfatter de bispesifikke molekylerne som en bindingsspesifisitet minst ett antistoff, eller et antistofffragment derav, inkludert

for eksempel en Fab, Fab', F(ab')₂, Fv eller en enkeltkjedet Fv. Antistoffet kan også være en lettkjede- eller tungkjede-dimer, eller hvilket som helst minimalt fragment derav, slik som en Fv eller en enkeltkjedet konstruksjon som beskrevet i Ladner et al. US-patentnr. 4,946,778.

5

Andre antistoffer som kan benyttes i slike bispesifikke molekyler, er murine, kimære og humaniserte monoklonale antistoffer.

10

Bispesifikke molekyler kan fremstilles ved konjugering av komponentens bindingsspesifisiteter, ved anvendelse av fremgangsmåter som er kjent i teknikken. Hver bindingsspesifisitet for det bispesifikke molekylet kan for eksempel genereres separat og deretter konjugeres til den andre. Når bindingsspesifisitetene er proteiner eller peptider, kan en rekke bindings- eller kryssbindingsmiddel anvendes for kovalent konjugering. Eksempel på kryssbindingsmiddel inkluderer protein A, karbodiimid, N-sukkinimidyl-S-acetyl-
tioacetat (SATA), 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesyre) (DTNB), o-fenylendimaleimid (oPDM), N-sukkinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP) og sulfosukkinimidyl 4-(N-maleimidometyl)syklohaksan-I-karboksylat (sulfo-SMCC) (se for eksempel Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Andre fremgangsmåter inkluderer dem beskrevet i Paulus, 1985 Behring Ins, Mitt. nr. 78,118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83, og Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375. Konjugeringsmiddel er SATA og sulfo-SMCC, begge tilgjengelig fra Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

25

Når bindingsspesifisitetene er antistoffer, kan de konjugeres ved sulfhydrylbinding av de C-terminale hengselregionene i de to tungkjedene. I en særlig utførelsesform modifiseres hengselregionen til å inneholde et ulikt antall av sulfhydrylrester, f.eks én, før konjugering.

30

Begge bindingsspesifisitetene kan alternativt være kodet i samme vektor og uttrykt og sammenstilt i samme vertscelle. Denne fremgangsmåten er særlig nyttig hvor det bispesifikke molekylet er et mAb x mAb-, mAb x Fab-, Fab x F(ab')₂- eller ligand x Fab-fusjonsprotein. Et bispesifikt molekyl kan være et enkeltkjedet molekyl omfattende ett enkeltkjedet antistoff og en bindingsdeterminant, eller et enkeltkjedet bispesifikt molekyl omfattende to bindingsdeterminanter. Bispesifikke molekyler kan omfatte minst to

35

enkeltkjedede molekyler. Fremgangsmåter for fremstilling av bispesifikke molekyler er for eksempel beskrevet i US-patentnummer 5,260,203; US-patentnummer 5,455,030; US-patentnummer 4,881,175; US-patentnummer 5,132,405; US-patentnummer 5,091,513; US-patentnummer 5,476,786; US-patentnummer 5,013,653; US-patentnummer 5,258,498; og US-patentnummer 5,482,858.

Binding av de bispesifikke molekylene til deres spesifikke mål kan bekreftes ved for eksempel enzyumbundet immunsorbentassay (ELISA), radioimmunassay (REA), FACS-analyse, bioassay (f.eks. vekstinhibering) eller Western blot-assay. Hvert av disse assayene detekterer generelt nærværet av protein-antistoff-komplekser av særlig interesse ved benyttelse av et merket reagens (f.eks. et antistoff) spesifikt for komplekset av interesse.

Multivalente antistoffer

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende beskrivelsen multivalente forbindelser omfattende minst to identiske eller forskjellige antigenbindende porsjoner av antistoffene ifølge oppfinnelsen som binder til sklerostin. I og med den trimere arten av sklerostin tilveiebringer slike forbindelser foretrukket minst tre eller fire antigenbindende porsjoner av antistoffet. De antigenbindende porsjonene kan sammenbindes via proteinfusjon eller kovalent eller ikke-kovalent binding. Fremgangsmåter for binding er alternativt beskrevet for de bispesifikke molekylene. Tetraivalente forbindelser kan oppnås for eksempel ved kryssbinding av antistoffer fra antistoffene ifølge oppfinnelsen med et antistoff som binder til de konstante regionene av antistoffene ifølge oppfinnelsen, f.eks. Fc- eller hengselregionen.

Trimeriseringsdomene er for eksempel beskrevet i Borean patent EP 1 012 280B1. Pentameriseringsmoduler er for eksempel beskrevet i PCT/EP97/05897 (WO98/18943).

Farmasøytiske sammensetninger

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en sammensetning, f.eks. en farmasøytisk sammensetning, inneholdende ett eller en kombinasjon av monoklonale antistoffer, eller antigenbindende regioner derav, ifølge den foreliggende oppfinnelsen, formulert sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer. Slike sammensetninger kan inkludere ett eller en kombinasjon av (f.eks. to eller flere forskjellige) antistoffer, eller immunkonjugater eller bispesifikke molekyler ifølge oppfinnelsen. En farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen kan for eksempel omfatte en kombinasjon av antistoffer som binder til forskjellige epitoper på målantigenet, eller som har komplementære aktiviteter.

Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen også kan administreres i kombinasjonsbehandling, dvs. kombinert med andre middel. Kombinasjonsbehandlingen kan for eksempel inkludere et antistoff mot sklerostin ifølge den foreliggende oppfinnelsen kombinert med minst ett annet antiflogistikum eller antiosteoporotikum. Eksempel på terapeutiske middel som kan anvendes i kombinasjonsbehandling beskrives nærmere nedenfor i avsnittet om anvendelser av antistoffene ifølge oppfinnelsen. Sammensetningene er foretrukket formulert ved fysiologisk pH.

"Farmasøytisk akseptabel bærer" inkluderer som anvendt heri hvilket som helst løsemiddel, dispersjonsmedium, overtrekk, antibakterielt og antifungalt middel, isotonisk og absorpsjonsforsinkende middel og lignende som er fysiologisk kompatible. Bæreren bør være egnet til intravenøs, intramuskulær, subkutan, parenteral, spinal eller epidermal administrering (f.eks. ved injeksjon eller infusjon). Avhengig av administreringsveien kan den aktive forbindelse, dvs. antistoffet, immunkonjugatet eller det bispesifikke molekylet, overtrekkes i et materiale for å beskytte forbindelsen fra påvirkning av syrer og andre naturlige betingelser som kan inaktivere forbindelsen.

De farmasøytiske forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan inkludere ett eller flere farmasøytisk akseptable salter. Et "farmasøytisk akseptabelt salt" betyr et salt som bevarer den parentale forbindelsens ønskede biologiske aktivitet og ikke overfører eventuelle uønskede toksikologiske effekter (se for eksempel Berge, S.M., et al., 1977 J. Pharm. Sci. 66:1–19). Eksempel på slike salter inkluderer syreaddisjonssalter og baseaddisjonssalter. Syreaddisjonssalter inkluderer dem avledet fra ikke-toksiske uorganiske syrer, slik som saltsyre, salpetersyre,

- fosforsyrer, svovelsyrer, hydrobromsyre, hydrojodsyre, fosfor og lignende, samt fra ikke-toksiske organiske syrer slik som alifatiske mono- og dikarboksylder, fenylsubstituerte alkanoiske syrer, hydroksyalkanoiske syrer, aromatiske syrer, alifatiske og aromatiske sulfonsyrer og lignende.
- 5 Baseaddisjonssalter inkluderer dem avledet fra jordalkalimetaller, slik som natrium, kalium, magnesium, kalsium og lignende, samt fra ikke-toksiske organiske aminer, slik som N,N'-dibenzyletylendiamin, N-metylglukamin, klorprokain, kolin, dietanolamin, etyldiamin og prokain.
- 10 En farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen kan også inkludere en farmasøytisk akseptabel antioksidant. Eksempel på farmasøytisk akseptable antioksidanter inkluderer: vannløselige antioksidanter, slik som askorbinsyre, cysteinhydroklorid, natriumbisulfat, natriummetabisulfitt, natriumsulfitt og lignende; oljeløselige antioksidanter, slik som askorbylpalmitat, butylert
- 15 hydroksyanisol (BHA), butylert hydroksytoluen (BHT), lecitin, propylgallat, alfa-tokoferol og lignende; og metallkelaterende middel, slik som sitronsyre, etyldiamintetraeddiksyre (EDTA), sorbitol, vinsyre og fosforsyre.
- Eksempel på egnede vandige og ikke-vandige bærere som kan benyttes i de
- 20 farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen, inkluderer vann, etanol, polyoler (slik som glyserol, propylenglykol, polyetylen glykol og lignende) og egnede blandinger derav, vegetabiliske oljer, slik som olivenolje, og injiserbare organiske estere, slik som etyloleat. Riktig fluiditet kan for eksempel opprettholdes ved anvendelse av overtrekkingsmaterialer, slik som lecitin, ved
- 25 opprettholdelse av den nødvendige partikkelstørrelsen ved dispersjoner og ved anvendelse av surfaktanter.
- Disse sammensetningene kan også inneholde adjuvanter slik som konserveringsmiddel, fuktemiddel, emulgeringsmiddel og dispersjonsmiddel.
- 30 Forebygging av nærvær av mikroorganismer kan sikres både ved steriliseringsprosedyrer, ovenfor, og ved inklusjon av forskjellige antibakterielle og antifungale middel, f.eks. paraben, klorbutanol, fenolsorbinsyre. Det kan også være ønskelig å inkludere isotoniske middel, slik som sukkerarter, natriumklorid og lignende, i sammensetningene. Forlenget absorpsjon av den injiserbare
- 35 farmasøytiske formen kan i tillegg tilveiebringes ved inklusjon av middel som forsinket absorpsjon, slik som aluminiummonostearat og gelatin.

- 5 Farmasøytisk akseptable bærere inkluderer sterile vandige løsninger eller dispersjoner og sterile pulvere for den provisoriske fremstillingen av sterile injiserbare løsninger eller dispersjon. Anvendelsen av slikt medium og slike middel for farmasøytisk aktive stoffer er kjent i teknikken. Unntatt så lenge et konvensjonelt medium eller middel er inkompatibelt med den aktive forbindelsen, betraktes anvendelse derav i de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen. Supplerende aktive forbindelser kan også inkorporeres i sammensetningene.
- 10 Terapeutiske sammensetninger må typisk være sterile og stabile under betingelsene for produksjon og oppbevaring. Sammensetningen kan formuleres som en løsning, mikroemulsjon, liposom eller annen ordnet struktur egnet til høy legemiddelkonsentrasjon. Bæreren kan være et løsemiddel eller dispersjonsmedium inneholdende for eksempel vann, etanol, polyol (f.eks.
- 15 glyserol, propylenglykol og flytende polyetylglykol) og egnede blandinger derav. Riktig fluiditet kan for eksempel opprettholdes ved anvendelse av et overtrekk, slik som lecitin, ved opprettholdelse av den nødvendige partikkelstørrelsen ved dispersjon og ved anvendelse av surfaktant. I mange tilfeller er det mulig å inkludere isotoniske middel, f.eks. sukkerarter,
- 20 polyalkoholer slik som mannitol, sorbitol eller natriumklorid, i sammensetningen. Forlenget absorpsjon av de injiserbare sammensetningene kan tilveiebringes ved å inkludere i sammensetningen et middel som forsinket absorpsjon, f.eks. monostearatsalter og gelatin.
- 25 Sterile injiserbare løsninger kan fremstilles ved inkorporering av den aktive forbindelsen i nødvendig mengde i et egnet løsemiddel med én eller en kombinasjon av ingredienser nevnt ovenfor etter behov, etterfulgt av steriliseringsmikrofiltrering. Dispersjoner fremstilles generelt ved inkorporering av den aktive forbindelsen i en steril vehikkel som inneholder et basisk
- 30 dispersjonsmedium og de nødvendige andre ingrediensene fra dem nevnt ovenfor. Ved sterile pulvere for fremstilling av sterile injiserbare løsninger er fremgangsmåtene for fremstilling vakuumtørking og frysetørking (lyofilisering) som gir et pulver av den aktive ingrediensen pluss eventuell ytterligere ønsket ingrediens fra en tidligere sterilfiltrert løsning derav.
- 35 Mengden av aktiv ingrediens som kan kombineres med et bærermateriale for å produsere en enkelt doseringsform, vil variere avhengig av individet som

behandles, og den særlige administreringsmåten. Mengden av aktiv ingrediens som kan kombineres med et bærermateriale for å produsere en enkelt doseringsform, vil generelt være den mengden av sammensetningen som produserer en terapeutisk effekt. Av hundre prosent vil generelt denne mengden være i området fra ca. 0,01 prosent til ca. 99 prosent av aktiv ingrediens, fra ca. 0,1 prosent til ca. 70 prosent eller fra ca. 1 prosent til ca. 30 prosent av aktiv ingrediens i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer.

Doseringsregimene justeres for å tilveiebringe optimal ønsket respons (f.eks. en terapeutisk respons). En enkelt bolus kan for eksempel administreres, flere delte doser kan administreres over tid, eller dosen kan reduseres eller økes proporsjonalt etter behov i henhold til den terapeutiske situasjonen. Det er spesielt fordelaktig å danne parenterale sammensetninger i doseringsenhetsform for å lette administrering og doseringsensartethet. Doseringsenhetsform betyr som anvendt heri fysisk adskilte enheter som er egnet som enhetsdoser for individene som skal behandles; hver enhet inneholder en forhåndsbestemt kvantitet av aktiv forbindelse beregnet for å produsere den ønskede terapeutiske effekten i forbindelse med den nødvendige farmasøytiske bæreren. Beskrivelsen for doseringsenhetsformer ifølge oppfinnelsen er styrt og direkte avhengig av de unike karakteristikkene ved den aktive forbindelsen og den særlige terapeutiske effekten som skal oppnås, og begrensningene som finnes i teknikken for tilknytning av en slik aktiv forbindelse for behandling av sensitivitet hos individer.

For administrering av antistoffet er doseringen fra ca. 0,0001 til 100 mg/kg, og vanligere 0,01 til 5 mg/kg, av vertens kroppsvekt. Doseringer kan for eksempel være 0,3 mg/kg kroppsvekt, 1 mg/kg kroppsvekt, 3 mg/kg kroppsvekt, 5 mg/kg kroppsvekt eller 10 mg/kg kroppsvekt eller innenfor området av 1–10 mg/kg. Ett eksempel på behandlingsregime omfatter administrering én gang per uke, én gang annenhver uke, én gang hver tredje uke, én gang hver fjerde uke, én gang hver måned, én gang hver 3. måned eller én gang hver 3. til 6. måned. Doseringsregimer for et antistoff mot sklerostin ifølge oppfinnelsen inkluderer 1 mg/kg kroppsvekt eller 3 mg/kg kroppsvekt ved intravenøs administrering, idet antistoffet bestemmes ved anvendelse av ett av følgende doseringsskjema: hver fjerde uke med seks doseringer, deretter hver tredje måned; hver tredje uke; 3 mg/kg kroppsvekt én gang etterfulgt av 1 mg/kg kroppsvekt hver tredje uke.

I noen fremgangsmåter administreres to eller flere monoklonale antistoffer med forskjellige bindingsspesifisiteter samtidig eller suksessivt, i hvilket tilfelle doseringen av hvert administrert antistoff faller innenfor de indikerte områdene.

5 Antistoff administreres vanligvis flere ganger. Intervaller mellom enkelte doseringer kan være for eksempel ukentlig, månedlig, hver tredje måned eller årlig. Intervaller kan også være uregelmessige som indikert ved måling av blodnivåer av antistoff mot målantigenet hos pasienten. I noen fremgangsmåter justeres doseringen for å oppnå en plasmaantistoffkonsentrasjon på ca. 1–
10 1000 µg/ml og i noen fremgangsmåter ca. 25–300 µg/ml.

Antistoff kan alternativt administreres som en formulering for vedvarende frisetting, i hvilket tilfelle mindre hyppig administrering kreves. Dosering og frekvens varierer avhengig av antistoffets halveringstid hos pasienten. Humane
15 antistoffer viser generelt den lengste halveringstiden, etterfulgt av humaniserte antistoffer, kimære antistoffer og ikke-humane antistoffer. Administreringsdoseringen og -frekvensen kan variere avhengig av hvorvidt behandlingen er profylaktisk eller terapeutisk. I profylaktiske anvendelser administreres en relativt lav dosering ved relativt sjeldne intervaller over en lang
20 tidsperiode. Noen pasienter fortsetter å motta behandling resten av livet. I terapeutiske anvendelser er en relativt høy dosering ved relativt korte intervaller tidvis nødvendig inntil progresjon av sykdommen reduseres eller avsluttes, eller inntil pasienten viser partiell eller komplett forbedring av sykdomssymptomene. Pasienten kan deretter få administrert et profylaktisk regime.

25 Faktiske doseringsnivåer av de aktive ingrediensene i de farmasøytiske sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan varieres for å oppnå en mengde av den aktive ingrediensen som er virkningsfull for å oppnå den ønskede terapeutiske responsen for en særlig pasient, sammensetning og
30 administreringsmåte, uten å være toksisk for pasienten. Det valgte doseringsnivået vil avhenge av en rekke farmakokinetiske faktorer, inkludert aktiviteten av de særlige sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen som benyttes, eller esteren, saltet eller amidet derav, administreringsveien, administreringstiden, utskillelsesraten for den særlige
35 forbindelse som benyttes, behandlingsvarigheten, andre legemiddel, forbindelser og/eller materialer anvendt i kombinasjon med de særlige sammensetningene som benyttes, alder, kjønn, vekt, tilstand, allmennhelse og

tidligere medisinske historie hos pasienten som behandles, og lignende faktorer som er velkjent i teknikken.

5 En "terapeutisk virkningsfull dosering" av et antistoff mot sklerostin ifølge oppfinnelsen kan resultere i en reduksjon i alvorlighetsgraden av sykdomssymptomene, en økning i frekvens og varighet av sykdomssymptomfrie perioder eller en forebygging av svekkelse eller uførhet på grunn av sykdommen.

10 En sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan administreres ved én eller flere administreringsveier ved anvendelse av én eller flere av en rekke fremgangsmåter som er kjent i teknikken. Fagmannen vil forstå at administreringsmåten og/eller -veien vil variere avhengig av de ønskede resultatene. Administreringsveier for antistoffer ifølge oppfinnelsen inkluderer
 15 intravenøse, intramuskulære, intradermale, intraperitoneale, subkutane, spinale eller andre parenterale administreringsveier, f.eks. ved injeksjon eller infusjon. Betegnelsen "parenteral administrering" betyr som anvendt heri andre administreringsmåter enn enteral og topisk administrering, vanligvis ved injeksjon, og inkluderer, uten begrensning, intravenøs, intramuskulær,
 20 intraarterial, intratekal, intrakapsulær, intraorbital, intrakardial, intradermal, intraperitoneal, transtrakeal, subkutan, subkutikulær, intraartikulær, subkapsulær, subaraknoid, intraspinal, epidural og intrastemal injeksjon og infusjon.

25 Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan alternativt administreres ved en ikke-parenteral vei, slik som en topisk, epidermal eller mukosal administreringsvei, f.eks. intranasalt, oralt, vaginalt, rektalt, sublingvalt eller topisk.

30 De aktive forbindelsene kan fremstilles med bærere som vil beskytte forbindelsen mot hurtig frisetting, slik som en formulering med kontrollert frisetting, inkludert implantater, transdermale patcher og mikroinnkapslede administreringssystemer. Det kan anvendes biologisk nedbrytbare, biokompatible polymerer, slik som etylenvinylacetat, polyanhydrid, polyglykolsyre, kollagen, polyortoestere og polymelkesyre. Mange
 35 fremgangsmåter for fremstilling av slik formuleringer er patentert eller generelt kjent for fagmannen. Se for eksempel Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Terapeutiske sammensetninger kan administreres med medisinsk innretninger som er kjent i teknikken. I én utførelsesform kan for eksempel en terapeutisk sammensetning ifølge oppfinnelsen administreres med en nåleløs hypodermisk injeksjonsinnretning, slik som innretningene vist i US-patentnr. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 eller 4,596,556. Eksempel på velkjente implantater og moduler som er nyttige i den foreliggende oppfinnelsen, inkluderer: US-patentnr. 4,487,603, som viser en implanterbar mikroinfusjonspumpe for administrering av medikament ved en kontrollert rate; US-patentnr. 4,486,194, som viser en terapeutisk innretning for administrering av medikamenter gjennom huden; US-patentnr. 4,447,233, som viser en medikamentinfusjonspumpe for administrering av medikament ved en presis infusionsrate; US-patentnr. 4,447,224, som viser en implanterbar infusjonsanordning med variabel strømming for kontinuerlig legemiddeladministrering; US-patentnr. 4,439,196, som viser et osmotisk legemiddeladministreringssystem som har multikammerkompartmenter; og US-patentnr. 4,475,196, som viser et osmotisk legemiddeladministreringssystem. Mange andre slike implantater, administreringssystemer og moduler er kjent for fagmannen.

I visse utførelsesformer kan de humane monoklonale antistoffene ifølge oppfinnelsen formuleres for å sikre riktig fordeling *in vivo*. Blod-hjerne-barrieren (BBB) ekskluderer for eksempel mange svært hydrofile forbindelser. For å sikre at de terapeutiske forbindelsene ifølge oppfinnelsen krysser BBB (om ønsket), kan de formuleres for eksempel i liposomer. Fremgangsmåter for produksjon av liposomer er for eksempel beskrevet i US-patentnr. 4,522,811; 5,374,548; og 5,399,331. Liposomene kan omfatte én eller flere enheter som er selektivt transportert i spesifikke celler eller organer, hvilket således forbedrer målrettet legemiddeladministrering (se f.eks. V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). Eksempel på målrettende enheter inkluderer folat eller biotin (se f.eks. US-patentnr. 5,416,016 av Low et al.); mannosider (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); antistoffer (P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemoth. 39:180); surfaktantprotein A-reseptor (Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 269:1233-1234); s. 120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); se også K. Keinänen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Anvendelser og fremgangsmåter for oppfinnelsen

Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen har diagnostiske og terapeutiske formål *in vitro* og *in vivo*. Disse molekylene kan for eksempel administreres til celler i kultur, f.eks. *in vitro* eller *in vivo*, eller hos et individ, f.eks. *in vivo*, for å behandle, forebygge eller diagnostisere en rekke lidelser. Betegnelsen "individ" skal som anvendt heri inkludere humane og ikke-humane dyr. Ikke-humane dyr inkluderer alle virveldyr, f.eks. pattedyr og ikke-pattedyr, slik som ikke-humane primater, sauer, hunder, katter, kyr, hester, kyllinger, amfibier og reptiler.

Fremgangsmåtene er særlig egnet til behandling, forebygging eller diagnostisering av sklerostinrelaterte lidelser og/eller uheldige benmineraldensitetslidelser, f.eks. osteoporose.

Oppfinnelsen tilveiebringer også fremgangsmåter for økning av mineralinnholdet og/eller mineraldensiteten i ben. Sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan også være nyttige for forbedring av utfall i ortopediske prosedyrer, dentale prosedyrer, implantatkirurgi, ledderstatning, benpoding, benkosmetisk kirurgi og benreparasjon slik som frakturtilheling, pseudoartrosetilheling, forsinket frakturtilheling og ansiktsrekonstruksjon. Én eller flere sammensetninger kan administreres før, under og/eller etter prosedyren, erstatningen, podingen, kirurgien eller reparasjonen.

"En sklerostinrelatert lidelse" inkluderer som anvendt heri lidelser i hvilke benmineraldensiteten (BMD) er unormal og/eller patologisk lav i forhold til friske individer. Lidelser karakterisert ved lav BMD og/eller benskjørhet inkluderer, men er ikke begrenset til, primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta (OI), avaskulær nekrose (osteonekrose), frakturer og implantattilheling (dentale implantater og hofteimplantater), bentap på grunn av andre lidelser (f.eks. assosiert med HIV-infeksjon, cancre eller artritt). Andre "sklerostinrelaterte lidelser" inkluderer, men er ikke begrenset til, revmatoid artritt, artrose, artritt og dannelsen og/eller nærværet av osteolytiske lesjoner.

- "En sklerostinrelatert lidelse" inkluderer som anvendt heri tilstander assosiert med eller karakterisert ved uheldige sklerostinnivåer. Disse inkluderer cancere og osteoporotiske tilstander (f.eks. osteoporose eller osteopeni), idet noen overlapper med "sklerostinrelaterte lidelser" som definert heri.
- 5 Sklerostinrelaterte cancere kan inkludere myelom (f.eks. multipelt myelom med osteolytiske lesjoner), brystcancer, tykktarmscancer, melanom, hepatocellulær cancer, epitelcancer, spiserørscancer, hjernecancer, lungecancer, prostatacancer eller bukspyttkjertelcancer samt eventuelle metastaser derav.
- 10 En "sklerostinrelatert lidelse" kan også inkludere renale og kardiovaskulære tilstander, minst på grunn av sklerostins ekspresjon i nyren og kardiovaskulaturen. Lidelsene inkluderer, men er ikke begrenset til, slike nyrelidelser som glomerulære sykdommer (f.eks. akutt og kronisk glomerulonefritt, hurtig progressiv glomerulonefritt, nefrotisk syndrom, fokal
- 15 proliferativ glomerulonefritt, glomerulære lesjoner assosiert med systemisk sykdom, slik som systemisk lupus erythematosus, Goodpastures syndrom, multipelt myelom, diabetes, polycystisk nyresykdom, neoplasi, sigdcellesykdom og kroniske inflammatoriske sykdommer), tubulære sykdommer (f.eks. akutt tubulær nekrose og akutt nyresvikt, polycystisk nyresykdom, medullær
- 20 svampnyre, medullær cystisk sykdom, nefrogen diabetes og renal tubulær acidose), tubulointerstitielle sykdommer (f.eks. pyelonefritt, legemiddel- og toksinindusert tubulointerstitiell nefritt, hyperkalsemisk nefropati og hypokalemisk nefropati), akutt og hurtig progressiv nyresvikt, kronisk nyresvikt, nefrolitiasis, gikt, vaskulære sykdommer (f.eks. hypertensjon og nefrosklerose,
- 25 mikroangiopatisk hemolytisk anemi, ateroembolisk nyresykdom, diffus kortikal nekrose og nyreinfarkt) eller tumorer (f.eks. nyrecellekarsinom og nefroblastom).
- Lidelsene inkluderer også, men er ikke begrenset til, slike kardiovaskulære
- 30 lidelser som iskemisk hjertesykdom (f.eks. hjertekrampe, myokardinfarkt og kronisk iskemisk hjertesykdom), hypertensiv hjertesykdom, pulmonal hjertesykdom, valvulær hjertesykdom (f.eks. revmatisk feber og revmatisk hjertesykdom, endokarditt, mitralklaffprolaps og aortaklaffstenose), medfødt hjertesykdom (f.eks. valvulære og vaskulære obstruktive lesjoner, atrial eller
- 35 ventrikulær septal defekt og åpen ductus arteriosus), eller myokardial sykdom (f.eks. myokarditt, kongestiv kardiomyopati og hypertrofisk kardiomyopati).

Når antistoffer mot sklerostin administreres sammen med et annet middel, kan de to administreres i hvilken som helst rekkefølge (dvs. suksessivt) eller samtidig.

- 5 Ifølge en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen kan antistoffene ifølge oppfinnelsen benyttes som adjunkt eller adjuvans til annen behandling, f.eks. en behandling ved anvendelse av en benresorpsjonsinhibitor, f.eks. slik som i osteoporosebehandling, særlig en behandling som benytter kalsium, et kalsitonin eller en analog eller et derivat derav, f.eks. kalsitonin, kalsilytika, kalsimimetika
- 10 fra laks, ål eller menneske (f.eks. cinacalcet), et steroidhormon, f.eks. et østrogen, en partiell østrogenagonist eller østrogen-gestagen-kombinasjon, en SERM (selektiv østrogenreseptormodulator), f.eks. raloksifen, lasofoksifen, bazedoksifen, arzoxifene, FC1271, tibolon (Livial®), en SARM (selektiv androgenreseptormodulator), et RANKL-antistoff (slik som denosumab), en
- 15 katepsin K-inhibitor, vitamin D eller en analog derav eller PTH, et PTH-fragment eller et PTH-derivat, f.eks. PTH (1–84) (slik som Preos™), PTH (1–34) (slik som Forteo™), PTH (1–36), PTH (1–38), PTH (1–31)NH₂ eller PTS 893. Ifølge en annen utførelsesform kan antistoffene ifølge oppfinnelsen benyttes i kombinasjon med andre nåværende osteoporosebehandlingsfremgangsmåter, inkludert
- 20 bisfosfonater (f.eks. Fosamax™ (alendronat), Actonel™ (risedronatnatrium), Bonviva™ (ibandronsyre), Zometa™ (zoledronsyre), Aclasta™/Reclast™ (zoledronsyre), olpadronat, neridronat, skelid, bonefos), statiner, anabole steroider, lantanum og strontiumsalter og natriumfluorid.
- 25 I én spesifikk utførelsesform kan antistoffene ifølge oppfinnelsen administreres i kombinasjon med et LRP4-moduleringsmiddel, dvs. et middel som modulerer ekspresjonen eller aktivitet av LRP4, f.eks. et LRP4-nøytraliserende antistoff.
- I en annen spesifikk utførelsesform kan antistoffer ifølge oppfinnelsen
- 30 administreres i kombinasjon med et DKK1-moduleringsmiddel, dvs. et middel som forstyrrer eller nøytraliserer Dkk-1-mediert antagonisme for Wnt-signalering, f.eks. et DKK1-nøytraliserende antistoff.
- Oppfinnelsen tilveiebringer således også anvendelsen av et antistoff eller
- 35 funksjonelt protein ifølge oppfinnelsen og (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel (kalsilytika) i produksjonen av et

medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres av sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin.

5 I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen anvendelsen av et antistoff eller funksjonelt protein ifølge oppfinnelsen i produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres av sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori medikamentet anvendes i kombinasjon med (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende
10 middel (kalsilytika).

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen anvendelsen av (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel (kalsilytika) i
15 produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres av sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori medikamentet anvendes i kombinasjon med et antistoff eller funksjonelt protein ifølge oppfinnelsen.

20 I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen anvendelsen av et antistoff eller funksjonelt protein ifølge oppfinnelsen i produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres av sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori pasienten på forhånd har fått administrert (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et
25 anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel (kalsilytika).

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen anvendelsen av (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel (kalsilytika) i
30 produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres av sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori pasienten på forhånd har fått administrert et antistoff eller funksjonelt protein ifølge oppfinnelsen.

35

I én utførelsesform av kombinasjonene anført ovenfor er hPTH hPTH(1–34).

I én utførelsesform kan antistoffene ifølge oppfinnelsen anvendes for å detektere nivåer av sklerostin, eller nivåer av celler som inneholder sklerostin. Dette kan for eksempel oppnås ved kontaktering av en prøve (slik som en *in vitro*-prøve) og en kontrollprøve med antistoffet mot sklerostin under betingelser som gir mulighet for dannelse av et kompleks mellom antistoffet og sklerostinet. Hvilke som helst komplekser dannet mellom antistoffet og sklerostinet detekteres og sammenlignes i prøven og kontrollen. Standard detekteringsfremgangsmåter som er velkjent i teknikken, slik som ELISA og strømningscytometiske assayer, kan for eksempel utføres ved anvendelse av sammensetningene ifølge oppfinnelsen.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen følgelig videre fremgangsmåter for detektering av nærværet av sklerostin (f.eks. humant sklerostinantigen) i en prøve eller måling av mengden av sklerostin omfattende kontaktering av prøven, og en kontrollprøve, med et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller en antigenbindingsregion derav, som spesifikt binder til sklerostin, under betingelser som gir mulighet for dannelse av et kompleks mellom antistoffet eller porsjonen derav og sklerostin. Dannelsen av et kompleks detekteres deretter, hvori en forskjell i kompleksdannelse mellom prøven og kontrollprøven indikerer nærvær av sklerostin i prøven

Innenfor omfanget av oppfinnelsen er også kit bestående av sammensetningene (f.eks. antistoffer, humane antistoffer og bispesifikke molekyler) ifølge oppfinnelsen og bruksanvisningen. Kitet kan videre inneholde minst ett ytterligere reagens, eller ett eller flere ytterligere antistoffer ifølge oppfinnelsen (f.eks. et antistoff som har en komplementær aktivitet som binder til en epitop på målantigenet som er distinktivt fra det første antistoffet). Slike kit kan for eksempel omfatte et antistoff eller funksjonelt protein ifølge oppfinnelsen og én eller flere av (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og (vi) paratyroidhormonfrisettende middel (kalsilytika). Kit inkluderer typisk en etikett som indikerer den tiltenkte anvendelsen av kitets innhold. Betegnelsen etikett inkluderer hvilken som helst skrift, eller registrert materiale levert på eller med kitet, eller som på annen måte følger med kitet.

Oppfinnelsen som er fullstendig beskrevet, er ytterligere illustrert ved følgende eksempel og krav, som er illustrerende og ikke ment å være ytterligere

begrensende. Fagmannen vil forstå eller være i stand ved anvendelse av bare rutinemessig eksperimentering å finne atskillige ekvivalenter til de spesifikke prosedyrene beskrevet heri. Slike ekvivalenter er innenfor omfanget av den foreliggende oppfinnelsen og kravene.

5 **Eksempel:**

Funksjonelle assayer

10 **ALKALISK FOSFATASEASSAY (ALP)**

Celler

15 MC3T3 1b-celler er en klon av MC3T3-JP-celler som uttrykker OSE2-luc. Denne klonen ble oppnådd etter stabil transfeksjon av MC3T3-JP (MC3T3-E1 murin osteoblast, japansk klon, Jp; en gave fra dr. T. Kokkubo, Novartis, Japan) ved anvendelse av 8x-OSE2wt-mOG2luc i pcDNA3.1+.

Kulturmedium

20 MC3T3-1b-celler ble rutinemessig dyrket i minimalt essensielt medium alfa (MEMa; Invitrogen, kat.nr. 22561-021) supplert med 10 % kalvefosterserum (FCS; Amimed kat.nr. 2-01F100-I), 2 mM L-glutamin (Gibco kat.nr. 25030-024), 50 IU penicillin/50 µg/ml streptomycin (Amimed kat.nr. 4-01F00-H) og 10 mM Hepes (Gibco kat.nr. 15630-056) og 0,75 mg/ml G418 (Gibco kat.nr. 10131-027) (vedlikeholdskulturmedium).

25

Stamløsninger

30 10 mM askorbinsyre (Wako Pure Chemical kat.nr. 013-12061) i DMEM-LG, 14 nM BMP-2 (R&D kat.nr. 355-BM-010) i 5 mM eddiksyre og 0,1 % bovint serumalbumin (BSA, Sigma kat.nr. A-8806); 1 M β-glyserofosfat (Sigma kat.nr. G9891) i Tyrodes løsning; Tyrodes løsning: 9,72 g Tyrodes salt (Sigma kat.nr. T2145) og 1 g NaHCO₃ i 1 l H₂O, ALP substratbuffer: 25 mM glycine og 0,5 mM

MgCL₂, pH 10,5; ALP-substratløsning: 5 mg p-nitrofenylfosfat (Sigma 104-substrat, Sigma kat.nr. 50942-200TAB) i 3,75 ml ALP substratbuffer, pH 10,5; 1 mM p-nitrofenol (Sigma kat.nr. 104-1) i ALP-substratløsning.

5 **Assay**

For ALP-assayet ble MC3T3 1b-celler dyrket i assaykulturmedium (tilsvarende vedlikeholdskulturmediet i fravær av G418). MC3T3 1 b ble utsådd i 200 µl ved 3×10^4 celler/ml hvis induksjon startet 72 h senere, eller 2×10^4 celler/ml hvis induksjon startet 96 h senere. Platene ble inkubert i 72 h eller 96 h ved 37 °C og 5 % CO₂ før induksjonen ble startet ved anvendelse av komplett medium (ved supplering av kulturmediet med 10 mM b-glysero-fosfat (bGP) og 50 µM askorbinsyre (AA)). Antistoffene som skal testes, ble fortynnet med komplett medium. Antistoffet sammen med BMP-2 (0,7 nM) og sklerostin (50 nM) ble tilsatt i brønnene (triplikat) i et sluttvolum på 200 µl komplett medium. På hver plate ble 4 interne kontroller inkludert i triplikat: en løsemiddelkontroll (BSA), BMP-2-kontroll (0,7 nM), BMP-2 + sklerostin (BMP-2 (0,7 nM) og sklerostin (50 nM)) og en sklerostinkontroll (50 nM). Platene ble inkubert i enda 72 h ved 37 °C og 5 % CO₂. Da induksjonsperioden var ferdig, ble assayet avsluttet ved fjerning av mediet og tilsetning av 150 µl ALP-substratløsning (nylagt) i hver brønn. Platene ble inkubert i 3–30 min. 100 µl 1 M NaOH ble tilsatt for å stoppe reaksjonen, og platene ble ristet på en platerister. OD ble lest mot en blank ved 405 nm, og ALP-aktivitet ble beregnet i nmol/min. 50 nM sklerostin ble anvendt for å oppnå minst 70 % inhibering av BMP-2-indusert ALP-produksjon [0,7 nM BMP-2].

WNT-ASSAY

Dette assayet ble etablert for testing av antistoffer basert på sklerostins evne til å inhibere Wnt1-mediert induksjon av STF reporter-gen.

Transfeksjon av HEK293-celler

På dag 1 ble HEK293-celler utsådd ved $1,3-1,4 \times 10^5$ celler per brønn (i 0,5 ml volum) på en 24-brønners poly-D-lysinplate (BD-BioCoat nr. 356414) i DMEM (Gibco, kat.nr. 61965-026) inneholdende 10 % kalvefosterserum (FCS), 1 % L-glutamin (Gibco, kat.nr. 25030.024), 1 % ikke-essensielle aminosyrer (Gibco, kat.nr. 11140) uten antibiotika. Transfeksjon ble utført på dag 2 med lipofektamin 2000 (Invitrogen, kat.nr. 11668-019). For hver brønn som skal transfekteres ble følgende mengde av plasmider tilsatt til et sluttvolum på 50 µl OptiMEM®I (Gibco, kat.nr. 31985-047): for kontrollbrønner (pcDNA3+, 480 ng; SuperTopFlash (STF) 20 ng; phRL-CMV, 0,5 ng) og for Wnt1-behandlingsbrønner (pcDNA-wnt1, 20 ng; pcDNA3+, 460 ng; SuperTopFlash (STF) 20 ng; phRL-CMV, 0,5 ng).

I et andre glass ble 1,6 µl lipofektamin 2000 fortynnet i 50 µl OptiMEM®I og inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Innholdet i de to glassene ble deretter blandet ved tilsetning av innholdet fra lipidglasset i DNA-glasset og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur for å gi mulighet for DNA-lipidkompleksdannelse. DNA-lipidkomplekset (100 µl) ble deretter jevnt tilsatt til brønner og inkubert ved 37 °C i 5 % CO₂ i 5 timer. Da den 5 timer lange inkuberingen var ferdig, var cellene klare for behandling med testreagenser, slik som SOST, antistoffer osv.

Fastslå SOST-doseavhengig inhibering

For å fastslå doseinhiberingskurven ble en serie av to gangers fortynninger av rhSOST i DMEM inneholdende 10 % FCS, 1 % L-glutamin og 1 % ikke-essensielle aminosyrer uten antibiotika fremstilt, idet det ble startet ved 160 nM. Konsentrasjonen av stam-rhSOST var 260 µg/ml i DMEM med 1 % FCS. Hver tilstand ble rutinemessig testet i duplikater. 1 ml medium for hver tilstand ble derfor fremstilt, og 450 µl ble tilsatt per brønn etter fjerning av medium inneholdende transfeksjonsblanding fra brønner. Behandlingstiden var 18–20 timer. Da inkuberingen var ferdig, ble luciferaseassay utført som angitt nedenfor.

Test av anti-SOST-antistoffer

Antistoffer ble forhåndsblandet med SOST før tilsetning til cellene. For dette formålet ble det fremstilt DMEM-medium (10 % FCS ,1 % L-glutamin og 1 % ikke-essensielle aminosyrer uten antibiotika) med 20 til 30 nM av rhSOST. Forskjellige fortynninger av testede antistoffer ble deretter tilsatt i det SOST-

5 holdige mediet i henhold til forsøksmetoden. Disse blandingene ble fremstilt 40 minutter før behandlingen. Hver tilstand ble rutinemessig testet i duplikater. For å gjøre dette ble det fremstilt 1 ml medium for hver tilstand, og 450 µl ble tilsatt per brønn etter fjerning av medium inneholdende transfeksjonsblanding fra brønner. Behandlingstiden var 18–20 timer. Da inkuberingen var ferdig, ble

10 luciferaseassay utført som angitt nedenfor.

Luciferaseassay

Da inkuberingen var ferdig, ble medium fjernet, og 300 µl av 1X passiv lysebuffer (Promega, kat.nr. E194A) ble tilsatt i lyseceller. Luciferaseaktivitet ble

15 deretter målt ved anvendelse av Dual-Glo Luciferase System (Promega, kat.nr. E2940) med 30 µl lysater i duplikater. Assayet ble utført ifølge kitets medfølgende bruksanvisning. 30 µl Dual-Glo-luciferase (ildflueluciferase; for STF) og 30 µl Dual-Glo Stop- og Glo (Renilla-luciferase; for

20 transfeksjonseffektivitetskontroll)-substrater ble typisk anvendt. Luminescerende signaler ble målt med Mithras LB940-instrument (Berthold Technologies).

Databeregning

25 Forholdet mellom ildflue- og Renilla-luciferaser ble beregnet. Sluttresultatene uttrykkes ved å sette verdien av Wnt1 uten SOST som 1.

MINERALISERINGSASSAY

30 Celler

MC3T3 1b-celler er en klon av MC3T3-JP-celler som uttrykker OSE2-luc. Denne klonen ble oppnådd etter stabil transfeksjon av MC3T3-JP (MC3T3-E1 murin

osteoblast, japansk klon, Jp; en gave fra dr. T. Kokkubo, Novartis, Japan) ved anvendelse av 8x-*OSE2wt-mOG2luc* i *pcDNA3.1+*.

Kulturmedium

5

MC3T3-1 b-celler ble rutinemessig dyrket i minimalt essensielt medium alfa (MEM α ; Invitrogen, kat.nr. 22561-021) supplert med 10 % kalvefosterserum (FCS; Amimed kat.nr. 2-01F100-I), 2 mM L-glutamin (Gibco kat.nr. 25030-024), 50 IU penicillin/50 μ g/ml streptomycin (Amimed kat.nr. 4-01F00-H) og 10 mM Hepes (Gibco kat.nr. 15630-056) og 0,75 mg/ml G418 (Gibco kat.nr. 10131-027) (vedlikeholdskulturmedium).

10

Mineraliseringsassay

15

Matriseassosiert kalsium avleiret i brønner ble bestemt i MC3T3-1b-celler ved anvendelse av kalsiumkitet (Axon Lab, kat.nr. AXON0012). Celler ble utsådd ved 6×10^3 celler/brønn eller 2×10^3 celler/brønn for å forbedre cellemottagelighet i 96-brønners plater i 100 μ l assaykulturmedium (vedlikeholdskulturmedium uten G418) og inkubert i 3 dager for å nå konfluens. Assaykulturmedium ble deretter endret, og forbindelser som skal testes, tilsatt sammen med 10 mM b-glyserofosfat (bGP; Sigma kat.nr. G9891) og 50 μ M askorbinsyre (AA; Wako Pure Chemical kat.nr. 013-12061). Før deres tilsetning til cellene ble sklerostin og Fab-ene som skal testes, preinkubert i en separat plate i 2 h ved romtemperatur; imens ble assayets 96-brønners plater gitt 2,1 eller 2,8 nM BMP-2 (R&D Systems, kat.nr. 355-BM-010) før de mottok sklerostin-Fab-blandingen. Celler ble inkubert i 14 dager, og assaymedium ble erstattet hver 3–4 dag. Da inkuberingen var ferdig, ble celler kort vasket to ganger med 200 μ l PBS/brønn, 50 μ l 0,5 M HCl ble tilsatt i hver brønn, og plater ble fryst ved -20 °C i minst 24 h. På det egnede tidspunktet ble platene tint ved romtemperatur i 2 timer, og 10 μ l av hver brønn ble overført i en ny 96-brønners plate. Kalsiumarbeidsløsning (1:5) ble deretter tilsatt (200 μ l), og 5–30 minutter senere ble plater avlest ved 595 nm på en mikroplateleser.

20

25

30

35

Absorbansen ble translatert i μ g av kalsium ifølge en standardkurve, kontrollbrønn (askorbinsyre og beta-glyserofosfat)-verdi ble trukket fra hver

databrønn, og sluttresultater ble uttrykt som % av BMP-2-indusert mineralisering.

SMAD1-FOSFORYLERING WESTERN

5

Materiale

- MC3T3-E1 murin osteoblast, (japansk klon, gave fra dr. T. Kokkubo, Novartis, Japan) C3H10T1/2-celler (mouse embryo mesenchymal; ATCC, kat.nr.: CCL-226)
- 10 SCL non-glycosylated, E. coli derived (Novartis, PSU5257)
- 15N SCL non-glycosylated, E. coli derived (Novartis, PSU11274)
- hSOST-APP, glycosylated, HEK-EBNA derived (Novartis, BTP11100)
- rhSCL, glycosylated, mouse myeloma cells derived (R&D Systems, kat.nr.: 1406-ST/CF)
- 15 anti hSOST antibody (R&D Systems, kat.nr.: AF1406)
- PhosphoSafe Extraction Reagent (Novagen, kat. nr.: 71296-3)
- Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem, kat. nr.: 539134)
- NuPAGE Novex Tris-Acetate Gel 7% 1.5mm, 15 wells (Invitrogen, kat. nr.: EA03585)
- 20 Tris-Acetate SDS Running Buffer 20x (Invitrogen, kat. nr.: LA0041)
- NuPAGE Antioxidant (Invitrogen, kat. nr.: NP0005)
- Immobilon-P Transfer Membrane 0.45um (Millipore, kat. nr.: IPVH00010)
- Wattman chromatography paper (Merck, kat. nr.: 3587600)
- 25 XCell SureLock Mini-Cell and XCell II Blot Module (Invitrogen)
- VersaMax microplate reader (Bucher)

Cellekultur og ekstraksjon

- 30 MC3T3-E1- og C3H10T1/2-celler ble rutinemessig dyrket i henholdsvis minimalt essensielt medium alfa (MEMa; Invitrogen, kat.nr. 22561-021) eller i DMEM med

høy glukose (Invitrogen, kat.nr. 41965-039). Alt kulturmedium ble supplert med 10 % kalvefosterserum (FCS; BioConcept kat.nr. 2-01F10-I, lot. Z04459P), 2 mM L-glutamin (Invitrogen kat.nr. 25030-024), 50 IU penicillin/50 ug/ml streptomycin (Invitrogen kat.nr. 15140-122) og 10 mM Hepes (Invitrogen kat.nr. 15630-056) (vedlikeholdskulturmedium)

Celler ble utsådd i vedlikeholdskulturmedium i 6-brønners plater (3 ml/brønn) og dyrket til konfluens (med $1,4 \times 10^5$ MC3T3-1b celler/brønn, konfluens ble nådd på dag 3; med $1,0 \times 10^5$ C3H10T1/2 celler/brønn ble konfluens nådd på dag 3). Etter serumnedbryting over natten i kulturmedium inneholdende 1 % FBS ble mediet erstattet med ferskt medium supplert med 1 % FBS, BMP-6 (R&D Systems, kat.nr. 507-BP) og stoffene som skal testes. Før deres tilsetning til cellene ble BMP-6 og stoffene som skal testes, preinkubert i 1 h ved romtemperatur, som det var blitt beskrevet for en phospho-Smad 1/3/5 i C3H10T1/2 (Winkler, EMBO J., 2003, 22(23):6267–76). Ved testing av antistoffer mot sklerostin ble disse preinkubert med sklerostin over natten ved 4 °C før de ble inkubert med 0,2 nM BMP-6 i 1 h ved romtemperatur og til slutt tilsatt til konfluente celler. Etter den egnede behandlingstiden ble cellene vasket med 2 ml iskald PBS. 100 µl/brønn PhosphoSafe-ekstraksjonsreagens og 1:200 fortynnet proteaseinhibitorblanding ble deretter tilsatt til cellene, som deretter ble inkubert på is i 5 min. Cellene ble skrappt av brønnene og overført til et mikrofugeglass. Celleekstraktet ble oppbevart på is i 15 min, avbrutt av et vortekser-trinn hvert 5. min. Deretter ble celleekstraktet sentrifugert i 5 min ved 16 000 g og 4 °C. Supernatanten ble til slutt overført i et nytt mikrofugeglass for proteinbestemmelse.

Proteinkonsentrasjon i cellelysat ble bestemt ved anvendelse av BCA-proteinassaykitet ifølge produsentens bruksanvisning. BSA ble anvendt som standard. For denaturering ble cellelysatet fortynnet 1:2 med Laemmli-buffer (Bio-Rad, kat.nr. 161-0737, inneholdende β-merkapttoetanol (1:20, Merck, kat.nr. 1.12006) nylig tilsatt) og kokt i 5 min ved 95 °C. Etter kjøling ble prøvene oppbevart ved -20 °C inntil videre anvendelse.

Western blot

Smad (H-465)-antistoff (Santa Cruz, kat.nr.: sc-7153) er et polyklonalt IgG fra kanin, dyrket mot aminosyrene 1–465 som representerer Smad1 av full lengde av human opprinnelse. Det bør gjenkjenne Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 og Smad8 fra menneske, rotte og mus. Fosfo-Smad1 (Ser463/465)/Smad5 (Ser463/465)/Smad8 (Ser426/428)-antistoff (Cell Signalling, kat.nr. 9511) er et polyklonalt IgG fra kanin, dyrket mot et syntetisk fosfo-peptid tilsvarende rester som omgir Ser463/465 av humant mad5. Det bør detektere endogene nivåer av Smad1 bare når det fosforyleres dobbelt ved serin 463 og serin 465 samt Smad5 og Smad8 bare når det fosforyleres ved de tilsvarende stedene fra menneske, mus, rotte, mink og xenopous-frosk. Antistoffet kryssreagerer ikke med andre Smad-relaterte proteiner.

XCell SureLock Mini Cell-systemet (Invitrogen) ble fremstilt ifølge produsentens bruksanvisning. Proteinprøvene (2 µg for en Smad, 5 µg for en Phospho-Smad Western-analyse) ble lastet i likt sluttvolum på en 7 % NuPAGE Novex Tris-acetatgel i 1x rennende buffer. Det ble anvendt SeeBlue Plus2 forhånds-farget standard (10 µl, 1:10; Invitrogen, kat.nr. LC5925) og MagicMark XP Western proteinstandard (10 µl, 1:100; (Invitrogen, kat.nr.; LC5602) som molekylvektsmarkører. Gelen ble kjørt i 75 min med konstant spenning (150 V).

Blottingputer og filterpapir ble dynket i 700 ml 1x NuPAGE-overføringsbuffer. En PVDF-overføringsmembran ble først dynket i 30 s i metanol og deretter overført til 1x NuPAGE-overføringsbuffer (Invitrogen, kat.nr. NP0006, overføringsbuffer: Metanol 10:1 nylig fremstilt). Gelkassettplatene ble separert med en gelkniv, ett forhåndsdyndet filterpapir ble plassert på toppen av gelen, og alle fangede luftbobler ble forsiktig fjernet. Platen ble snudd opp ned på plastfolie, og etter fjerning av platen ble den forhåndsdyndede overføringsmembranen plassert på gelen og eventuelle luftbobler ble fjernet. Et andre forhåndsdyndet filterpapir ble plassert på toppen, og eventuelle luftbobler ble fjernet. To dyndede blottingputer ble plassert i katodekjernen i Cell II-blottingmodulen. Gel/membran-sandwichen ble forsiktig løftet opp og plassert på blottingputene (med gelen nærmest katodekjernen). Til slutt ble 3 forhåndsdyndede blottingputer plassert på membransammenstillingen, og anodekjernen ble tilsatt på toppen. Blottingsmodulen ble skjøvet inn i føringskinnene på det lavere bufferkammeret, og kilen ble låst i posisjon ifølge produsentens bruksanvisning. Blottingsmodulen ble fylt med 1x NuPAGE-overføringsbuffer inntil gel-/membransammenstillingen var dekket. De ytre bufferkamrene ble fylt med

650 ml deionisert vann, og proteinoverføringen til PVDF-membranen ble utført med konstant spenning (30 V) i 2 timer.

Etter blottingen ble membranen først vasket i 10 min i 0,05 % Tween 20 i PBS og deretter blokkert under forsiktig risting i 1 time i 25 ml SuperBlock T20-blokkeringsbuffer ved romtemperatur. Det primære antistoffet (fosfo-Smad 1/5/8 eller Smad (H-465)) ble tilsatt til membranen i en 1:1000 fortynning i SuperBlock T20 blokkeringsbuffer (Pierce, kat.nr. 37516), og membranen ble inkubert over natten ved 4 °C under risting. Membranen ble deretter vasket 3 ganger i 10 min med 0,05 % Tween 20 (Fluka, kat.nr. 93773) i PBS før den ble inkubert med det RP-konjugerte sekundære antistoffet (1:1000 i SuperBlock T20-blokkeringsbuffer) i 60 min ved romtemperatur under risting. Minst 3 vasketrinn på 10 min hver ble utført før membranen ble inkubert i 5 min med SuperSignal West Femto Substrate Working Solution (Pierce, kat.nr. 34095). Membranen ble til slutt plassert i en plastlomme og avbildet med Fluor-S Multimager (Bio-Rad) og kamera. En optimal eksponeringstid på 1 til 2 min ble bestemt ved sammenligning av bilder tatt mellom 30 s og 5 min.

Dataanalyse

Kjemiluminescensaktivitetene ble målt ved anvendelse av Quantity One (Bio-Rad), og EC₅₀-verdier ble beregnet ved anvendelse av XLfit4-programvare. Hvert fosfo-Smad-signal ble normalisert ved dets tilsvarende totale Smad-signal.

LRP6 / SKLEROSTIN-ELISA

96-brønners ikke-behandlede mikrotiterplater ble overtrukket med 100 µl/brønn LRP6/Fc (1 µg/ml, R&D Systems, kat.nr. 1505-LR) fortynnet i PBS. Som kontroll for ikke-spesifikk binding (NSB) ble noen brønner fylt med 100 µl/brønn PBS. Platene ble dekket med plastfilm og inkubert over natten ved romtemperatur. Etter overtrekkingen ble platene vasket 3 ganger med 200 µl/brønn 0,05 % Tween 20 (Fluka, kat.nr. 93773) i PBS, og brønner ble blokkert i 1 h ved 37 °C ved tilsetning av 300 µl/brønn SuperBlock blokkeringsbuffer (Pierce, kat.nr. 37535) i TBS. Etter inkubering ble blokkeringsløsningen fjernet, og 100 µl/brønn sklerostin (E.coli-avledet, Novartis; 1–1000 ng/ml,) fortynnet i 1 % BSA i PBS

ble tilsatt. Platene ble inkubert i 2 h ved romtemperatur før de ble vasket 3 ganger med 200 µl/brønn 0,05 % Tween 20 i PBS. Deretter ble det tilsatt 100 µl/brønn antistoff mot anti-sklerostin (1 µg/ml) fortynnet i 1 % BSA i PBS, og plater ble inkubert i 2 h ved romtemperatur før de ble vasket 3 ganger med 200 µl/brønn 0,05 % Tween 20 i PBS. Til slutt ble det tilsatt 100 µl/brønn ALP-konjugert anti-geit-IgG Ab (1:5000; Sigma kat.nr. A-7888) fortynnet i 1 % BSA (Sigma kat. nr.:A-7888) i PBS i 1 h ved RT, og platene ble deretter vasket 3 ganger med 200 µl/brønn 0,05 % Tween 20 i PBS. For å bestemme ALP ble 100 µl/brønn ALP-substrat (Sigma, kat.nr.. S0942)-løsning (1 tablett per 5 ml dietanolaminsubstratbuffer 1x; Pierce, kat.nr. 34064) tilsatt til platene i 90 min og optisk densitet målt ved 405 nm.

LRP4-OVEREKSPRESJON I HEK293-CELLER

HEK293-celler (ATCC kat.nr. CRL-1573) ble rutinemessig dyrket i DMEM/F12 (Invitrogen kat.nr. 21331-020) supplert med 10 % FCS (BioConcept kat.nr. 2-01F10-I, lot. Z04459P), 2 mM L-glutamin (Invitrogen kat.nr. 25030-024), 100 IU penicillin/100 µg/ml streptomycin (Invitrogen kat.nr. 15140-122) og 10 mM HEPES (Invitrogen kat.nr. 15630-056). Hek293-celler ble utsådd ved 5×10^4 celler/brønn i poly-D-lysin 48-brønners plateformat og inkubert i 24 h før transfeksjonen ble utført med Lipofectamine 2000 (Invitrogen kat.nr. 11668-019). For hver brønn som skal transfekteres, ble følgende mengde av plasmider tilsatt til et sluttvolum på 25 µl OptiMEM®I (Gibco, kat.nr. 31985-047) og blandet forsiktig: for kontrollbrønner (pmaxGFP, 62,5 ng, pcDNA3+, 125 ng; SuperTopFlash (STF) 62,5 ng; SV40-drivende Renilla-luciferaseplasmid, 0,75 ng) og for Wnt1-behandlingsbrønner (pmaxGFP, 62,5 ng, pcDNA-wnt1, 62,5 ng; pcDNA3+, 62,5 ng; SuperTopFlash (STF) 62,5 ng; SV40-drivende Renilla-luciferaseplasmid, 0,75 ng) og for LRP4-Wnt1-behandlingsbrønner (pcDNA3+-LRP4, 62,5 ng, pcDNA3+-wnt1, 62,5 ng; pcDNA3+, 62,5 ng; SuperTopFlash (STF) 62,5 ng; SV40-drivende Renilla-luciferaseplasmid, 0,75 ng). I et andre glass ble 0,8 µl av Lipofectamine 2000 fortynnet til et sluttvolum på 25 µl OptiMEM®I og inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Innholdet i de to glassene ble deretter blandet ved tilsetning av innholdet fra lipidglasset i DNA-glasset og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur for å gi mulighet for DNA-lipidkompleksdannelse. DNA-lipidkomplekset (50 µl) ble deretter jevnt tilsatt i brønner og inkubert ved 37 °C i 5 % CO₂ i 5 timer. Da den 5 timer lange

inkuberingen var ferdig, var cellene klare for en 20 h behandling med testreagenser, slik som SOST, DKK1 (R&D kat.nr. 1096-DK), antistoffer osv. Luciferaseassayet ble utført som beskrevet under "Wnt-assay", men med tilsetning av 150 µl passiv lysebuffer i stedet.

5

LRP4-OVEREKSPRESJON I C28A2-CELLER

C28a2-celler (fra Mary Goldring, Harvard Institutes of Medicine, Boston, MA, USA) ble dyrket i samme medium som HEK293 (se ovenfor), bortsett fra at HEPES ikke var til stede og et supplement av ikke-essensielle aminosyrer (Gibco kat.nr. 11140) ble tilsatt. C28a2-celler ble utsådd ved 1×10^5 celler/brønn i et 24-brønners plateformat i antibiotikumfritt kulturmedium og inkubert over natten før transfeksjonen ble utført med Lipofectamine 2000 (Invitrogen kat.nr. 11668-019). For hver brønn som skal transfekteres, ble følgende mengde av plasmider (600 ng/brønn totalt) tilsatt i et sluttvolum på 50 µl OptiMEM®I (Gibco, kat.nr. 31985-047) og blandet forsiktig: for kontrollbrønner (SuperTopFlash (STF) 100 ng; SV40-drivende Renilla-luciferaseplasmid, 2 ng og pcDNA3+, 500 ng for å kompensere) og for Wnt1-behandlingsbrønner (pcDNA-wnt1-plasmid, 100 ng; LRP5-plasmid, 100 ng; SuperTopFlash (STF) 100 ng; SV40-drivende Renilla-luciferaseplasmid, 2 ng og pcDNA3+, 300 ng) og for LRP4-Wnt1-behandlingsbrønner (pcDNA-wnt1-plasmid, 100 ng; LRP5-plasmid, 100 ng; LRP4-plasmid, 100 ng; SuperTopFlash (STF) 100 ng SV40-drivende Renilla-luciferaseplasmid, 2 ng og pcDNA3+, 200 ng). I et andre glass ble 1,6 µl lipofektamin 2000 fortynnet i 48,4 µl OptiMEM®I og inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Innholdet i de to glassene ble deretter blandet ved tilsetning av innholdet fra lipidglasset i DNA-glasset og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur for å gi mulighet for DNA-lipidkompleksdannelse. DNA-lipidkomplekset (100 µl) ble deretter jevnt tilsatt i brønner og inkubert ved 37 °C i 5 % CO₂ i 2 timer. Da den 2 timer lange inkuberingen var ferdig, ble transfeksjonsmedium erstattet med 450 µl/brønn antibiotikumfritt medium, og cellene ble inkubert i 24 h. Celler ble deretter behandlet i 20 h med testreagenser, slik som SOST eller DKK1 (R&D kat.nr. 1096-DK). Luciferaseassayet ble utført som beskrevet under "Wnt-assay".

35

LRP4-KNOCKDOWN I HEK293-CELLER

Wnt1/STF/Renilla Hek293-celler (et stabilt klon utgitt fra den stabile transfeksjonen av Hek293-celler (ATCC kat.nr. CRL-1573)) med Wnt1-ekspresjonsplasmid, SuperTopFlash-reporterplasmid og et SV40-drivende Renilla-luciferaseplasmid) ble rutinemessig dyrket i DMEM 4500 g/l glukose (Invitrogen kat.nr. 41965-035) supplert med 10 % FCS (Amimed kat.nr. 2-0F100-I), 2 mM L-glutamin (Invitrogen kat.nr. 25030-081), 100 IU/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin (Gibco kat.nr. 15140-163), 6 µg/ml puromycin (Invitrogen kat.nr. ant-pr-1), 150 µg/ml zeocin (Invitrogen kat.nr. 45-0430) og 150 µg/ml hygromycin (Invitrogen kat.nr. 10687-010). Seleksjonsantibiotika ble utelatt under knockdownforsøk. Celler ble utsådd ved $0,6 \times 10^5$ celler/brønn i poly-D-lysin 24-brønners plateformat og fikk binde over natten før utførelse av transfeksjonen av LRP4 siRNA-er med HiPerFect (Qiagen kat.nr. 301707). Sens- og antisenssekvensene av det anvendte LRP4 siRNA var som følger: LRP4a: TAAATTATCATAAAGTCCTAA / AGGACTTTATGATAATTTATT; (SEQ ID NO:160/161) LRP4b: ATAGTGGTTAAATAACTCCAG / GGAGTTATTTAACCACTATTT; (SEQ ID NO:162/163) LRP4c: TAAATTCTCGTGATGTGCCAT / GGCACATCACGAGAATTTATT; (SEQ ID NO:164/165) LRP4d: TTTCTTATAGCACAGCTGGTT / CCAGCTGTGCTATAAGAAATT; (SEQ ID NO:166/167) LRP4e: TAGACCTTTCCATCCACGCTG / GCGTGGATGGAAAGGTCTATT; (SEQ ID NO:168/169). For hver brønn som skal transfekteres, ble det fremstilt to eppendorf-rør: Det første inneholdt 0,2 µl av en 20 nM stamløsning av én av LRP4 siRNA eller 0,1 µl av en 20 nM stamløsning av to forskjellige LRP4 siRNA-er (den siste totale konsentrasjonen i siRNA/brønn er 6,6 nM) og 50 µl Optimem, og det andre inneholdt 3 µl HiPerFect og 47 µl Optimem. Innholdet i det andre glasset ble tilsatt i det første, blandet kort på vortekser og etterlatt i 10 minutter ved romtemperatur. 100 µl av denne blandingen ble deretter tilsatt i den respektive brønnen, og celler ble inkubert ved 37 °C under 5 % CO₂ i 30 timer. Deretter ble transfeksjonsblandingen fjernet og erstattet med ferskt antibiotikumfritt kulturmedium (450 µl/brønn) og inkubert i nye 24 timer. Før SOST- eller DKK1-behandling ble medium fjernet, erstattet med ferskt antibiotikumfritt kulturmedium inneholdende egnet fortykning av SOST eller DKK1 (R&D kat.nr. 1096-DK), og celler ble inkubert i 20 timer ved 37 °C under 5 % CO₂. Luciferasebestemmelse ble deretter utført som beskrevet under "Wnt-assay".

Dyremodeller

5 Åtte måneder gamle OF1/IC-hunnmus (n = 16/gruppe, Charles River, Frankrike)
 fikk to ganger ukentlig intravenøst administrert antistoff mot sklerostin
 ANTISTOFF A (25 mg/kg, h/mlgG2a) (MOR05813) eller kontrollantistoff (anti-PC-
 h/mlgG2a). Kontrollgrupper mottok enten daglig subkutan 100 mikrog/kg
 PTH(1–34) eller PBS-vehikkel. Behandlingen varte i 2,5 uker for alle dyr.
 Halvparten av dyrene (n = 8 / gruppe) ble avlivet på dette tidspunktet for
 10 histomorfometrisk analyse. Behandlingen fortsatte for resten av dyrene (n = 8 /
 gruppe) i opptil 5 uker.

Dyrenes tibiale benmasse og geometri ble målt ved initiering av behandlingen
 ved perifer kvantitativ computertomografi (pQCT) og mikrocomputertomografi
 15 (microCT). Dyr ble jevnt fordelt i grupper ifølge kroppsvekt og tibial total
 benmineraldensitet som målt ved pQCT. Endringer i benmineraldensitet, -masse
 og -geometri ble evaluert etter 2,5 og 5 uker av behandlingen. Kroppsvekt ble
 overvåket ukentlig. Dyr som ble avlivet etter 2,5 ukers behandling, fikk
 administrert to fluorokrometiketter for markering av benmineralisering 10 og 3
 20 dager før nekropsi. Blod ble tatt ved nekropsi. DEXA-målinger ble utført ved
 obduksjon på eksidert tibia, femur og lendevirvel. Benet ble fiksert, dehydrert og
 integrert for mikrotomseksjonering og histomorfometrisk analyse av
 bendannelsesdynamikk.

25 BEHANDLINGSPROTOKOLL

Kontrollantistoff: anti-PC-h/mlgG2a,
 konsentrasjon: 2,5 mg/ml, administreringsvolum: 10 ml/kg
 Vehikkel: 50 mM citrat, 140 mM NaCl
 30 Antistoff mot sklerostin: anti-SOST-MOR05813, h/mlgG2a,
 2,45 mg/ml, administreringsvolum: 10 ml/kg
 Vehikkel: 50 mM citrat, 140 mM NaCl
 hPTH (1–34) (Bachem, Bubendorf, Sveits) 100 µg/kg

Vehikkel: PBS+BSA 0,1 %

BEHANDLINGSGRUPPER:

1	isotypekontroll iv. = anti-PC-mIgG2a
2	anti-SOST-MOR05813 iv.
3	vehikkelkontroll sc. = PBS+BSA 0,1 %
4	hPTH(1-34) sc.

VEDLIKEHOLDSBETINGELSER

5

Dyr ble huset i grupper på fire til fem dyr ved 25 °C med en 12:12 h syklus med lys og mørke. De ble matet et standard laboratoriumkosthold inneholdende 0,8 % fosfor og 0,75 % kalsium (NAFAG 3893.0.25, Kliba, Basel, Sveits). Mat og vann ble tilveiebrakt ad libitum.

10

ERKLÆRING OM DYREVELFERD

Dyreforsøk ble utført ifølge gjeldende regelverk i den sveitsiske kantonen Basel by.

15

FREMGANGSMÅTER

PERIFER KVANTITATIV COMPUTERTOMOGRAFI (pQCT)

20

Dyrene ble plassert i en lateral posisjon under inhaleringsnarkose (Isofluran, 2,5 %). Det venstre benet ble strukket og fiksert i denne posisjonen.

25

Tverrsnittlig benmasse, densitet og geometri ble overvåket i den proksimale tibiametafysen på høyde med midfibulahodet og 1,8 mm distalt for den proksimale enden av tibia som detektert i scout-skanningen ved anvendelse av en tilpasset Stratec-Norland XCT-2000 utstyrt med et Oxford 50 AM-røntgenglass og en kollimator med 0,5 mm diameter. Følgende konfigurasjon ble valgt for målingene: vokselstørrelse: 0,1 x 0,1 x 0,5 mm; skanningshastighet:

scout-riss 10 mm/s; sluttskanning 3 mm/s, 1 blokk, konturmodus 1, rivemodus 2; kortikal terskel: 610 mg/cm³, indre terskel: 610 mg/cm³.

MIKROCOMPUTERTOMOGRAFI (microCT)

5

Dyrene ble plassert i en lateral posisjon under inhaleringsnarkose (Isofluran, 2,5 %). Det venstre benet ble strukket og fiksert i denne posisjonen.

10

Spongios benstruktur ble evaluert i den venstre proksimale tibiametafysen ved anvendelse av en Scanco vivaCT20 (Scanco Medical AG, Sveits). De ikke-isometriske vokslene hadde en dimensjon på 10,5 x 10,5 x 10,5 µm. Fra de tverrsnittlige bildene ble det spongiøse benkompartimentet avgrenset fra kortikalt ben ved sporing av dets kontur. I alle de andre skivene ble grenser interpolert basert på sporingen for å definere volumet av interesse. 143 skiver innenfor området av det sekundære spongiosa (starter nedenfor de laterale nedre kantene av vekstplaten) ble evaluert. Det ble anvendt en terskelverdi på 370 for den tredimensjonale evalueringen av strukturelle parametere.

15

DEXA-SKANNING

20

Ex vivo DEXA-målinger ble utført på venstre tibia, venstre femur og lendevirvel 1–4. Etanol (70 %) ble anvendt for bløtvevsimulering. Målingene ble utført ved anvendelse av et alminnelig Hologic QDR-1000-instrument tilpasset for målinger av små dyr. Det ble anvendt en kollimator med 0,9 cm diameter og ultrahøy oppløsningsmodus (linjeavstand 0,0254 cm, oppløsning 0,0127 cm).

25

FLUORKROMMERKING:

Alizarin (20 mg/kg, subkutant, alizarinkomplekson, Merck, Dietikon, Sveits) ble en 10 dager før nekropsi

30

Calcein (30 mg/kg, subkutant, Fluka, Buchs, Sveits) – 3 dager før nekropsi

HISTOLOGI OG HISTOMORFOMETRI

Etter disseksjon ble høyre femur og lendevirvel fem og seks plassert i 24 h i Karnovskys fiksativ, dehydrert i etanol ved 4 °C og integrert i resin (metylmetakrylat). Ved anvendelse av en Microtome 2050 Supercut (Reichert Jung, Arnsberg, Tyskland) ble et sett av 5 µm tykke ikke-sammenhengende mikrotomsnitt skåret i midtfrontalplanet for evaluering av fluorokrometikettbasert bendannelse. Snittene ble undersøkt ved anvendelse av et Leica DM-mikroskop (Leica, Heerbrugg, Sveits) utstyrt med et kamera (SONY DXC-950P, Tokyo, Japan) og tilpasset Quantimet 600-programvaren (Leica, Cambridge, Storbritannia). Det ble tatt prøve av én seksjon per dyr. Mikroskopiske bilder av prøvene ble digitalisert og evaluert halvautomatisk på skjermen. Benperimeter, enkelt og dobbeltmerket benperimeter og bredde mellom etiketter ble målt (X200 forstørrelse). Mineraliserte perimeterverdier (prosent), mineralapposisjonsrater (mikrometer/dag) (korrigert for snitthelling i det spongiøse benkompartimentet) og daglige bendannelsesrateverdier (daglig bendannelsesrate/benperimeter [mikrometer/dag]) ble beregnet. Alle parametere ble evaluert i det sekundære spongiosa av den distale femurmetafysen og i én lendevirvel. Et annet sett av seksjoner ble farget med tartratresistent syrefosfatase (TRAP). Osteoklastisk overflate per benoverflate (%) ble evaluert i det sekundære spongiosa:

STATISTISK ANALYSE

Resultater uttrykkes som gjennomsnittlig +/-SEM. Statistisk analyse ble utført ved anvendelse av Students t-test (to-halet; uparet). Behandling (antistoff mot sklerostin eller hPTH(1-34) ble testet for forskjell med kontroll (kontrollantistoff eller PBS), *, + $p < 0,05$, **, ++ $p < 0,01$.

Affinitetsbestemmelse

30

Affinitetsbestemmelse av valgte anti-humane sklerostin-Fab-er ved anvendelse av overflateplasmonresonans (Biacore)

De kinetiske konstantene k_{on} og k_{off} ble bestemt med seriefortynninger av den respektive Fab-bindingen til kovalent immobilisert antigensklerostin ved anvendelse av BIAcore 3000-instrumentet (BIAcore, Uppsala, Sverige). For kovalent antigenimmobiliseringsstandard EDC-NHS ble det anvendt aminbindingskjemi. Kinetiske målinger ble utført i PBS (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 pH 7,4) ved en strømningsrate på 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ ved anvendelse av Fab-konsentrasjonsområde fra 1,5–500 nM. Injeksjonstid for hver konsentrasjon var 1 min, etterfulgt av 3 min dissosiasjonsfase. For regenerering ble det anvendt 2 x 5 μl 10 mM glycine pH 1,5. Alle sensogrammer ble tilpasset ved anvendelse av BIA-evalueringsprogramvare 3.1 (BIAcore).

Elektrokjemiluminescens (BioVeris)-basert bindingsanalyse for måling av affiniteten til sklerostinbindende Fab i lysater

For måling av affiniteten av sklerostinbindende antistofffragmenter i *E. coli*-lysater (BEL-ekstrakter) ble binding analysert på en BioVeris M-384 SERIES®-arbeidsstasjon (BioVeris Europa, Witney, Oxfordshire, UK).

Forsøket ble utført i 96-brønners polypropylenmikrotiterplater og PBS supplert med 0,5 % BSA og 0,02 % Tween 20 som assaybuffer. Biotinylert humant sklerostinprotein ble immobilisert på M-280 Streptavidin-paramagnetiske kuler (Dyna) ifølge leverandørens bruksanvisning. Det ble tilsatt 1:25 fortynning av kulestamløsningen per brønn. 100 μl fortynnet BEL-ekstrakt og kuler ble inkubert over natten ved romtemperatur på en rister. For detektering ble det anvendt anti-humant (Fab)'2 (Dianova) merket med BV-tag™ ifølge leverandørens bruksanvisning (BioVeris Europa, Witney, Oxfordshire, UK).

Tilfeldig valgte kloner ble analysert med fremgangsmåten beskrevet ovenfor. Klonene som ga de høyeste verdiene, ble valgt for videre analyse i løsningslikevektstitrering.

Bestemmelse av Fab-ers affinitet for sklerostin ved anvendelse av løsningslikevektstitrering (SET)

For KD-bestemmelse ble det anvendt monomere fraksjoner (minst 90 % monomert innhold, analysert ved analytisk SEC; Superdex75, Amersham Pharmacia) av Fab. Elektrokjemiluminescens (ECL)-basert affinitetsbestemmelse i løsning og dataevaluering ble i hovedsak utført som beskrevet av Haenel *et al.*, 2005. En konstant mengde av Fab (25 pM) ble ekvilibrert med forskjellige konsentrasjoner (3^n seriefortynninger) av umerket sklerostin fra menneske, mus eller cynomolgus-ape (startkonsentrasjon: 500 pM) i løsning. Biotinyllert humant sklerostin (0,5 µg/ml) bundet til paramagnetiske kuler (M-280 streptavidin, Dynal) og BV-tagTM (BioVeris Europa, Witney, Oxfordshire, UK)-merket anti-humant (Fab)'2-antistoff (Dianova) ble tilsatt og inkubert i 30 min. Konsentrasjonen av ubundet Fab ble deretter kvantifisert via ECL-detektering ved anvendelse av M-SERIES® 384-analysator (BioVeris Europe).

Affinitetsforbedrede Fab-kloner ble identifisert ved et ECL-basert BioVeris-assay for affinitetsscreening med høy gjennomstrømning. Etter treffseleksjon ble 4 subkloner konsolidert ved samme fremgangsmåte.

Assay for reseptorbindingsinhiberingsstyrke ved anvendelse av BioVerisTM

For det BioVerisTM-baserte assayet for bindingsinhiberingsstyrke ble rekombinant humant BMP-2 direkte bundet (NHS/EDC-kjemi) til M-270-magnetkuler med karboksylsyre (Dynal) ifølge leverandørens bruksanvisning. Assayet ble utført i 96-brønners polypropylenmikrotiterplate (Nunc). 50 µl/brønn renses Fab i assaybuffer (PBS + 1 % Tween 20 (strengt) eller 0,1 % Tween 20 (mindre strengt) + 1 % BSA) ble fortynnet i 1:3 fortynningstrinn (startkonsentrasjon: 1000 nM). 50 µl/brønn av biotinyllert humant sklerostin (4 nM) ble tilsatt i hver Fab-fortynning. Etter inkubering i 90 min og risting ved 400 o/min på en Eppendorf-termoblander ved 22 °C, ble 25 µl av de BMP-2-overtrukne kulene ($2,7 \times 10^7$ kuler per ml) og 1:500 fortynnet streptavidin merket med BV-tagTM ifølge leverandørens bruksanvisning (BioVeris Europa) tilsatt i hver brønn og inkubert i 30 min (800 o/min, 22 °C). Detektering ble utført med en BioVeris M-384 SERIES®-arbeidsstasjon (BioVeris Europa). For EC₅₀-bestemmelse ble det anvendt en 4-parameters logistisk tilpasningsmodell (XLfit, IDBS).

Produksjon av immunglobuliner

Konvertering til humant IgG1-format og humant/murint IgG2a-format

- 5 For å uttrykke IgG av full lengde ble variable domenefragmenter av tung- (VH) og lettkjeder (VL) subklonet fra Fab-ekspresjonsvektorer i egnede pMorph®Ig-vektorer: pMorph®_h_Ig1 og kimær human/murin pMorph®2_h/m_Ig2a. Restriksjonsenzymene *EcoRI*, *MfeI*, *BlpI* ble anvendt for subkloning av VH-domenefragmentet i henholdsvis pMorph®_h_IgG1 eller pMorph®2_h/m_IgG2a
- 10 og *EcoRV*, *BsiWI*, *HpaI* for subkloning av VL-domenefragmentet i pMorph®_h_Igκ, pMorph®_h_Igλ og pMorph®2_h/m_Igλ-vektorer. Restriksjonsenzymene *EcoRI*, *MfeI* og *BlpI* ble anvendt for subkloning av VH-domenefragmentet i pMORPH®_h_IgG1: Vektorhovedkjeden ble generert ved *EcoRI/BlpI*-fordøyelse og ekstraksjon av 6400 bp-fragmentet, mens VH-
- 15 fragmentet (350 bp) ble produsert ved fordøyelse med *MfeI* og *BlpI* og etterfølgende rensing. Vektor og innsats ble ligert via compatible overheng generert av henholdsvis *EcoRI*- og *MfeI*-fordøyselsene, og via *BlpI*-stedet. Derved destrueres både *EcoRI*- og *MfeI*-restriksjonsstedet.
- 20 Restriksjonsenzymene *MfeI* og *BlpI* ble anvendt for subkloning av VH-domenefragmentet i pMORPH®2_h/m_IgG2a. I denne nye genereringen av IgG-vektorer, ved andre modifiseringer, ble *EcoRI*-stedet (som bare tillot subkloning via compatible overheng) erstattet med *MfeI*-stedet, hvilket således ga mulighet for *MfeI/BlpI*-fordøyelse av begge, vektor og innsats.
- 25 Subkloning av VL-domenefragmentet i pMORPH®_h_Igκ ble utført via *EcoRV*- og *Bsi/WI*-stedene, mens subkloning i pMORPH®_h_Igλ og pMORPH®2_h/m_Igλ ble utført ved anvendelse av *EcoRV* og *HpaI*.

Kortvarig ekspresjon og rensing av humant IgG

HEK293- eller HKB11-celler ble transfektet med en ekvimolar mengde av tung- og lettkjede-ekspresjonsvektorer i IgG. På dag 4 eller 5 etter transfeksjon ble cellekultursupernatanten høstet. Etter justering av supernatantens pH til pH 8,0

og steril filtrering ble løsningen utsatt for standard protein A-kolonnekromatografi (Poros 20A, PE Biosystems).

Eksempel 1: Generering av humane og cynorekombinante sklerostinproteiner

cDNA-et av full lengde som koder for human sklerostinforløper (GenBank aks.nr. AF326739) med et naturlig signalpeptid (aa 1-213, NPL 005002), ble klonet i den mammalske ekspresjonsvektoren pRS5a ved insersjon i restriksjonsstedene Asp718 og Xba1. En proteindetekterings- og rensingstag (APP = EFRH) ble tilsatt til genets C-terminal.

Etter ekspresjonsverifikasjon i liten skala i kortvarig 6-brønners platettransfeksjonsassayer ble genereringen av stabile transfeksjonspooler initiert ved transfeksjon av fire pooler ($1,0 \times 10^6$ celler hver) ved lipofeksjon. 48 timer etter transfeksjon ble seleksjon av transfektanter startet ved tilsetning av antibiotikumet Zeocin™ ved 100 µg/ml konsentrasjon. Straks alle fire poolene hadde gjenopptatt normal vekst, ble rekombinante proteintitlere vurdert ved analytisk affinitetskromatografi på anti-APP HPLC, og den mestproduserende poolen – Pool2 – ble valgt for tilpasning til serumfritt medium og ytterligere oppskalering. Det ble også samtidig utført kortvarige ekspresjonsutprøvinger i stor skala på 10-I-skalaen ved anvendelse av polyetylenimin som bærer av plasmid-DNA under transfeksjon og Wave™-bioreaktorsystemet (C20SPS-F, art.nr. 100.001, Wave Biotech) som kultursystem. Cellekultursupernatantene av 12–22 ble høstet 7–10 dager etter transfeksjon og konsentrert ved krysstrømningsfiltrering og diafiltrering før rensing.

Humant SOST og cyno-SOST ble rensset ved immunaффinitetskromatografi. Batcher med 10–20 l vevskultursupernatanter ble kort konsentrert til 1–2 l ved krysstrømningsfiltrering (cut-off 10 kDa) og administrert ved 2 ml/min på en 50 ml anti-APP sefarose-kolonne fremstilt ved binding av det beskyttede monoklonale anti-Ab1-40/APP (6E10-A5) til CNBr-aktivert sefarose 4B ifølge produsentens bruksanvisning (10 mg antistoff per ml resin). Etter baseline-vasking med PBS ble bundet materiale eluert med 100 mM glysin, pH 2,7, nøytralisert og sterilt filtrert. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved A280 ved anvendelse av beregnede absorpsjonsfaktorer. De rensede proteinene ble til slutt

karakterisert ved SDS-PAGE, N-terminal sekvensering og LC-MS. En alikvot av rensset humant SOST ble biotinyleret i PBS i 1 time ved 37 °C ved anvendelse av 1 mM sulfo-NHS-Ic-biotin (Uptima; UP54398A). Overskuddsreagens ble deretter fjernet ved omfattende dialyse mot PBS.

5

E.coli-avledet humant SOST

His₆-PreScission-merket SOST aa24–213 (NPL006071, plasmid pXI504) og SOST aa24–213 (NPL006690, plasmid pXI515) ble produsert ved refolding. *E.coli* Tuner (DE3) ble transformert med ett av plasmidene.

10

Batch PSU5257 ble fermentert på en 20 liters vekt (V9405) ved anvendelse av modifisert TB-medium (versjon lab 112). Celler ble indusert ved en OD600 på 3,90 med 1 mM IPTG og indusert i 3,5 timer ved 37 °C. Høsting ble utført ved anvendelse av en kontinuerlig strømningsentrifuge, hvilket resulterte i en våtcellepellet med vekt på 190 g.

15

Batch PSU11274 ble fermentert på en 20 liters vekt i 16 l minimalt M9-1-medium supplert med ¹⁵N-merket ammoniumklorid. Celler ble indusert med 1 mM IPTG når en OD600 på 1,5 var nådd og høstet ved en OD600 på 3,3 ved anvendelse av en kontinuerlig strømningsentrifuge, hvilket resulterte i en våtcellepellet med vekt på 50 g.

20

Våtcellepelletter fra ovenstående gjæring ble lysert i 8 volum av 50 mM Tris pH 8,0 (inneholdende 5 mM hver EDTA, DTT og benzamidin-HCl) ved anvendelse av en Avestin C-50-emulgator og sentrifugert i 30 min ved 12 000 o/min. Supernatanten ble forkastet, og den resulterende pelleten ble resuspendert i 10 volum lysebuffer og sentrifugert på nytt. Prosessen ble gjentatt 3 ganger, hvoretter lysebufferen ble erstattet med Milli-Q-vann, inneholdende 5 mM DTT. Pelletene ble vasket ytterligere to ganger under disse betingelsene. Inklusjonslegemer ble oppløst i 8 M guanidin-HCl (inneholdende 100 mM DTT, 50 mM Tris pH 8 og 5 mM EDTA) i 3–4 h ved omgivelsestemperatur og deretter sentrifugert ved 20 000 o/min i 30 min og filtrert gjennom et 0,45 µm filter. Refolding ble initiert ved hurtigfortynning med 88 volum (PSU11274) og 92 volum (PSU5257) kjølt refoldingsbuffer (0,5 M Tris inneholdende 0,9 M arginin-HCl, 5 mM GSH og 0,5 mM GSSG pH 8). Løsningen ble oppbevart ved 4 °C i 1

25

30

35

uke. På dette stadiet ble de to fremstillingene behandlet litt forskjellig på grunn av kravet om å fjerne his₆-tagen fra PSU5257 før fullføring av refoldingen

PSU5257

5

Den fortynnede foldingsløsningen ble diafiltrert mot 1,5 volum av 50 mM Tris pH 8, 5 mM GSH, 0,5 mM GSSG ved konsentrasjon 2 ganger og deretter fortynning tilbake til det opprinnelige volumet. Dette ble utført 3 ganger, hvorefter PreScission-protease ble tilsatt og løsningen fikk stå i 48 h ved 4 °C. Alle konsentrasjoner/diafiltreringer ble utført ved anvendelse av en Pellicon II-ultrafiltreringskassett med en 10 KDa cut-off-membran. Løsningen ble til slutt konsentrert 10 ganger.

10

PSU11274

15

Den fortynnede refoldingsløsningen ble konsentrert 10 ganger. LC-MS ble anvendt for å bekrefte dannelsen av alle 4 disulfidbroene før konsentrasjon.

20

Begge fremstillingene ble deretter dialysert mot 2 x 10 volum av 50 mM natriumacetat pH 5. Etter suksessiv filtrering gjennom glassull og en 3,0 µm membran for å fjerne utfelt protein, ble rensing utført ved anvendelse av SP-Sepharose™ høytytelseskationebyttekromatografi. Kolonnen ble ekvibrert med dialysebufferen og deretter eluert med en 0–1 M NaCl-gradient i samme buffer over 20 kolonnevolum. Sklerostin eluerte som en enkelt topp med en lett skulder, som ble forkastet. Ved PSU5257 ble den viktigste toppen innsamlet, konsentrert og utsatt for størrelseseksklusjonskromatografi ved anvendelse av en kolonne av Superdex 75™, ekvibrert med 50 mM Tris, 150 mM NaCl. Med PSU11274 ble prøven tilveiebrakt direkte etter kationebytte.

25

30

Cyno-SOST cDNA (cySOST) ble amplifisert ved RT-PCR med primere basert på SOST-sekvensen fra afrikansk grønn marekatt (GenBank aksesjonsnr. AF326742). 5'-primeren (ATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTTGT) (SEQ ID NO: 170) tilsvarer N-terminalen av signalpeptidsekvensen og er ikke i det endelige utskilte proteinet; 3'-primeren (AATCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCTACTAG) (SEQ ID NO: 171) tilsvarer en region som er konserverert blant mennesker, afrikansk

35

grønn marekatt og mus. Det amplifiserte fragmentet ble subklonet inn i Bam HI/Eco RI-stedene i pcDNA3.1 (+), og sekvensen ble bekreftet. Dette plasmidet tjente videre som templat for en PCR-amplifikasjon av cyno-SOST for å tilsette en C-terminal APP-tag og attB-rekombinasjonssteder for endelig kloning i pDESTRS5a ifølge Gateway-teknologien [cySOST-pDESTRS5a].

Ekspresjon ble utført ved kortvarig transfeksjon i stor skala ved 10 l skalaen i Wave™-bioreaktorsystemet, høstet 9 dager etter transfeksjon og rensset som beskrevet ovenfor.

Eksempel 2: Generering av humane sklerostinspesifikke antistoffer fra HuCAL GOLD®-biblioteket

Terapeutiske antistoffer mot humant sklerostinprotein ble generert ved seleksjon av kloner som har høy bindingsaffinitet, ved anvendelse som kilde til antistoffvariantproteiner av et kommersielt tilgjengelig fagvisningsbibliotek, MorphoSys HuCAL GOLD®-biblioteket. HuCAL GOLD®-biblioteket er et Fab-bibliotek (Knappik *et al.*, 2000) i hvilket alle seks CDR-er varieres ved egnet mutasjon, og som benytter CysDisplay™-teknologien for å binde Fab-et til fagoverflaten (WO01/05950, Löhning *et al.*, 2001).

Seleksjon ved panorering av sklerostinspesifikke antistoffer fra biblioteket

For seleksjon av antistoffer som gjenkjenner humant sklerostin, ble det anvendt flere panoreringsstrategier.

HuCAL GOLD®-antistoffag ble kort delt i tre pooler omfattende forskjellige VH-hovedgener.

Disse poolene ble individuelt utsatt for enten

a) en fastfasepanorering hvor antigenene (humant og murint sklerostin) ble direkte overtrukket på Maxisorp 96-brønners mikrotiterplater (Nunc, Wiesbaden, Tyskland) eller

b) en innfangings- og semiløsningspanorering hvor antigenet (biotinyllert sklerostin), respektive fagantigenkomplekset, ble innfanget på klare N/A-strimler eller

5 c) en løsningspanorering med biotinyllert sklerostin hvor fagantigenkomplekset ble innfanget ved streptavidinmagnetkuler (Dynabeads M-280; Dynal) for hver panoreringspool.

• Fastfasepanorering på sklerostin

10 For den første panoreringsrunden på sklerostin ble brønner på Maxisorp-platen overtrukket over natten med 300 µl (5 µg/ml) humant sklerostin (produsert i HEK-celler) fortynnet i PBS. Etter to vasketrinn, med 400 µl PBS, ble brønnene inkubert med blokkeringsbuffer inneholdende 5 % melkepulver fortynnet i PBS.

15 Før seleksjonene ble HuCAL GOLD®-fag forhåndsadsorbent i blokkeringsbuffer (5 % melkepulver/PBS, 0,5 % Tween 20) i 2 h ved romtemperatur for å unngå uspesifikk seleksjon av antistoffer.

20 Etter vasking (2 x 400 µl PBS) av den overtrukne og blokkerte Maxisorp-platen ble 300 µl av de forhåndsadsorberte fagene tilsatt i de overtrukne brønnene og inkubert i 2 h ved romtemperatur ved forsiktig risting. Denne inkuberingen ble etterfulgt av 10 vaskesykluser med PBS og PBS / 0,05 % Tween 20 ved romtemperatur. Bundne fag ble eluert ved tilsetning av 300 µl 20 mM DTT i 10 mM Tris / HCl pH 8,0 per brønn i 10 min ved romtemperatur. Eluatet ble
25 fjernet og tilsatt i 15 ml *E. coli* TG1F⁺-celler dyrket til en OD_{600 nm} på 0,6–0,8. Faginfeksjon av *E. coli* ble tillatt i 45 min ved 37 °C uten risting. Etter sentrifugering i 5 min ved 4120 xg ble de bakterielle pelletene hver resuspendert i 600 µl 2xYT-medium, plassert på LB-CG agarplater og inkubert over natten ved 30 °C. Kolonier ble deretter skrapet av platene, og fag ble reddet og amplifisert.

30 De andre og tredje seleksjonsrundene ble utført på en måte identisk med den første seleksjonsrunden, hvor den eneste forskjellen var at vaskebetingelsene etter binding av fag var strengere. I den andre seleksjonsrunden for noen panoreringsbetingelser ble murint sklerostin anvendt som antigen for å anrike
35 for murine kryssreaktive antistoffer. For noen panoreringsbetingelser ble en annen batch av humant rekombinant sklerostin (produsert i *E.coli*) overtrukket.

• Semiløsningspanorering på sklerostin

To forskjellige fremgangsmåter ble utført for denne typen av panorering: en prosedyre for innfangingssemiløsningspanorering og standardsemiløsningspanorering.

For innfangingssemiløsningspanorering på biotinyllert sklerostin ble nærmere bestemt 100 µl av antigenet overtrukket 2 h ved romtemperatur på NeutrAvidin (N/A)-klare strimler (fra Pierce, aktiveringsnivå 100 µl, bindingskapasitet 15 pmol per brønn). N/A-strimlene ble blokkert over natten ved 4 °C med 200 µl Chemiblock og vasket to ganger med PBS.

Den blokkerte fagløsningen (Chemiblock / 0,05 % Tween 20) ble tilsatt i blokkerte N/A-brønner i 30 min, og dette trinnet ble gjentatt i enda 30 min for å fjerne NeutrAvidin-bindemiddel. De forhåndsrensede fagene ble deretter overført til det biotinyllerte sklerostinet immobilisert på N/A-klare strimler, forseglet med folie og inkubert over natten ved romtemperatur ved risting.

Neste dag ble fagløsningen fjernet fra de antigenovertrukne brønnene, og brønnene ble vasket.

For standardsemiløsningspanoreringen ble de blokkerte (Chemiblock / 0,05 % Tween 20), forhåndsrensede fagene tilsatt i et nytt forhåndsblokkert 1,5 ml reaksjonsrør (Chemiblock / 0,05 % Tween 20), og deretter ble biotinyllert humant sklerostin tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 100 nM og inkubert over natten ved romtemperatur ved risting.

Neste dag ble fagantigenløsningen fra 1,5 ml-reaksjonsrøret tilsatt i nye blokkerte brønner på NeutrAvidin-strimlene, fikk binde i 30 min ved romtemperatur og ble deretter vasket.

For begge panoreringsprosedyrene ble bundne fag eluert etter vasking ved tilsetning av 300 µl 20 mM DTT i 10 mM Tris / HCl pH 8,0 per brønn i 10 min ved romtemperatur. Eluatet ble fjernet og tilsatt i 15 ml *E. coli* TG1-celler dyrket til en OD_{600 nm} på 0,6–0,8. Faginfeksjon av *E. coli* ble tillatt i 45 min ved 37 °C uten risting. Etter sentrifugering i 5 min ved 4120 xg ble de bakterielle pelletene hver resuspendert i 600 µl 2xYT-medium, plassert på LB-CG agarplater og inkubert

over natten ved 30 °C. Kolonier ble deretter skrappt av platene, og fag ble reddet og amplifisert.

5 De andre og tredje seleksjonsrundene ble utført på en måte identisk med den første seleksjonsrunden, hvor den eneste forskjellen var at vaskebetingelsene etter binding av fag var strengere.

• Løsningspanorering på sklerostin

10 For denne panoreringstypen ble 200 µl streptavidinmagnetkuler (Dynabeads M-280; Dynal) vasket én gang med PBS og blokkert med Chemiblock i 2 h ved romtemperatur. 500 µl av fag ble blokkert med Chemiblock i 1 h ved RT-rotasjon. De blokkerte fagene ble to ganger forhåndsadsorbert mot 50 µl blokkerte streptavidinmagnetkuler i 30 min. Fagsupernatanten ble overført til et
15 nytt blokkert 2 ml reaksjonsrør, og forskjellige konsentrasjoner av humant biotinyler sklerostin ble tilsatt (se tabell 5, 6 og 7) og inkubert i 1 h ved RT-rotasjon. 100 µl av de blokkerte streptavidinmagnetkulene ble tilsatt i hver panoreringspool og inkubert i 10 min på en rotator. Kulene ble innsamlet med en partikkelseparator (Dynal MPC-E) i ca. 2,5 min, og løsningen ble forsiktig fjernet.

20 Etter vaskesyklusene (tabell 2) ble bundne fag eluert ved tilsetning av 300 µl 20 mM DTT i 10 mM Tris / HCl pH 8,0 per brønn i 10 min ved romtemperatur. Eluatet ble fjernet og tilsatt i 15 ml *E. coli* TG1 F⁺-celler dyrket til en OD_{600 nm} på 0,6–0,8. Faginfeksjon av *E. coli* ble tillatt i 45 min ved 37 °C uten risting. Etter
25 sentrifugering i 5 min ved 4120 xg ble de bakterielle pelletene hver resuspendert i 600 µl 2xYT-medium, plassert på LB-CG agarplater og inkubert over natten ved 30 °C. Kolonier ble deretter skrappt av platene, og fag ble reddet og amplifisert.

30 De andre og tredje seleksjonsrundene ble utført på en måte identisk med den første runden, hvor den eneste forskjellen var at vaskebetingelsene etter binding av fag var strengere. Antigenkonsentrasjonen ble redusert i den andre og tredje seleksjonsrunden for noen panoreringsbetingelser.

Subkloning og ekspresjon av valgte Fab-fragmenter

Mikroekspresjon av valgte Fab-fragmenter

For å lette hurtig ekspresjon av løselige Fab-er ble Fab-et som koder for innsatsene av de valgte HuCAL GOLD®-fagene, subklonet via XbaI og EcoRI fra den respektive visningsvektoren i *E. coli*-ekspresjonsvektoren pMORPH®X9_MH (Rauchenberger *et al.*, 2003). Etter transformasjon av ekspresjonsplasmidene til *E. coli* TG1 F⁻celler ble kloramfenikolresistente enkeltkloner valgt i brønnene med en steril 96-brønners mikrotiterplate forhåndsfylt med 100 µl 2xYT-CG-medium og dyrket over natten ved 37 °C. 5 µl av hver *E. coli* TG-1-kultur ble overført til en fersk, steril 96-brønners mikrotiterplate forhåndsfylt med 100 µl 2xYT-medium supplert med 34 µg/ml kloramfenikol og 0,1 % glukose per brønn. Mikrotiterplatene ble inkubert ved 30 °C og ristet ved 400 o/min på en mikrotiterplate inntil kulturene ble lett turbide (□2–4 h) med en OD_{600 nm} på □0,5. Til disse ekspresjonsplatene ble det tilsatt 20 µl 2xYT-medium supplert med 34 µg/ml kloramfenikol og 3 mM IPTG (isopropyl-β-D-tiogalaktopyranosid) per brønn (sluttkonsentrasjon: 0,5 mM IPTG), mikrotiterplatene ble forsegleet med en gasspermeabel tape, inkubert over natten ved 30 °C og ristet ved 400 o/min.

Generering av helcellelysater (BEL-ekstrakter): I hver brønn på ekspresjonsplatene ble det tilsatt 40 µl BEL-buffer, som ble inkubert i 1 h ved 22 °C på en mikrotiterplate (400 o/min).

Ekspresjon og rensing av HuCAL®-Fab-antistoffer i *E. coli*

Ekspresjon av Fab-fragmenter kodet av pMORPH®X9_Fab_MH i *E. coli* TG1 F⁻celler i større skala ble utført i ristekolbekulturer ved anvendelse av 750 ml 2xYT-medium supplert med 34 µg/ml kloramfenikol. Kulturene ble ristet ved 30 °C inntil OD_{600 nm} nådde 0,5. Fab-ekspresjon ble indusert ved tilsetning av 0,75 mM IPTG (isopropyl-β-D-tiogalaktopyranosid) og dyrket i ytterligere 20 h ved 30 °C. Cellene ble høstet og avbrutt ved anvendelse av lysozym, og Fab-fragmenter ble isolert på Ni-NTA-kromatografi. Den tilsynelatende molekylvekten ble bestemt ved størrelseseksklusionskromatografi (SEC) med kalibreringsstandarder. Konsentrasjoner ble bestemt ved UV-spektrofotometri (Krebs *et al.*, 2001).

Eksempel 2: Identifisering av sklerostinspesifikke HuCAL®-antistoffer

Enzymbundet immunsorbentassay (ELISA) for detektering av sklerostinbindende Fab-er på direkte overtrukket sklerostin

Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) 384-brønners plater ble overtrukket med 20 µl av 2,5 µg/ml antigen (humant sklerostin – produsert i HEK-celler, humant sklerostin – produsert i *E.coli*-celler og murint sklerostin) i PBS, pH 7,4 over natten ved 4 °C.

Platene ble blokkert med PBS / 0,05 % Tween 20 (PBST) inneholdende 5 % melkepulver i 1 h ved romtemperatur. Etter vasking av brønnene med PBST ble BEL-ekstrakt, rensed HuCAL GOLD®-Fab-er eller kontroll-Fab-er fortynnet i PBS tilsatt i brønnene og inkubert i 1 h ved romtemperatur. For å detektere de primære antistoffene ble følgende sekundære antistoffer administrert: alkalisk fosfatase (AP)-konjugert AffiniPure F(ab')₂-fragment, anti-humant, anti-murint IgG fra geit (Jackson ImmunoResearch). For detekteringen av AP-konjugater ble fluorogene substrater, som AttoPhos (Roche), anvendt ifølge produsentens bruksanvisning. Mellom alle inkuberingstrinnene ble brønnene på mikrotiterplaten vasket med PBST tre ganger og fem ganger etter den endelige inkuberingen med det sekundære antistoffet. Fluorescens ble målt i en TECAN Spectrafluor-plateleser.

Innfangingscreening med biotinyllert sklerostin

Denne typen av ELISA ble anvendt for å screene for HuCAL GOLD®-Fab-er etter progresjonsløsningspanoreringer.

Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) 384-brønners plater ble overtrukket med 20 µl 5 µg/ml anti-humant IgG fra sau, Fd-fragmentspesifikk (The Binding Site, Birmingham, UK), fortynnet i PBS, pH 7,4.

Etter blokkering med 3 % BSA i TBS, 0,05 % Tween 20 i 2 h ved romtemperatur ble periplasmiske ekstrakter eller rensede HuCAL GOLD®-Fab-er tilsatt og

inkubert 1 h ved romtemperatur. Etter vasking av platene fem ganger med PBST ble 20 µl biotinylert sklerostin for spesifikk binding eller biotinylert transferrin for uspesifikk binding tilsatt i brønnene.

5 Det biotinylerte antigensklerostinet fikk deretter binde til innfangede HuCAL®-Fab-fragmenter. Og etter vasking ble det inkubert med streptavidin (Zymex) konjugert til alkalisk fosfatase. For detektering av AP-streptavidin ble fluorogene substrater, slik som AttoPhos (Roche), anvendt ifølge produsentens bruksanvisning (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland). Fluorescensemisjon
10 ved 535 nm ble registrert med magnetisering ved 430 nm.

Resultater:

Etter panoreringene ble de anrikede fagpoolene subklonet fra pMORPH®23-bibliotekvektoren (hvilket muliggjør rasjonell antistoffvisning på fagoverflaten) i
15 pMORPH®X9_Fab_MH-ekspresjonsvektoren som medierer periplasmisk ekspresjon av løselige Fab-er. Enkelte kloner ble valgt, og løselige Fab-er ble uttrykt fra disse enkelte klonene. Til sammen ble □4600 kloner analysert i primær screening som ble utført ved binding av Fab-ene direkte fra de
20 bakterielle lysatene til humant og murint sklerostin immobilisert på Maxisorp mikrotiterplater eller ved innfangning av Fab-er via anti-Fd-antistoff til Maxisorp-mikrotiterplater etterfulgt av binding av biotinylert humant sklerostin. Detektering ble utført i ELISA etter merking med et alkalisk fosfatase-merket anti-humant (Fab)'₂-antistoff eller ved anvendelse av streptavidinalkalifosfatase.

25 Treff oppnådd fra den primære screeningen på rekombinant sklerostin med signaler > 5 ganger over bakgrunn ble ytterligere analysert for binding til humant HEK og *E.coli*-sklerostin og til murint sklerostin enten direkte overtrukket eller i løsning ved anvendelse av biotinylert sklerostin. Treff som
30 gjenkjenner alle sklerostinderivater, ble valgt og sekvensert.

Karakterisering av HuCAL GOLD®-Fab-er

Affinitetsbestemmelse ved anvendelse av Biacore

For ytterligere å karakterisere antistoffene mot sklerostin ble affiniteten til humant, muse- og cynomolgus-sklerostin bestemt. Det rekombinante sklerostinproteinet ble immobilisert på en CM5 Biacore-brikke, og Fab-ene ble administrert i mobilfasen i forskjellige konsentrasjoner. For en pålitelig bestemmelse av monovalent affinitet ble bare slike Fab-batcher anvendt for Biacore-målinger som viste $\geq 90\%$ monomer fraksjon i en kvalitativ størrelseseksklusjonskromatografi.

Affinitet for rekombinant sklerostin fra menneske, cynomolgus-ape og mus ble bestemt i Biacore. Affiniteten går fra subnanomolar til over 500 nM på sklerostin fra menneske, til nesten 5000 nM på sklerostin fra cynomolgus ape og til 4500 nM på sklerostin fra mus.

Eksempel 3: Identifisering av anti-humane sklerostin-Fab-kandidater som inhiberer sklerostinbinding til immobilisert BMP-2 ved anvendelse av BioVeris[™]-innretningen

Alle genererte og rensede Fab-er ble testet i det BioVeris-baserte assayet for bindingsinhiberingsstyrke for sin evne til å inhibere sklerostinbinding til rekombinant humant BMP-2. To forskjellige strenghetsbetingelser (0,1 % sammenlignet med 1 % Tween 20 i buffersystem) ble testet. 9 av 27 Fab-er var i stand til å inhibere sklerostinbinding til immobilisert BMP-2 under strenge bufferbetingelser.

Eksempel 4: Reversjon av sklerostininhibering av BMP-2-indusert ALP-produksjon i MC3T3-celler.

IgG-konverteringer av parentale bindemiddel og karakterisering av IgG

21 kandidater ble konvertert til det humane IgG1-formatet ved subkloning i henholdsvis pMORPH[®]_h_IgG1-ekspresjonsvektoren og de tilsvarende lettkjedekonstruksjonene av pMORPH[®]_h_Ig-vektoreriene. Ekspresjon ble utført ved kortvarig transfeksjon av HEK293- eller HKB11-celler, og immunglobulinene av full lengde ble rensset fra cellekultursupernatanten. Funksjonaliteten til IgG1-

er etter rensing ble vurdert ved ELISA-binding til immobilisert sklerostin fra menneske, mus og cynomolgus-ape.

IgG-er i primært bioassay

5

Alle rensede hIgG-er ble titrert og testet i ALP-assayet. Assayet var pålitelig med hensyn til BMP-2 sklerostininhibering, men de valgte kandidatene kunne ikke vise sklerostininhibering i alle forsøkene (assay-til-assay-aktivitetsvariasjon, plate-til-plate-variasjon, høy varians innenfor triplikate brønner). Det var derfor

10

Eksempel 5: Affinitetsmodning av valgte anti-sklerostin-Fab-er ved parallelt bytte av LCDR3- og HCDR2-kassetter

15

Resultatene av testing av IgG-ene i ALP-assayet tillot bare en rangering. Fra denne rangeringen ble 4 Fab-er valgt ved høy risiko for affinitetsmodning. Alle produktkandidatene er valgt for å optimaliseres som enkle produktkandidater i L-CDR3 og H-CDR2.

20

For å øke de fire valgte antistofffragmentenes affinitet og biologiske aktivitet ble LCDR3- og HCDR2-regioner optimalisert parallelt ved kassettmutagenese ved anvendelse av rettet mutagenese (Virnekas *et al.*, 1994), hvorved strukturregionene ble holdt konstante. Før kloning av modningsbibliotekene ble alle parentale Fab-fragmenter overført fra ekspresjonsvektoren pMORPH[®]x9_MH til CysDisplay[™]-modningsvektoren pMORPH[®]25 via *Xba*I/ *Eco*RI-restriksjonsstedene. Denne vektoren tilveiebringer fagproteinet pIII fusjonert N-terminalt til en cysteinrest samt et C-terminalt cystein fusjonert til Fd-antistoffkjeden og muliggjør således disulfidbundet visning av de respektive Fab-fragmentene på fagoverflaten.

25

30

For generering av HCDR2-bibliotekene ble HCDR2-regionen av hver parentale Fab eksidert og erstattet med en 590 bp stuffer. Denne DNA-stufferen letter separeringen av enkeltfordøyde fra dobbeltfordøyde vektorbånd og reduserer bakgrunnen for de parentale Fab-ene med høy affinitet under modningspanoreringene. I et etterfølgende trinn ble stufferen eksidert fra Fab-et

35

som koder for plasmider av hvert parental-klon og erstattet med den svært diversifiserte HCDR2-modningskassetten.

5 LCDR3-regionen i fem av de fire parental-klonene ble parallelt erstattet med en diversifisert LCDR3-modningskassett uten mellomliggende kloning av en stuffer.

Modningsbibliotekenes størrelse var mellom 1×10^7 og 4×10^8 kloner med en kloningsbakgrunn under 1 %, og kvalitetskontroll ved sekvensering viste en god kvalitet for hvert bibliotek. Bare LCDR3-biblioteket av parental-klon MOR04520
10 hadde en lav størrelse ($< 10^6$) og mange ukorrekte kloner og ble derfor ikke inkludert i modningspanoreringene.

For hvert LCDR3- og HCDR2-modningsbibliotek ble antistoffvisende fag fremstilt og fagtitere bestemt ved punkttitrering.
15

Panoreringsstrategier for affinitetsmodning

De antistoffvisende fagene fra følgende modningsbiblioteker ble utsatt for separate panoreringer og screeninger:

20 Kandidat 1: MOR04518 (L-CDR3-modning)

Kandidat 1: MOR04518 (H-CDR2-modning)

Kandidat 2: MOR04520 (H-CDR2-modning)

Kandidat 3: MOR04532 (L-CDR3-modning)

Kandidat 3: MOR04532 (H-CDR2-modning)

25 Kandidat 4: MOR04799 (L-CDR3-modning)

Kandidat 4: MOR04799 (H-CDR2-modning)

For hvert kandidatbibliotek ble det utført tre forskjellige panoreringer. For hver panoreringsstrategi ble det anvendt forskjellige strenghetsbetingelser. For å øke panoreringsstrengheten og for å velge for forbedrede off-rater ble det utført
30 omfattende vasking og konkurranse med rensset parental Fab eller med løselig rekombinant sklerostin. Etter modningspanoreringene ble de anrikede fagemidpoolene subklonet i pMORPH@x9_MH-ekspresjonsvektoren. Ca. 2900 enkeltkloner ble valgt, og Fab-er ble uttrykt ved induksjon med IPTG.

BioVeris™-affinitetsrangering og -screening for forbedret affinitet

5 For identifisering av affinitetsforbedrede sklerostinspesifikke Fab-er ble de bakterielle lysatene av □2900 enkeltkloner fortynnet og kontrollert for Fab-binding til biotinyleret humant sklerostin immobilisert på streptavidinovertrukne kuler. Bindingen ble analysert med en BioVeris-arbeidsstasjon. De klonene som gir de høyeste signalene, indikerer forbedret affinitet og ble derfor valgt for videre analyse ved løsningslikevektstitrering.

10

176 enkeltkloner ble valgt for dette formålet, og foreløpig affinitet ble bestemt via 4-punkts løsningslikevektstitrering (SET) i BioVeris. Fra disse dataene ble det valgt 24 kloner som viste den beste affiniteten. Disse Fab-ene ble rensset i mg-skalaen.

15

Sluttaffinitet ble bestemt ved anvendelse av en 8-punkts SET-måling og sklerostin fra menneske, mus og cynomolgus-ape.

Optimaliserte Fab-er i primært bioassay

20

De optimaliserte Fab-ene ble testet i det cellulære ALP-assayet. Flesteparten av dem var inaktive; og variabel reversering av sklerostininhibering ble observert ved noen Fab-er. En seleksjon av kloner ble derfor konvertert til humant/murint IgG2a-format og testet i samme assay. Men disse klonene i det humane/murine IgG2a-formatet kunne ikke fullstendig reversere sklerostininhibering, og det ønskede EC₅₀ (< 10 nM)-kriteriet kunne ikke nås. Den best modnede kandidaten, MOR05177 (VL modnet fra parentalt MOR04518), viste ved 50 nM Fab eller ved 140–467 nM humant/murint IgG2a 75–85 % gjenoppretting av ALP-signalet.

25

30

Eksempel 6: Identifisering av antistoffer mot sklerostin fra parentale og optimaliserte Fab-er og IgG-er i et nytt primært bioassay

Basert på nye publikasjoner (Wu *et al.* JBC 2005, He *et al.* JBC 2005, Bezooyen *et al.* ASBMR 2005, Winkler *et al.* JBC 2005), som viser at sklerostin påvirker Wnt-signalering direkte eller indirekte, ble et nytt funksjonelt bioassay utviklet.

5 Dette assayet er basert på sklerostins evne til å inhibere Wnt1-mediert aktivisering av STF i HEK293-celler.

10 I dette assayet ble det foretatt testing av alle Fab-ene identifisert i de initielle screeningene pluss alle Fab-ene identifisert i affinitetsmodningen. Det ble tydelig at den økte affiniteten til modnede Fab-er ble reflektert i økt styrke og effekt i wnt-1-assayet.

15 Testing av alle parentale Fab-er identifiserte to ytterligere antistoffer som lovende templatere for en ytterligere affinitetsmodning. Figur 1 viser aktiviteten av MOR05813_IgG2lambda, ett av de sterkeste antistoffene identifisert i wnt-1-assayet.

Eksempel 7: Karakterisering av parentale og affinitetsmodnede Fab-er i andre bioassay

20

Aktivitet av parentale og affinitetsmodnede Fab-er i mineraliseringsassay

25 Mineraliseringsassayet er basert på MC3T3-cellers evne til å danne en mineralisert matrise, hvilket indikerer deres kapasitet til å gjennomgå osteogen differensiering. En sterk mineralisering ($> 1 \mu\text{g}$ kalsium avleiret per brønn (96-brønnersformat)) ble målt etter 14 dager ved alle testede BMP-2-konsentrasjoner. Tilsetningen av økende sklerostinkonsentrasjoner induserte en doseavhengig inhibering av den BMP-2 (2,1 nM)-induserte mineraliseringen (IC₅₀: 120 nM) (data ikke vist).

30

Figur 2 viser et eksempel på mineralisering i nærvær av MOR05813_Fab. Antistoffet kunne gjenopprette BMP-2-indusert mineralisering til maksimalt 80 % av den initielle responsen, mens et anti-lysozym-Fab anvendt som negativ kontroll hadde ingen effekt.

35

Aktivitet av parentale og affinitetsmodnede Fab-er i LRP6 / sklerostin-ELISA

5 LRP6 / sklerostin-ELISA er basert på sklerostins evne til å binde LRP6. For ytterligere å karakterisere de produserte Fab-ene ble en seleksjon av Fab-er og IgG-er testet i dette assayet. I nærvær av et antistoff mot anti-sklerostin fra R&D (1000 ng/ml = 7 nM) ble sklerostin (0,9 nM) som binder til LRP6, inhibert ved 68 % sammenlignet med kontroll (data ikke vist).

10

MOR05813_IgG2 lambda inhiberte sklerostinbinding til LRP6 opptil 90 % ved 90 nM, mens et anti-lysozym-IgG anvendt som negativ kontroll hadde ingen effekt på sklerostinbinding til LRP6 (figur 3).

15

Aktivitet av parentale og affinitetsmodnede Fab-er i fosfo-Smad1-assay

Fosfo-Smad1-assayet (Western) er basert på BMP-6s evne til å indusere Smad1-fosforylering innen 15 minutter i MC3T3-E1-celler. MOR05318_IgG2 lambda inhiberte sklerostinvirkning på BMP-6-indusert Smad1-fosforylering med en EC₅₀ på 115 nM og gjenopprettet Smad1-fosforylering til maksimalt 66 % av den BMP-6-induserte fosforyleringen. Det negative kontroll-anti-lysozym-IgG (IgG C) hadde ingen effekt (figur 4).

20

Eksempel 8: Effekt av LRP4, en hittil ukjent SOST-interaksjonspartner, på anti-SOST-antistoffets aktivitet

25

Med unntak av LRP4 siRNA e påvirket ikke LRP4 mRNA-knockdown STF-aktivitet i fravær av SOST. Det reduserte imidlertid SOSTs evne til å inhibere STF-aktivitet mellom 10 og 30 %. Dette var tilfellet for alle fem siRNA testet alene (figur 5A) eller i forskjellige kombinasjoner (data ikke vist). Ved overekspresjon reduserte LRP4 SOST IC₅₀ med 5 og 16 ganger i henholdsvis HEK og c28a2 supertopflash-assayet (figur 5B og C). Denne effekten ble spesifikk på den måten at overuttrykt LRP4 hadde ingen effekt på DKK1 IC₅₀. Knockdown av LRP4 (siRNA) reduserte den inhiberende effekten av SOST i Wnt-1-indusert STF, mens

30

det ikke reduserte den inhiberende effekten av DKK1 (figur 5D). LRP4 reduserte i sin tur anti-SOST-antistoffets virkning ved økning av MOR05813_IgG2a EC₅₀ fra 17,2 nM til 30 nM (figur 5E). Disse dataene antyder at LRP4 tilrettelegger for SOST-virkning.

5

Eksempel 9: Ny modning

For å øke affinitet og biologisk aktivitet av to nylig valgte antistoffragmenter basert på resultatene oppnådd fra bioassayet ble LCDR3- og HCDR2-regioner optimalisert parallelt ved kassettmutagenese ved anvendelse av rettet mutagenese (Virnekas *et al.*, 1994), hvorved struktureregionene ble holdt konstante. Før kloning av modningsbibliotekene ble alle parentale Fab-fragmenter overført fra ekspresjonsvektoren pMORPH[®]X9_MH til CysDisplay[™]-modningsvektoren pMORPH[®]25 via *Xba*I/ *Eco*RI-restriksjonsstedene. Denne vektoren tilveiebringer fagproteinet pIII fusjonert N-terminalt til en cysteinrest samt et C-terminalt cystein fusjonert til Fd-antistoffkjeden og muliggjør således disulfidbundet visning av de respektive Fab-fragmentene på fagoverflaten.

For generering av HCDR2-bibliotekene ble HCDR2-regionen i hver parentale Fab eksidert og erstattet med en 590 bp stuffer. Denne DNA-stufferen letter separeringen av enkeltfordøyde fra dobbeltfordøyde vektorbånd og reduserer bakgrunnen for de parentale Fab-ene med høy affinitet under modningspanoreringene. I et etterfølgende trinn ble stufferen eksidert fra Fab-et som koder for plasmider av hvert parental-klon og erstattet med den svært diversifiserte HCDR2-modningskassetten.

LCDR3-regionen i fem av de fire parental-klonene ble parallelt erstattet med en diversifisert LCDR3-modningskassett uten mellomliggende kloning av en stuffer.

Modningsbibliotekenes størrelse var mellom 2×10^7 og 2×10^8 kloner med en kloningsbakgrunn under 1 %, og kvalitetskontroll ved sekvensering viste en god kvalitet for hvert bibliotek. For hvert LCDR3- og HCDR2-modningsbibliotek ble antistoffvisende fag fremstilt og fagtitere bestemt ved punkttitrering.

Panoreringsstrategier for ytterligere affinitetsmodning

De antistoffvisende fagene fra følgende modningsbiblioteker ble utsatt for separate panorerings- og screenings-

Kandidat 1: MOR04525 (L-CDR3-modning)

5 Kandidat 1: MOR04525 (H-CDR2-modning)

Kandidat 2: MOR04529 (L-CDR3-modning)

Kandidat 2: MOR04529 (H-CDR2-modning)

10 For hvert kandidat- eller poolbibliotek ble det utført tre forskjellige panoreringsstrategier, for hver panoreringsstrategi ble det anvendt forskjellige strenghetsbetingelser. For å øke panoreringsstrengheten og for å velge for forbedrede off-rater ble konkurranse med løselig rekombinant sklerostinprotein utført under forlengede inkuberings- og vaskeperioder.

15 Etter panoreringene ble de anrikede fagpoolene subklonet i pMORPH[®]X9_MH-ekspresjonsvektoren. Ca. 1600 enkeltkloner ble valgt, og Fab-er ble uttrykt ved induksjon med IPTG.

20 Affinitetskriteriet på < 100 pM for humant sklerostin ble oppfylt for derivater av begge parentale Fab-er. Den nødvendige kryssreaktiviteten med sklerostin fra cynomolgus-ape og med sklerostin fra mus på < 500 pM ble oppfylt for derivater av begge parentale Fab-er. MOR04525 ga flere kloner som har høyere affinitet for alle tre artene.

25 **Eksempel 10: Karakterisering av antistoffer mot sklerostin i in vivo-studier**

30 Åtte måneder gamle OF1/IC-hunnmus ($n = 16$ /gruppe, Charles River, Frankrike) fikk to ganger ukentlig intravenøst administrert antistoff mot sklerostin MOR05813 (24,5 mg/kg, mlgG2a) eller isotypekontrollantistoff (anti-PC-mlgG2a). Kontrollgrupper fikk enten daglig subkutan 100 mikrog/kg PTH(1–34) eller vehikkel (PBS + 0,1 % BSA). Behandlingen varte i 2,5 uker for alle dyr. Halvparten av dyrene ($n = 8$ / gruppe) ble avlivet på dette tidspunktet for histomorfometrisk analyse. Disse dyrene hadde mottatt fluorokrommarkører 10

og 3 dager før nekropsi for histomorfometrisk evaluering av bendannelsesdynamikk. Behandlingen fortsatte for resten av dyrene (n = 8 / gruppe) i opptil 5 uker.

5 Dyrene ble overvåket for endringer i benmasse, -densitet og -geometri. *Perifer kvantitativ computertomografi [pQCT]* *In vivo* viste at MOR05177 er sterkt benanabole i den proksimale tibia hos eldre mus, hvilket øker benmineralinnhold (figur 6) og -densitet (figur 7). Den benanabole effekten forekom både i det kortikale (figur 8) og spongiøse (figur 9) benkompartimentet. Disse dataene
10 antyder at den observerte inhiberende effekten av MOR05813 på sklerostinvirkning i Wnt-signaleringsreporterassayet i ikke-osteoblastceller forskyves til induksjon av bendannelsesresponser på grunn av sklerostininhibering *in vivo*. Omfanget av den benanabole responsen hos mus var sammenlignbar med benanabolisme indusert ved en høy dose av hPTH(1–
15 34).

MicroCT-analyse viste økninger i trabekulært benvolum (figur 9) hovedsakelig knyttet til en fortykning av trabekulære benstrukturer som stemmer overens med benanabolisme (figur 10).

20 Benmineraldensiteten økte ytterligere hos dyr som ble behandlet i opptil 5 uker (figur 11). Benmineraldensitet som evaluert *ex vivo* ved DEXA ble økt i det appendikulære (tibia, femur) og aksiale (lendevirvel) skjelettet (figur 12–14). Effekten var sammenlignbar med den målt i den positive kontrollgruppen
25 behandlet daglig med 100 mikrog/kg hPTH(1–34).

Histomorfometriske fluorokrommarkørbaserte analyser av bendannelsesdynamikk viste at benmasseøkningen skyldtes en vesentlig økning i bendannelsesrater i det appendikulære (figur 15) og aksiale skjelettet (figur 18). Effektene var sammenlignbare med dem for en høy dose av PTH(1–34). Økninger i bendannelsesrater ble både knyttet til økninger i mineralapposisjonsrater (figur 16) og mineraliseringsoverflate (figur 17). Benresorpsjonen ble ikke økt ved behandling som vist ved osteoklastoverflatemåling (figur 19).

35

Eksempel 11: Screening av antistoffer som kryssblokkerer sklerostinbindingsantistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelsen

Biacore kryssblokkeringsassay

- 5 Det følgende beskriver generelt et egnet Biacore-assay for bestemmelse av hvorvidt et antistoff eller andre bindemiddel kryssblokkerer eller er i stand til å kryssblokkere antistoffer ifølge oppfinnelsen. Det skal forstås at assayet kan anvendes med hvilke som helst av sklerostinbindemidlene beskrevet heri.
- 10 Biacore-maskinen (f.eks. BIAcore 3000) betjenes i henhold til produsentens anbefalinger.
- 15 Sklerostin kan bindes til for eksempel en CM5 Biacore-brikke ved hjelp av rutinemessig anvendt aminbindingskjemi, f.eks. EDC-NHS-aminbinding, for å danne en sklerostinovertrukket overflate. For å oppnå målbare bindingsnivåer kan 200–800 resonansenheter av sklerostin typisk bindes til brikken (denne mengden gir målbare bindingsnivåer og kan samtidig uten videre mettes av konsentrasjonene av testreagens som anvendes).
- 20 En alternativ måte å binde sklerostin til BIAcore-brikken på er ved anvendelse av en "merket" versjon av sklerostin, f.eks. N-terminalt eller C-terminalt his-merket sklerostin. I dette formatet ville et anti-his-antistoff være bundet til Biacore-brikken, og deretter ville det his-merkede sklerostinet passeres over brikkens overflate og fanges av anti-his-antistoffet.
- 25 De to antistoffene som skal vurderes for sin evne til å kryssblokkere hverandre, blandes i en støkiometrisk mengde, f.eks. ved et én-til-én molforhold, av bindingssteder i en egnet buffer for å danne testblandingen. Den anvendte bufferen er typisk en buffer som normalt er anvendt i proteinkjemi, slik som for eksempel PBS (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Når konsentrasjonene beregnes på et bindingsstedsgrunnlag, antas det at et antistoffs molekylvekt er antistoffets totale molekylvekt delt på antallet av mål (dvs. sklerostin)-bindingssteder på det antistoffet.
- 30
- 35 Konsentrasjonen av hvert antistoff i testblandingen bør være tilstrekkelig høy til å sikre metning av bindingsstedene for det antistoffet på sklerostinmolekylene

som er bundet på BIAcore-brikken. Antistoffene i blandingen er ved samme molkonsentrasjon (på en bindingsbasis), og den konsentrasjonen ville typisk være mellom 1,0 mM og 1,5 mM (på en bindingsstedsbasis).

5 Det fremstilles også separate løsninger inneholdende de separate antistoffene alene. Den anvendte bufferen for disse separate løsningene skal være samme buffer og ved samme konsentrasjon som den som ble anvendt for testblandingen.

10 Testblandingen føres over den sklerostinovertrukne BIAcore-brikken, og bindingen registreres. De bundne antistoffene fjernes deretter ved behandling av brikken med for eksempel en syre, slik som 30 mM HCl, i ca. 1 minutt. Det er viktig at sklerostinmolekylene som er bundet til brikken, ikke skades.

15 Løsningen av det første antistoffet alene passerer deretter over den sklerostinovertrukne overflaten, og bindingen registreres. Brikken behandles deretter for å fjerne alt det bundne antistoffet uten å skade det brikkebundne sklerostinet, f.eks. ved hjelp av syrebehandlingen nevnt ovenfor.

20 Løsningen av det andre antistoffet alene passerer deretter over den sklerostinovertrukne overflaten, og bindingsmengden registreres.

25 Den maksimale teoretiske bindingen kan defineres som summen av hvert antistoffs binding til sklerostin separat. Dette sammenlignes deretter med den faktiske bindingen av den målte blandingen av antistoffer. Hvis den faktiske bindingen er lavere enn den for den teoretiske bindingen, kryssblokkerer de to antistoffene hverandre.

ELISA-BASERT KRYSSBLOKKERINGSASSAY

30

Kryssblokkering av et antistoff mot sklerostin eller et annet sklerostinbindemiddel kan også detekteres ved anvendelse av et ELISA-assay.

35

Det generelle prinsippet for ELISA-assay involverer overtrekk av et antistoff mot sklerostin på brønnene av en ELISA-plate. En overskuddsmengde av et andre, potensielt kryssblokkerende, antistoff mot sklerostin tilsettes deretter i løsning

(dvs. ikke bundet til ELISA-platen). En begrenset mengde av sklerostin tilsettes deretter i brønnene.

Antistoffet som ble overtrukket på brønnene, og antistoffet i løsning, vil konkurrere om binding av det begrensede antallet av sklerostinmolekyler. Platen vaskes deretter for å fjerne sklerostin som ikke har bundet til det overtrukne antistoffet, og også for å fjerne det andre antistoffet i løsningsfase samt eventuelle komplekser dannet mellom det andre antistoffet i løsningsfase og sklerostinet. Mengden av bundet sklerostin måles deretter ved anvendelse av et egnet sklerostindetekteringsreagens. Et antistoff i løsning som er i stand til å kryssblokkere det overtrukne antistoffet, vil kunne forårsake en reduksjon i antallet av sklerostinmolekyler som det overtrukne antistoffet kan binde i forhold til antallet av sklerostinmolekyler som det overtrukne antistoffet kan binde i fravær av det andre antistoffet i løsningsfase.

Dette assayet beskrives nærmere lenger nede for to antistoffer betegnet Ab-X og Ab-Y. I tilfellet hvor Ab-X er valgt for å være det immobiliserte antistoffet, overtrekkes det på brønnene på ELISA-platen, hvorefter platene blokkeres med en egnet blokkeringsløsning for å begrense ikke-spesifikk binding av reagenser som deretter tilsettes. En overskuddsmengde av Ab-Y tilsettes deretter til ELISA-platen slik at molene av Ab-Y-sklerostinbindingsstedene per brønn er minst 10 ganger høyere enn molene av Ab-X-sklerostinbindingsstedene som ble anvendt per brønn under overtrekkingen av ELISA-platen. Sklerostin tilsettes deretter slik at molene av sklerostin tilsatt per brønn er minst 25 ganger lavere enn molene av Ab-X-sklerostinbindingsstedene som ble anvendt for overtrekkingen av hver brønn. Etter en egnet inkuberingsperiode vaskes ELISA-platen, og en sklerostindetekteringsreagens tilsettes for å måle mengden av sklerostin spesifikt bundet av det overtrukne antistoffet mot sklerostin (i dette tilfellet Ab-X). Bakgrunnssignalet for assayet er definert som signalet oppnådd i brønner med det overtrukne antistoffet (i dette tilfellet Ab-X), det andre antistoffet i løsningsfase (i dette tilfellet Ab-Y), bare sklerostinbuffer (dvs. ingen sklerostin) og sklerostindetekteringsreagenser. Det positive kontrollsignalet for assayet er definert som signalet oppnådd i brønner med det overtrukne antistoffet (i dette tilfellet Ab-X), bare den andre antistoffbufferen i løsningsfase (dvs. intet andre antistoff i løsningsfase), sklerostin og sklerostindetekteringsreagenser. ELISA-assayet må utføres slik at det positive kontrollsignalet er minst 6 ganger bakgrunnssignalet.

For å unngå at eventuelle artefakter (f.eks. signifikant forskjellig affinitet mellom Ab-X og Ab-Y for sklerostin) oppstår fra valget av hvilket antistoff som skal anvendes som overtrekksantistoff, og hvilket som skal anvendes som det andre (konkurrent)antistoffet, må kryssblokkeringsassayet utføres i to formater: 1) Format 1 er hvor Ab-X er antistoffet som overtrekkes på ELISA-platen og Ab-Y, er konkurrentantistoffet som er i løsning, og 2) format 2 er hvor Ab-Y er antistoffet som overtrekkes på ELISA-platen, og Ab-X er konkurrentantistoffet som er i løsning.

Eksempel 12: ELISA for å detektere effekten av MOR05813_IgG2lambda på SOST-binding av LRP6

LRP6 / SKLEROSTIN-ELISA

96-brønners ikke-behandlede mikrotiterplater ble overtrukket med 100 µl/brønn LRP6/Fc (1 µg/ml, R&D Systems, kat.nr. 1505-LR) fortynnet i PBS. Som kontroll for ikke-spesifikk binding (NSB) ble noen brønner fylt med 100 µl/brønn PBS. Platene ble dekket med plastfilm og inkubert over natten ved romtemperatur. Etter overtrekkingen ble platene vasket 3 ganger med 200 µl/brønn 0,05 % Tween 20 (Fluka, kat.nr. 93773) i PBS, og brønner ble blokkert i 1 h ved 37 °C ved tilsetning av 300 µl/brønn SuperBlock blokkeringsbuffer (Pierce, kat.nr. 37535) i TBS. Etter inkubering ble blokkeringsløsningen fjernet, og 100 µl/brønn sklerostin (*E.coli*-avledet, Novartis; 1–1000 ng/ml) fortynnet i 1 % BSA i PBS ble tilsatt. Platene ble inkubert i 2 h ved romtemperatur før de ble vasket 3 ganger med 200 µl/brønn 0,05 % Tween 20 i PBS. Deretter ble det tilsatt 100 µl/brønn antistoff mot anti-sklerostin (1 µg/ml) fortynnet i 1 % BSA i PBS, og plater ble inkubert i 2 h ved romtemperatur før de ble vasket 3 ganger med 200 µl/brønn 0,05 % Tween 20 i PBS. Til slutt ble det tilsatt 100 µl/brønn ALP-konjugert anti-geit-IgG Ab (1:5000; Sigma kat.nr. A-7888) fortynnet i 1 % BSA (Sigma kat. nr.:A-7888) i PBS i 1 h ved RT, og platene ble deretter vasket 3 ganger med 200 µl/brønn 0,05 % Tween 20 i PBS. For å bestemme ALP ble 100 µl/brønn ALP-substrat (Sigma, kat.nr.. S0942)-løsning (1 tablett per 5 ml dietanolaminsubstratbuffer 1x; Pierce, kat.nr. 34064) tilsatt til platene i 90 min og optisk densitet målt ved 405 nm.

Aktivitet av parentale og affinitetsmodnede Fab-er i LRP6 / sklerostin-ELISA

5 LRP6 / sklerostin-ELISA er basert på sklerostins evne til å binde LRP6. For ytterligere å karakterisere de produserte Fab-ene ble en seleksjon av Fab-er og IgG-er testet i dette assayet. I nærvær av et antistoff mot anti-sklerostin fra R&D (1000 ng/ml = 7 nM) ble sklerostin (0,9 nM) som binder til LRP6, inhibert ved 68 % sammenlignet med kontroll (data ikke vist). MOR05813_IgG2 lambda

10 inhiberte sklerostinbinding til LRP6 opptil 90 % ved 90 nM, mens et anti-lysozym-IgG anvendt som negativ kontroll hadde ingen effekt på sklerostinbinding til LRP6 (figur 20).

Eksempel 13: Parallell behandling ved anvendelse av MOR05813

15

MOR05813 + zoledronsyre

Åtte måneder gamle OF1/IC-hunnmus (n = 10/gruppe, Charles River, Frankrike) ble ovariectomert for å indusere bentap ved østrogenfjerning eller ble etterlatt intakt. Dyrene fikk to ganger ukentlig intravenøst administrert antistoff mot sklerostin MOR05813 (24 mg/kg, h/mlgG2a) eller kontrollantistoff (anti-PC-h/mlgG2a, intakt og OVX-kontrollgrupper). Ytterligere grupper fikk enten en enkelt administrasjon av zoledronsyre alene (100 µg/kg) eller i kombinasjon med antistoffet mot sklerostin MOR05813. Antistoffbehandlingen varte 3,5 uker

20

25 (7 anvendelser).

Dyrets tibiale benmasse og -geometri ble målt før ovariectomi ved perifer kvantitativ computertomografi (pQCT). Dyr ble jevnt fordelt i grupper ifølge kroppsvekt og tibial total benmineraldensitet. Endringer i benmineraldensitet, -masse og -geometri ble evaluert i slutten av behandlingsperioden.

30

Resultater uttrykkes som gjennomsnittlig +/- SEM. Statistisk analyse ble utført ved anvendelse av RS1 (serie 1999 for Windows, Domain Manufacturing Corp., USA). Dataene ble utsatt for enveis variansanalyse (ANOVA). Varianslikheten ble testet ved Levene F-testen, og forskjeller mellom grupper ved anvendelse av den

35

Bonferroni-justerte Dunnett-testen. Behandlede grupper ble testet for signifikans ved forskjeller fra den antistoffbehandlede OVX-kontrollgruppen ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$).

- 5 Ovariektomiindusert bentap kan blokkeres ved antistoffbehandling hos eldre mus (figur 21). Når antistoffet anvendes i kombinasjon med en enkelt intravenøs injeksjon av bisofonatzoledronsyre, blokkeres bentap, og benøkning induseres som indikert ved økninger i totalt benmineralinnhold (figur 21 A) og -densitet (figur 21 B) samt økninger i kortikal tykkelse (figur 21 C) og spongiøs benmineraldensitet (figur 21 D).
- 10

MOR05813 + alendronat-forbehandling

- 15 4,5 måneder gamle OF1/IC-hunnmus ($n = 10$ /gruppe, Charles River, Frankrike) fikk to ganger ukentlig intravenøst administrert antistoff mot sklerostin MOR05813 (10 mg/kg, h/mlgG2a) eller kontrollantistoff (anti-PC-mlgG2a, intakt og OVX-kontrollgrupper). Ytterligere grupper hadde fått alendronat-forbehandling i 7 uker (4 µg/kg/dag; 5 dager/uke) før de fikk kontrollantistoffet eller antistoffet mot sklerostin MOR05813. Antistoffbehandlingen varte 3,5 uker (7 anvendelser).
- 20

- Dyrets tibiale benmasse og geometri ble målt før initiering av antistoffbehandling ved perifer kvantitativ computertomografi (pQCT). Dyr ble jevnt fordelt i grupper ifølge kroppsvekt og tibial total benmineraldensitet. Endringer i benmineraldensitet, -masse og -geometri ble evaluert i slutten av behandlingsperioden.
- 25

- Resultater uttrykkes som gjennomsnittlig $\pm$ SEM. Statistisk analyse ble utført ved anvendelse av RS1 (serie 1999 for Windows, Domain Manufacturing Corp., USA). Dataene ble utsatt for enveis variansanalyse (ANOVA). Varianslikheten ble testet ved Levene F-testen, og forskjeller mellom grupper ved anvendelse av den Bonferroni-justerte Dunnett-testen. Grupper forbehandlet med alendronat ble testet for signifikans ved forskjell fra gruppene som fikk ingen forbehandling ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$).
- 30

Langtidsforbehandling med bisfosfonatalendronatet har ingen negativ innflytelse på den benanabole virkningen av anti-sklerostinet MOR05813 som gjenspeilet ved økninger i totalt benmineralinnhold (figur 22 A) og -densitet (figur 22 B) samt økninger i kortikal tykkelse (figur 22 C) og spongiøs benmineraldensitet (figur 22 D). På grunn av bifosfonatets vedvarende anti-resorptive egenskaper utover administreringsperioden observeres en økning i totalt benmineralinnhold (figur 22 A) og kortikal tykkelse (figur 22 C).

MOR05813 + DKK1 eller hPTH

Seks måneder gamle nakenhunnmus (n = 8/gruppe) fikk to ganger ukentlig intravenøst administrert vehikkel, antistoff mot sklerostin MOR05813 (10, 20 og 40 mg/kg, IgG2), anti-Dkk1-antistoff (10 mg/kg, IgG1), hPTH(1-34) (100 mikrog/kg) eller kombinasjoner derav. Antistoffbehandlingen varte 4 uker (8 administreringer).

Dyrets tibiale benmasse og geometri ble målt før behandling ved perifer kvantitativ computertomografi (pQCT). Dyr ble jevnt fordelt i grupper ifølge kroppsvekt og tibial total benmineraldensitet. Endringer i benmineraldensitet, -masse og -geometri ble evaluert i slutten av behandlingsperioden.

Resultater uttrykkes som gjennomsnittlig +/- SEM. Statistisk analyse ble utført ved anvendelse av RS1 (serie 1999 for Windows, Domain Manufacturing Corp., USA). Dataene ble utsatt for enveis variansanalyse (ANOVA). Varianslikheten ble testet ved Levene F-testen, og forskjeller mellom grupper ved anvendelse av den Bonferroni-justerte Dunnett-testen. Grupper ble testet for signifikans ved forskjell fra den vehikkelbehandlede gruppen ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$).

Benanabole effekter øker med dosen av anti-sklerostin MOR05813 (figur 23). Parallell behandling med et anti-Dkk1-antistoff resulterer i en forbedret økning i totalt benmineralinnhold (figur 23 A) og -densitet (figur 23 B) og kortikal tykkelse (figur 23 C) og en synergistisk økning i spongiøs benmineraldensitet (figur 23 D). Parallell behandling med hPTH(1-34) resulterer i en synergistisk økning i alle målte parametere (figur 23 A-D).

Litteraturliste

- Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ (2004) Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 18(1):1–12.
- 5 Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, USA
- Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dijkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foernzler D, Van Hul W. (2001) Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 10(5):537–43
- 10 Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, Dioszegi M, Dijkers FG, Hildering P, Willems PJ, Verheij JB, Lindpaintner K, Vickery B, Foernzler D, Van Hul W. (2002) Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Gene* 39(2):91–7.
- 15 Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J (2001) Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 68(3):577–89.
- 20 Chen, B.P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73–75. 1994
- 25 Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865–881
- Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B, Hamdy NA, Lowik CW, Hamersma H, Beighton P, Papapoulos SE. (2005) Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers. *J Clin Endocrinol Metab* 90(12):6392–5
- 30 Haenel C, Satzger M, Della Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005) Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration. *Anal Biochem* 339(1):182–4

Keller H, Kneissel M. (2005) SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 37(2):148–58.

Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL®) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57–86.

Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X.Q., Schier, R., Sohlemann, P., Winter, J., Wolle, J., and Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67–84.

Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 280(20):19883–7

Löhning, C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.

Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, Ovcharenko D, Plajzer-Frick I, Rubin EM. (2005) Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 15(7):928–35

Low, N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359–368

Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretzschmar, T., Yayon, A., and Rothe, C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278(40):38194–38205

Semenov MV, He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem.* 19. oktober 2006;

van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PH, Vrieling H, Papapoulos SE, Ten Dijke P, Lowik CW (2006) Wnt but not BMP Signaling is Involved in the Inhibitory Action of Sclerostin on BMP-Stimulated Bone Formation.

Virnekas B, Ge L, Pluckthun A, Schneider KC, Wellnhofer G, Moroney SE (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 22(25):5600–5607

5 J Bone Miner Res 10. oktober 2006 Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist.

10 EMBO J 22(23):6267--76 Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, Skonier JE, Yu C, Latham JA (2005) Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem.* 28;280(4):2498–502

Patentkrav

1. Antistoff mot sklerostin, omfattende en polypeptidsekvens i tungkjedens variable region, omfattende SEQ ID NO: 70 og en polypeptidsekvens i lettkjedens variable region omfattende SEQ ID NO: 81.

5

2. Antistoffet ifølge krav 1, omfattende en aminosyresekvens i tungkjeden av full lengde, omfattende SEQ ID NO:114.

3. Antistoffet ifølge hvilke som helst av kravene 1–2, omfattende en aminosyresekvens i lettkjeden av full lengde, omfattende SEQ ID NO:125.

10

4. Antistoff, omfattende sekvensen i tungkjeden med SEQ ID NO:114 og sekvensen i lettkjeden med SEQ ID NO:125.

5. Antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 for anvendelse som medikament.

15

6. Anvendelse av et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 i produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

20

25

7. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 for anvendelse i behandlingen av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

30

8. Farmasøytisk sammensetning, omfattende et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4.

35

9. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 8 i kombinasjon med én eller flere av en farmasøytisk akseptabel eksipient, fortynner eller bærer.

5 **10.** Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 8 eller 9, ytterligere omfattende andre aktive ingredienser.

11. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 8 eller 9, ytterligere omfattende minst ett annet antiflogistikum eller antiosteoporotikum.

10

12. Isolert polynukleotidsekvens som koder for antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4.

15

13. Klonings- eller ekspresjonsvektor, omfattende én eller flere polynukleotidsekvenser ifølge krav 12.

14. Vektor ifølge krav 13, hvori vektoren omfatter minst én nukleinsyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO:136 og 147.

20

15. Vertscelle, omfattende én eller flere klonings- eller ekspresjonsvektorer ifølge krav 13–14.

16. Fremgangsmåte for produksjon av et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4, omfattende dyrking av vertscellen ifølge krav 15 og isolering av antistoffet.

25

17. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 eller en farmasøytisk sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 8–11 for anvendelse i behandlingen eller forebyggingen av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

35

18. Diagnostisk kit, omfattende et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4.

5 **19.** *In vitro*-fremgangsmåte for identifisering av en celle eller et vev som uttrykker sklerostin, idet fremgangsmåten omfatter kontaktering av cellen eller vevet med et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4, hvori antistoffet ytterligere omfatter en detekterbar etikett, slik som en radioaktiv, fluorescerende, magnetisk, paramagnetisk eller kjemiluminescerende etikett.

10 **20.** Anvendelse av et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 og (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika i produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av
15 sklerostin, og hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere
20 eller artritt.

21. Anvendelse av et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 i produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin,
25 hvori medikamentet anvendes i kombinasjon med (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika, og hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som
30 osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

22. Anvendelse av (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat,
35 (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika i produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et

økt nivå av sklerostin, hvori medikamentet anvendes i kombinasjon med et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4, og hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

23. Anvendelse av et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 i produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori pasienten på forhånd har fått administrert (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika, og hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

24. Anvendelse av (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika i produksjonen av et medikament for behandling av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori pasienten på forhånd har fått administrert et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4, og hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

25. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 og (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika for anvendelse i behandlingen av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori den patologiske

lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

26. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 anvendt i kombinasjon med (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika for anvendelse i behandlingen av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

27. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4 for anvendelse i behandlingen av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori pasienten på forhånd har fått administrert (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika, og hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

28. (i) zoledronsyre, (ii) et anti-DKK1-antistoff, (iii) alendronat, (iv) et anti-LRP4-antistoff, (v) hPTH og/eller (vi) paratyroidhormonfrisettende middel slik som kalsilytika for anvendelse i behandlingen av en patologisk lidelse som medieres ved sklerostin, eller som er assosiert med et økt nivå av sklerostin, hvori pasienten på forhånd har fått administrert et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4, og hvori den patologiske lidelsen er minst én av lidelsene primær og sekundær osteoporose, osteopeni, osteomalasi, osteogenesis imperfecta, avaskulær nekrose, også kjent som osteonekrose, frakturer og

implantattilheling, inkludert dentale implantater og hofteimplantater, bentap på grunn av andre lidelser slik som bentap assosiert med HIV-infeksjon, cancere eller artritt.

- 5 **29.** Anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 20–28, hvori hPTH er hPTH(1–34).

SEKVENSLISTE

<110> Novartis AG

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF USE FOR ANTIBODIES AGAINST
SCLEROSTIN

<130> 52279

<160> 171

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Asn
1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5					10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Asn
1				5					10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5					10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5					10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5					10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5					10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5					10

<210> 9

3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5				10	

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5				10	

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Ser	His	Trp	Leu	Ser
1				5				10	

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Ser	Val	Lys	Gly
			20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

4

<400> 13

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

Ser	Val	Lys	Gly
			20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Ser	Val	Lys	Gly
			20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

Ser	Val	Lys	Gly
			20

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Trp	Val	Ser	Val	Thr	Gly	Val	His	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15	

Val	Lys	Gly
-----	-----	-----

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Val Lys Gly

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Trp	Val	Ser	Val	Thr	Thr	His	Gln	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15	

Val Lys Gly

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Val Lys Gly

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

Ser Val Lys Gly
20

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Val Lys Gly

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Val Lys Gly

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Thr	Phe	Met	His	Gly	His	Leu	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Met	Asp	Phe
1				5					10					15

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp	Thr	Tyr	Leu	His	Phe	Asp	Tyr
1				5			

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

7

Thr	Phe	Met	His	Gly	His	Leu	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Met	Asp	Phe
1				5					10					15

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp	Thr	Tyr	Leu	His	Phe	Asp	Tyr
1				5			

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp	Thr	Tyr	Leu	His	Phe	Asp	Tyr
1				5			

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Asp	Thr	Tyr	Leu	His	Phe	Asp	Tyr
1				5			

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Asp	Thr	Tyr	Leu	His	Phe	Asp	Tyr
1				5			

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr
1 5

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val His

1

5

10

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Ser Val Lys Gly
20

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Phe Tyr Val His
1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser
1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 39

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Ser
1				5					10				

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Ser
1				5					10				

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Ser
1				5					10				

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Ser
1				5					10				

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Ser
1				5					10				

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

11

<213> Homo sapiens

<400> 44

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Ser
1				5					10				

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Leu	Val	Ile	Tyr	Asp	Asp	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Leu	Val	Ile	Tyr	Asp	Asp	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 49

<211> 11

12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 54

13

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Leu	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gly	Ser	Trp	Ala	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ser	Ser	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala	Ser	Trp	Thr	Gly	Val	Glu	Pro	Asp	Tyr
1				5					10

14

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Gln	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser	Tyr	Leu	Ser	Glu
1				5					10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ser	Ser	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ser	Ser	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser	Ser	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

15

Ser	Ser	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ser	Thr	Tyr	Asp	Gly	Pro	Gly	Leu	Ser	Glu
1				5					10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ser	Ser	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Ser	Ser	Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 67

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

16

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

<210> 68

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His
 20 25 30
 Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asn Ile Asn Tyr Asp 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

17

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 69

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu Ser Met Asp
 100 105 110

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

<210> 70

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His

18

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

<210> 71

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

19

<210> 72

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

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

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

20

Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 74

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 75

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

21

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

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

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

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

22

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 77

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 78

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

23

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

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

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Ala Gly Ser Ser Gly Ser
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 79

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

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

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

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
 85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

24

<210> 80

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

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

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

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Thr Gly Val Glu Pro Asp
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 81

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

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

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

25

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Tyr Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 82

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

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

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

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
 85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 83

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

26

<400> 83

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

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

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

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
 85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 84

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

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

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

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

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

27

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 85

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

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

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

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

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser
85 90 95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 86

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

28

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

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

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

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 87

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

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

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

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Glu Ser

29

85

90

95

Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 88

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

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

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

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Gly Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 89

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 89

caggtgcaat tgggtgaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcgggcag cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatgtta tgaattgggt gcgccaagcc 120

cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcttt atctctggtg attctagcaa tacctattat 180

30

gcggatagcg tgaagggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactttt 300
 atgcatggtc atcttgggtg tggctcttct atggattttt ggggccaagg caccctggtg 360
 acggttagct ca 372

<210> 90

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 90

caggtgcaat tggtggaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat 180
 gcggatagcg tgaagggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgatact 300
 tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggttagctc a 351

<210> 91

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 91

caggtgcaat tggtggaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt taccttttct tcttatgtta tgaattgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcttt atctctggtg attctagcaa tacctattat 180
 gcggatagcg tgaagggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactttt 300
 atgcatggtc atcttgggtg tggctcttct atggattttt ggggccaagg caccctggtg 360
 acggttagct ca 372

<210> 92

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 92

31

caggtgcaat tggaggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat 180

gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggcctgtg attattgcgc gcgtgatact 300
 tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggtagctc a 351

<210> 93

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 93

caggtgcaat tggaggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt actggtgttc atggtgatac ttattatgct 180
 gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
 cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348

<210> 94

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 94

caggtgcaat tggaggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attggttaatt ggggtgatac ttattatgct 180
 gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat 300
 cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca 348

<210> 95

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 95

```

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt actactcacc agggttatac ttattatgct      180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg      240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat      300

```

```

cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca      348

```

<210> 96

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 96

```

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt actaatcgtt atggttatac ttattatgct      180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg      240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat      300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca      348

```

<210> 97

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 97

```

caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcaat atcaattatg atggtagctc tacctattat      180
gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgatact      300
tatcttcatt ttgattattg gggccaaggc accctggtga cggttagctc a      351

```

<210> 98

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 98

caggtgcaat tggtaggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcgag cctgcgtctg	60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt ggcgcaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attactcctt atggtgatac ttattatgct	180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg	240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat	300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca	348

<210> 99

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 99

caggtgcaat tggtaggaaag cggcggcggc ctggtgcaac cggcggcgag cctgcgtctg	60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttcgt tctcattggc tttcttgggt ggcgcaagcc	120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgtt attactcctt atggtgatac ttattatgct	180
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg	240
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tgatacttat	300
cttcattttg attattgggg ccaaggcacc ctggtgacgg ttagctca	348

<210> 100

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 100

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttgca caggtcagac cgcgcgtatc	60
tcgtgtagcg gcgataatat tggttctttt tatgttcatt ggtaccagca gaaaccggg	120
caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aataatcgtc cctcaggcat cccggaacgc	180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcgaa	240
gacgaagcgg attattattg cggttcttgg gctggttctt ctggttctta tgtgtttggc	300
ggccgcacga agttaaccgt tcttgccag	330

<210> 101

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 101

gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgcc ctcaggcgtg	180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag	339

<210> 102

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 102

gatatcgaac tgaccagcc gccttcagtg agcgttcac caggtcagac cgcgcgtatc	60
tcgtgtacgg gcgataatat tggttctttt tatgttcatt ggtaccagca gaaaccggg	120
caggcgccag ttcttgtgat ttatgatgat aataatcgcc cctcaggcat cccggaacgc	180
tttagcggat ccaacagcgg caacaccgcg accctgacca ttagcggcac tcaggcgga	240
gacgaagcgg attattattg cgcttcttgg actggtgttg agcctgatta tgtgtttggc	300
ggcggcacga agttaaccgt tcttggccag	330

<210> 103

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 103

gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgcc ctcaggcgtg	180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc cagtcttatg ctggttctta tctttctgag	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag	339

<210> 104

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 104

gatatcgac tgacccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgcc ctcaggcgtg	180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag	339

<210> 105

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 105

gatatcgac tgacccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgcc ctcaggcgtg	180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag	339

<210> 106

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 106

36

gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgcc ctcaggcgtg	180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag	339

<210> 107

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 107

gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgcc ctcaggcgtg	180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag	339

<210> 108

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 108

gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag	120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgcc ctcaggcgtg	180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tctacttatg atggctcttg tctttctgag	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag	339

<210> 109

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 109

```

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc   60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatggttgg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag   120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgcc ctcaggcgtg   180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg   240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttatg gtgagtctct tacttcttat   300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag                          339

```

<210> 110

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 110

```

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc   60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatggttgg gatattaatg atgtgtcttg gtaccagcag   120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatgatgta ataatcgcc ctcaggcgtg   180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg   240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tctacttatg atggctcctg tctttctgag   300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag                          339

```

<210> 111

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

```

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1           5           10           15

```

```

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20          25          30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

```

38

35	40	45
Ser Ser Tyr Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala		
65	70	75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
	85	90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
	100	105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu		
	115	120 125
Ser Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
	130	135 140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser		
	145	150 155 160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
	165	170 175
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly		
	180	185 190
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu		
	195	200 205
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr		
	210	215 220
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr		
	225	230 235 240
Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro		
	245	250 255
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
	260	265 270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	275	280 285

39

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 112

<211> 462

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

40

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

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

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 210 215 220

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

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

41

260

265

270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 113

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

42

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Phe Ile Ser Gly Asp Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Phe Met His Gly His Leu Gly Gly Gly Leu
 115 120 125

Ser Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 145 150 155 160

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 225 230 235 240

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 245 250 255

43

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 114

<211> 462

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

44

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 225 230 235 240

45

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 115

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

46

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Val Thr Gly Val His Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 225 230 235 240

47

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 275 280 285
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 370 375 380
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 116

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

48

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Asn Trp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu

49

225					230					235					240
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
			245						250					255	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
		275					280					285			
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	290					295					300				
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
305					310					315					320
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
			325						330					335	
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			340					345					350		
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
		355					360					365			
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
	370					375					380				
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
385					390					395					400
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				405					410					415	
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			420					425					430		
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		435					440					445			
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
	450					455					460				

<210> 117

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

50

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Val Thr Thr His Gln Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220

51

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 118

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

52

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Ala Thr Asn Arg Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
 195 200 205
 Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 210 215 220

53

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

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
260 265 270

Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
275 280 285

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
290 295 300

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
325 330 335

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
355 360 365

Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
370 375 380

Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
385 390 395 400

Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
420 425 430

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 119

<211> 462

54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala' Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

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

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

55

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
 225 230 235 240
 Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 290 295 300
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350
 Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 355 360 365
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 370 375 380
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
 405 410 415
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 120

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

57

195	200	205
Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
210	215	220
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu		
225	230	235 240
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
	245	250 255
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
	260	265 270
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln		
	275	280 285
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
	290	295 300
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu		
	305	310 315 320
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
	325	330 335
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
	340	345 350
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
	355	360 365
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
	370	375 380
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
	385	390 395 400
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly		
	405	410 415
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
	420	425 430
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
	435	440 445
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	450	455 460

<210> 121

<211> 461

58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

```

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1           5           10           15

Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35           40           45

Arg Ser His Trp Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          50           55           60

Glu Trp Val Ser Val Ile Thr Pro Tyr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp
65           70           75           80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
          85           90           95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          100          105          110

Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Tyr Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          115          120          125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
          130          135          140

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
145          150          155          160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
          165          170          175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
          180          185          190

```

59

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 122

60

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
 20 25 30

Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly
 35 40 45

Ser Phe Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
 50 55 60

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly
 85 90 95

Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Trp Ala Gly
 100 105 110

Ser Ser Gly Ser Tyr Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

Gly Gln
 130

<210> 123

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

61

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
 100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 124

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

62

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
 20 25 30
 Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly
 35 40 45
 Ser Phe Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
 50 55 60
 Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly
 85 90 95
 Thr Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Thr Gly
 100 105 110
 Val Glu Pro Asp Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 165 170 175
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 180 185 190
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 195 200 205
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 210 215 220
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230

<210> 125

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

63

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser
100 105 110

Tyr Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly

210

215

220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 126

<211> 237

<212> PRT

64

<213> Homo sapiens

<400> 126

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
 100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 127

<211> 237

65

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
 100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp

165

170

175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

66

<210> 128

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
 100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

67

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 129

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
 100 105 110

Tyr Gly Glu Ser Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

68

115 120 125
 Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175
 Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190
 Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205
 Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220
 Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235
 <210> 130
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 130
 Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45
 Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
 85 90 95

69

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr
 100 105 110

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

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230 235

<210> 131

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
 35 40 45

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val

70

65					70					75					80
Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr
				85					90					95	
Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser
			100					105					110		
Tyr	Gly	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Tyr	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
		115					120					125			
Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro
	130					135						140			
Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu
145					150					155					160
Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp
				165					170					175	
Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln
			180					185					190		
Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu
		195					200					205			
Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly
	210					215					220				
Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser			
225					230					235					

<210> 132

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp
35 40 45

71

Val Gly Asp Ile Asn Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr
100 105 110

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

Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
165 170 175

Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
180 185 190

Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
210 215 220

Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 133

<211> 1410

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 133

atggcctggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagcgt gcaggcccag	60
gtgcagctgg tcgagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc	120
tgccgcgccca gcggcttcac cttcagcagc tacgtgatga actgggtgcg gcaggcccct	180

72

ggcaagggcc tggagtgggt gtcttcacac agcggcgaca gcagcaacac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gaccttcagt 360
 cacggccacc tgggcggagg actgagcatg gatttctggg gccagggcac cctggtcacc 420
 gtctctcag ctccaccaa gggcccatcc gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 480
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg 540
 acggtgtcgt ggaactcagg cgtcttgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacag tgccctccag caacttcggc 660
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaagg ggacaagaca 720
 gttgagcgca aatgttgtgt cgagtggcca cctgcccag caccacctgt ggcaggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccc gacctctgag 840
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggtc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 134

<211> 1389

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 134

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag 60
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggtg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac ctccagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggccct 180
 ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacac aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240
 gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360

73

ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaacc tctcctcagc ttccaccaag	420
ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc	480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc	540
gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	600
ctcagcagcg tggtagacagt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac	660
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc	720
gagtgcacac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctc cttcccccca	780
aaaccaagg acacctcat gatctcccgg accctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac	840
gtgagccacg aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	900
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc	960
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	1020
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa	1080
ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg	1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1200
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctctcttc	1260
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1320
tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1380
ggtaaatga	1389

<210> 135

<211> 1410

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 135

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagcgt gcaggcccag	60
gtgcagctgg tcgagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc	120
tgcgcgcca gcggcttcac cttcagcagc tacgtgatga actgggtgcg gcaggcccct	180
ggcaagggcc tggagtgggt gtccttcac agcggcgaca gcagcaacac ctactacgcc	240
gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg	300
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gaccttcattg	360
cacggccacc tgggcggagg actgagcatg gatttctggg gccagggcac cctggtcacc	420
gtctcctcag cttccacca gggcccatcc gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc	480
acctccgaga gcacagcggc cctgggtctg ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg	540

74

```

acgggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 600
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacag tgccctccag caacttcggc 660
accagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 720
gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacctctgag 840
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 900
gtggacggcg tggagggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 960
acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctgt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc tgcagaaaac catctccaaa 1080
accaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1260
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1410

```

<210> 136

<211> 1389

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 136

```

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaagggtg ccaggcccag 60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggtct gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
tgcccgccca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
ggcaaggggc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc 240
gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac 360
ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttccaccaag 420
ggcccatccg tcttccccct ggccgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtctg gaactcaggc 540
gtctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtgacagt gccctccagc aacttcggca ccagacctc cacctgcaac 660
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 720

```

75

gagtgccac cgtgccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttcct cttccccca	780
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac	840
gtgagccacg aagaccccgga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	900
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttcctgtt ggtcagcgtc	960
ctcacggttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	1020
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccagaa	1080
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg	1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1200
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctctcttc	1260
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1320
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1380
ggtaaatga	1389

<210> 137

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 137

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag	60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggtgt gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc	120
tgcgcgcgca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggccct	180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgacc ggcgtgcacg gcgacaccta ctacgccgac	240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag	300
atgaacagcc tcggggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg	360
cacttcgact actggggcca gggcacctgt gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc	420
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg	480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgt	540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcttacagt cctcaggact ctactccctc	600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgta	660
gatcacaagc ccagcaacac caagggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag	720
tgccaccgt gccagcacc acctgtggca ggacogtcag tcttctctt cccccaaaa	780
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg	840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900

76

```

gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc 960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
ggcctcccag ccccatcgga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
caggtgtaca cctgcccccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
tgcctgggtca aaggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
aatga 1386

```

<210> 138

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 138

```

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag 60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
tgcccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct 180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc ggcaactggg gcgacaccta ctacgccgac 240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaacaccct gtacctgcag 300
atgaacagcc tgcgggcca ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360
cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcgccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta 660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag 720
tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa 780
cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg 840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc 960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1020
ggcctcccag ccccatcgga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080

```

77

caggtgtaca cctgcccc atccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc	1140
tgcctggtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcttc	1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1320
gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1380
aatga	1386

<210> 139

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 139

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag	60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc	120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggtgtt cctgggtgcg gcaggcccct	180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgacc acccaccagg gctacaccta ctacgccgac	240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgagc	300
atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg	360
cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc	420
ccatccgtct tccccctggc gccctgtctc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg	480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct	540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta	660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag	720
tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa	780
cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg	840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900
gccaaagaca agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc	960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	1020
ggcctccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca	1080
caggtgtaca cctgcccc atccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc	1140
tgcctggtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcttc	1260

78

tacagcaagc tcaccggtga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1320
gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1380
aatga	1386

<210> 140

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 140

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag	60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc	120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct	180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgccacc aacagatacg gctacaccta ctacgccgac	240
agcgtgaagg gccgggtcac catcagccgg gacaacagca agaacaccct gtacctgag	300
atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg	360
cacttcgact actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc	420
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg	480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct	540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta	660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag	720
tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa	780
cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg	840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900
gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc	960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	1020
ggcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca	1080
caggtgtaca cctgcccc atcccgagg gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc	1140
tgcctggtea aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc	1260
tacagcaagc tcaccggtga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1320
gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1380
aatga	1386

<210> 141

<211> 1389

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 141

```

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcccag      60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc      120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct      180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccaacatc aactacgacg gcagcagcac ctactacgcc      240
gacagcgtga agggccgggt caccatcagc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg      300
cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacacctac      360
ctgcacttcg actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctctcagc ttccaccaag      420
ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc tcaggagca cctccgagag cacagcggcc      480
ctgggtgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc      540
gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      600
ctcagcagcg tggtagacgt gccctccagc aacttcggca ccagacctc cacctgcaac      660
gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc      720
gagtgcacac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca      780
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtgggtggac      840
gtgagccacg aagaccccg ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat      900
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc      960
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac     1020
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa     1080
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg     1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg     1200
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttct     1260
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc     1320
tcctgatgac atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg     1380
ggtaaataga                                     1389

```

<210> 142

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 142

80

```

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag      60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc      120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct      180
ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgatc acccctacg gcgacaccta ctacgccgac      240
agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag      300
atgaacagcc tcggggcca ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg      360
cacttcgact actggggcca gggcaccttg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc      420
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg      480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct      540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc      600
agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc ccagacctacac ctgcaacgta      660
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaagt ttgtgtcgag      720
tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa      780
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggta cgtgcgtggg ggtggacgtg      840
agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat      900
gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc      960
accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa     1020
ggcctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca     1080
caggtgtaca ccctgcccc atcccgagg gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc     1140
tgctgtgtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag     1200
ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttctc     1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc     1320
gtgatgcata aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt     1380
aatga                                             1386

```

<210> 143

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 143

```

atggcttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaagtgt ccaggcccag      60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc      120
tgcgccgcca gcggcttcac cttcagaagc cactggctgt cctgggtgcg gcaggcccct      180

```

81

ggcaagggcc tggaatgggt gtccgtgac accccctacg gcgacaccta ctacgccgac 240
 agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg gacaacagca agaaccacct gtacctgcag 300
 atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cacctacctg 360
 cacttcgact actggggcca gggcacctg gtcaccgtct cctcagcttc caccaagggc 420
 ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgct 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgacagtgcc ctccagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgta 660
 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagttg agcgcaaagt ttgtgtcgag 720
 tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa 780
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggg ggtggacgtg 840
 agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 900
 gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc 960
 accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaagg ctccaacaaa 1020
 ggctcccccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca 1080
 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1140
 tgctgtgtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1200
 ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgtgtgact ccgacggctc cttcttctc 1260
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1320
 gtgatgcatt aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1380
 aatga 1386

<210> 144

<211> 393

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 144

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtagcgcag 60
 gccgatatcg aactgaccca gccgccttca gtgagcgttg caccagggtca gaccgcgcgt 120
 atctcgtgta gcggcgataa tattggttct ttttatgttc attggtacca gcagaaaccc 180
 gggcaggcgc cagttcttgt gatttatgat gataataatc gtccctcagg catcccgaa 240
 cgcttttagcg gatccaacag cggcaacacc gcgacctga ccattagcgg cactcaggcg 300
 gaagacgaag cggattatta ttggggttct tgggctgggt cttctgggtc ttatgtgttt 360
 ggcgcccgca cgaagttaac cgttcttggc cag 393

<210> 145

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 145

```

atgagtgtgc tactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc      60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc      120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag      180
caccgccgca aggcccccaa gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcggtg      240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc      300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac      360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc      420
actctgttcc cgccctcttc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc      600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtggt aagtcacaca gaagctacag ctgccaggtc      660
acgcatgaag ggagcacgtg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag      714

```

<210> 146

<211> 705

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 146

```

atgagtgtgc tactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc      60
gacatcgagc tgaccagcc cccagcgtg agcgtggccc ctggccagac cgcccggtac      120
agctgcagcg gcgacaacat cggcagcttc tacgtgcact ggtatcagca gaagcccggc      180
caggcccccg tgctggtgat ctacgacgac aacaaccggc ccagcggcat ccccgagcgg      240
ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccgag      300
gacgaggccg actactactg cgccagctgg accggcgtgg agcccgacta cgtgtttggc      360
ggcggaaaca agcttaccgt cctaggtcag cccaaggctg cccctcggt cactctgttc      420
ccgcccctct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtc cataagtgac      480
ttctaccggg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga      540
gtggagacaa ccacaccctc caaacaagc aacaacaagt acgcggccag cagctatctg      600

```

83

agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcacac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660
 gggagcacgc tggaaaagac agtggccctt acagaatgtt catag 705

<210> 147

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 147

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcgttg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60
 gacatcgccc tgaccacagc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc 120
 agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag 180
 caccocggca agggcccca gctgatgatc tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg 240
 agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc 300
 caggccgagg acgaggccga ctactactgc cagagctacg ccggcagcta cctgagcag 360
 gtgttcggcg gagggacca gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc 420
 actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 480
 ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 540
 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 600
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtggt aagtcacaca gaagctacag ctgccaggtc 660
 acgcatgaag ggagcacggt ggaaaagaca gtggccctta cagaatgttc atag 714

<210> 148

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 148

84

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc	60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
caccccgcca agggcccca gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc	300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac	360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc	420
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
ataagtgact tctaccggg agcgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccgctc	540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	714

<210> 149

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 149

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc	60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
caccccgcca agggcccca gctgatgac tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc	300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac	360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc	420
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
ataagtgact tctaccggg agcgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccgctc	540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	714

<210> 150

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 150

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc	60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
caccccgcca agggcccaaa gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc	300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac	360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc	420
actctgttcc cgccctcttc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccggtc	540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	714

<210> 151

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 151

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc	60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
caccccgcca agggcccaaa gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc	300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcagctacg gcgagagcct gaccagctac	360
gtgtttggcg gcggaaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc	420
actctgttcc cgccctcttc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagcccggtc	540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	714

<210> 152

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 152

atgagtgtgc tcactcaggt cctggcgttg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc	60
gacatcgccc tgacccägcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc	120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag	180
caccccgcca aggcccccaa gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg	240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc	300
cagggcgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag	360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc	420
actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc	480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc	540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc	600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc	660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag	714

<210> 153

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 153

87

```

atgagtgtgc tactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc      60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc      120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag      180
caccocggca agggcccca gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg      240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc      300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag      360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc      420
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      480
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc      600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc      660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag          714

```

<210> 154

<211> 714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 154

```

atgagtgtgc tactcaggt cctggcggtg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc      60
gacatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg agcggcagcc ctggccagag catcaccatc      120
agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc gacatcaacg acgtgagctg gtatcagcag      180
caccocggca agggcccca gctgatgata tacgacgtga acaaccggcc cagcggcgtg      240
agcaaccggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctc      300
caggccgagg acgaggccga ctactactgc agcacctacg acggccctgg cctgagcgag      360
gtgttcggcg gagggaccaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc      420
actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      480

ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc      540
aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc      600
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc      660
acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag          714

```

<210> 155

<211> 213

<212> PRT

88

<213> homo sapiens

<400> 155

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

180

185

190

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

Leu Glu Asn Ala Tyr
 210

<210> 156

<211> 14

<212> PRT

89

<213> Homo sapiens

<400> 156

Ala	Arg	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	Gly	Arg	Gly	Lys	Trp	Trp	Arg
1				5					10				

<210> 157

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Arg	Leu	Val	Ala	Ser	Cys	Lys	Cys	Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Phe	His
1				5					10				15	

<210> 158

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Protein linker sequence

<400> 158

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
1				5					10			

<210> 159

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Protein linker sequence

<400> 159

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	

Gly Gly Gly

<210> 160

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 160

taaattatca taaagtccta a 21

<210> 161

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 161

aggactttat gataattat t 21

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 162

atagtggtta aataactcca g 21

<210> 163

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 163

ggagttattt aaccactatt t 21

<210> 164

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 164

taaattctcg tgatgtgcca t 21

<210> 165

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 165

ggcacatcac gagaatttat t 21

<210> 166

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 166

tttcttatag cacagctggt t 21

<210> 167

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 167

ccagctgtgc tataagaaat t 21

<210> 168

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 168

tagaccttc catccacgt g 21

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 169

gcgtgatgg aaaggtctat t 21

<210> 170

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> RT-PCT primer

<400> 170

atgcagctcc cactggcct gtgtcttgt 29

<210> 171

<211> 30

93

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> RT-PCR primer

<400> 171

aatcaggccg agctggagaa cgcctactag 30

Fig. 1

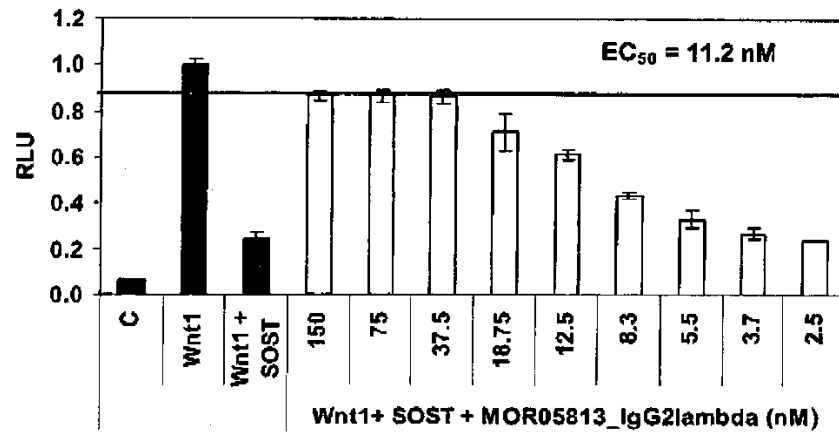


Fig. 2

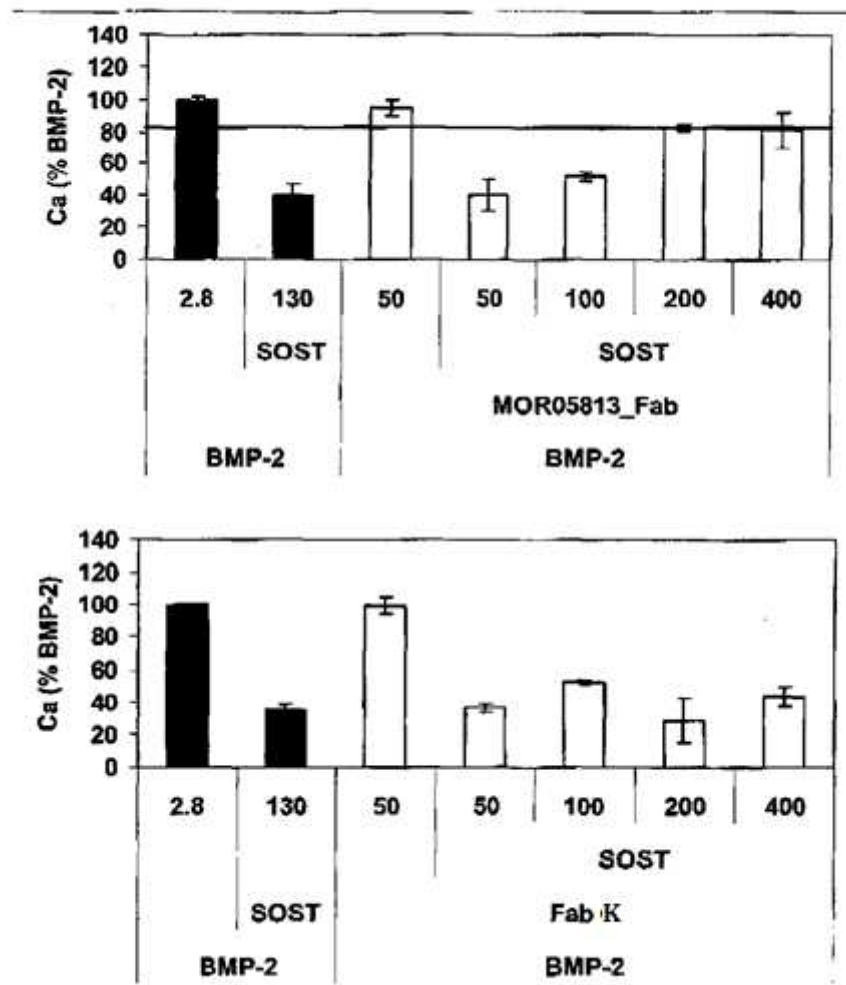


Fig. 3

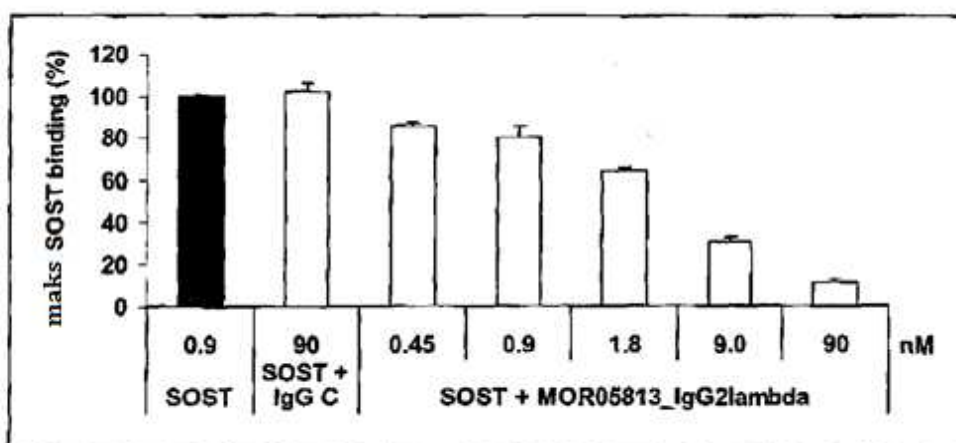


Fig. 4

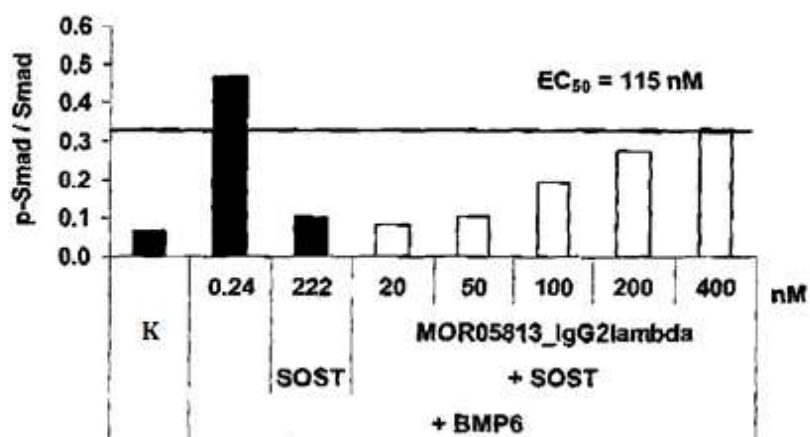
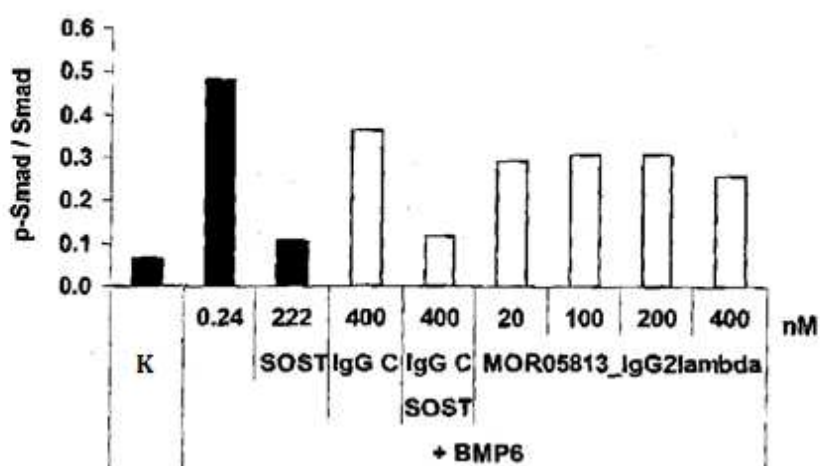
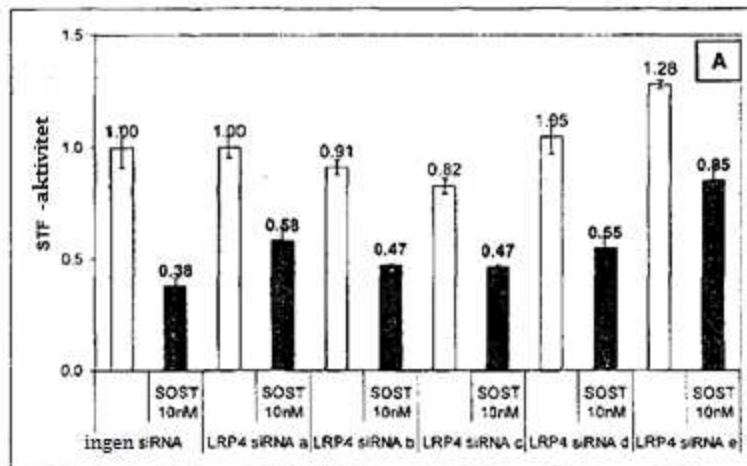


Fig. 5



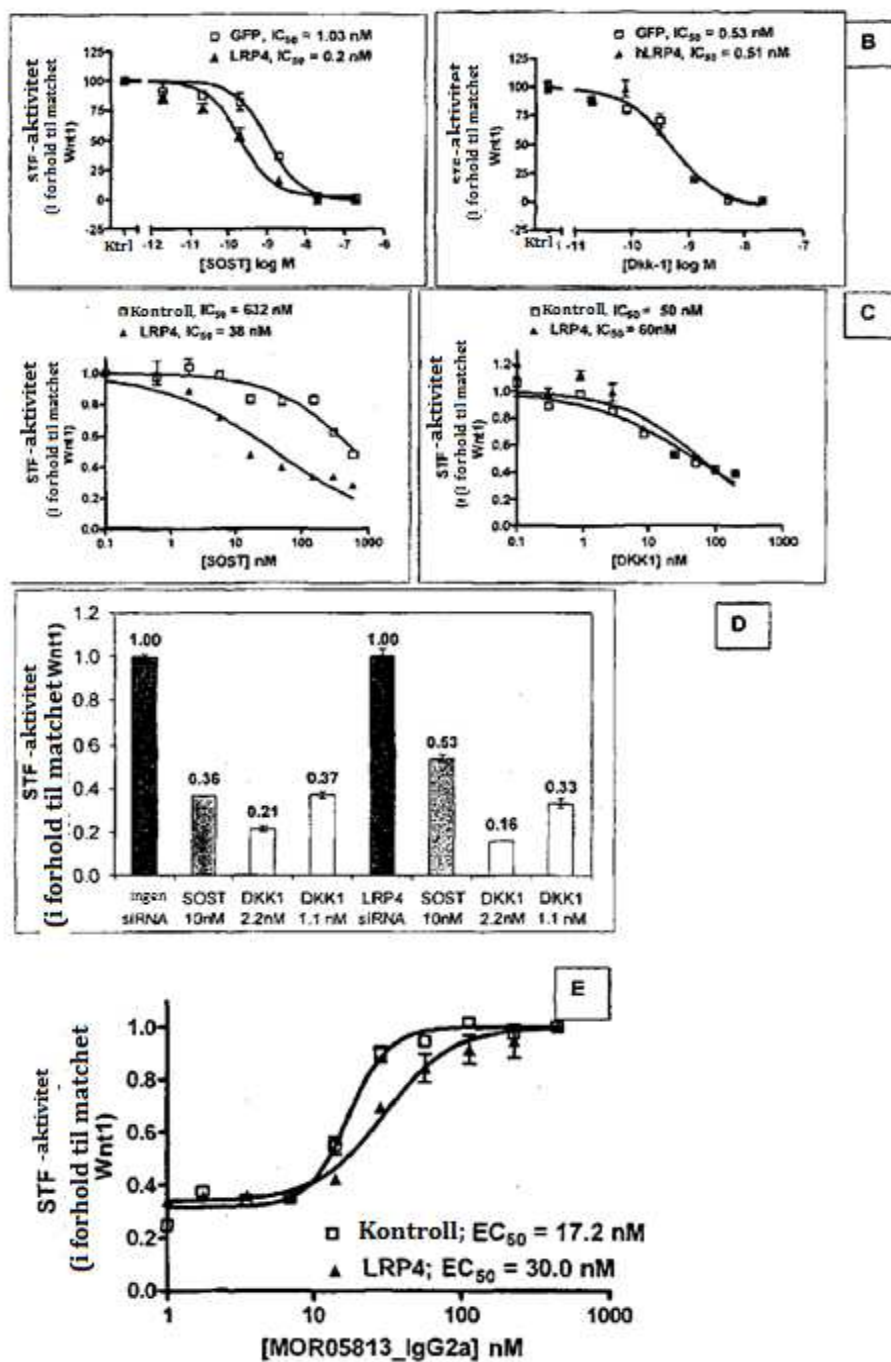


Fig. 6

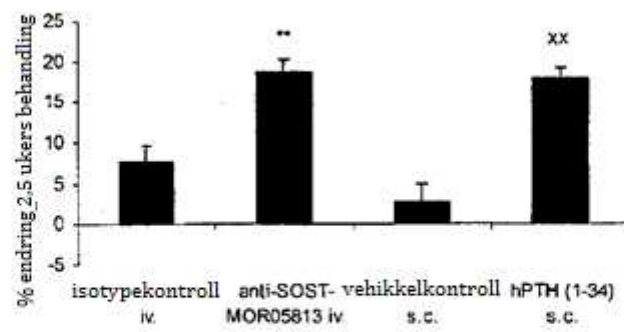


Fig. 7

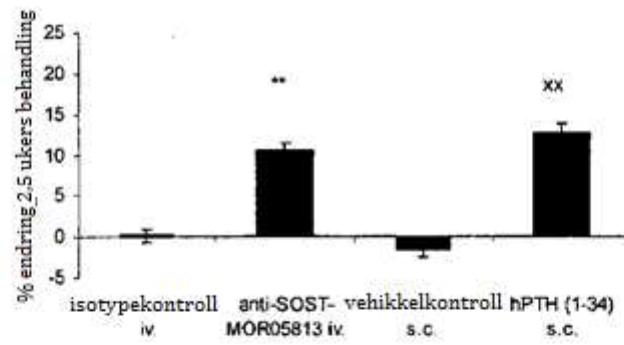


Fig. 8

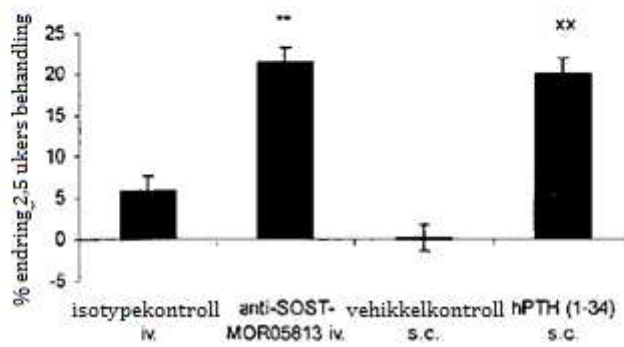


Fig. 9

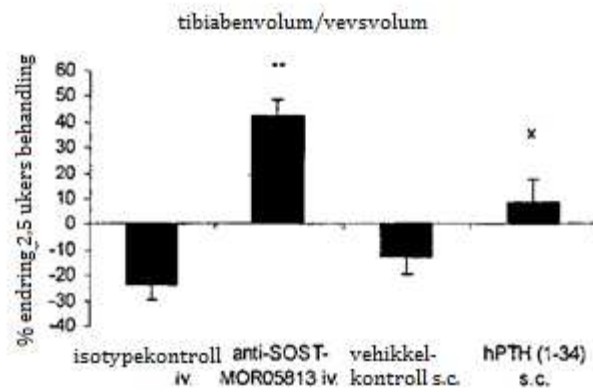


Fig. 10

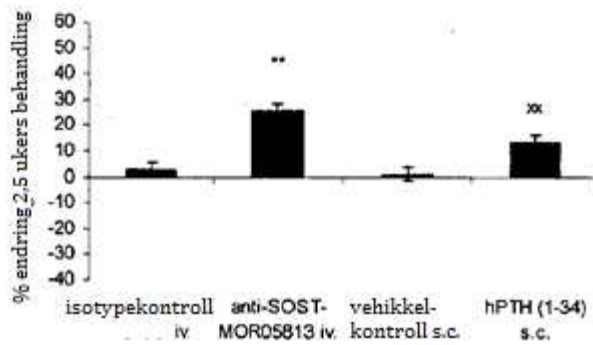


Fig. 11

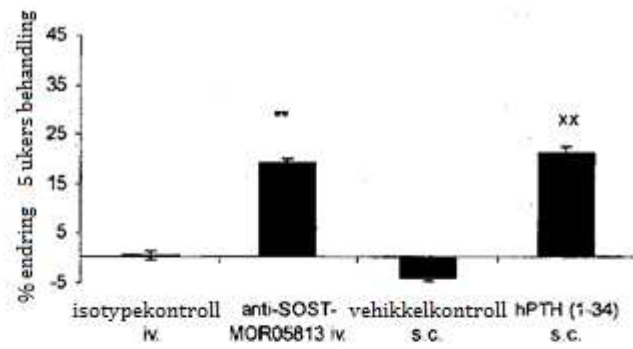


Fig. 12

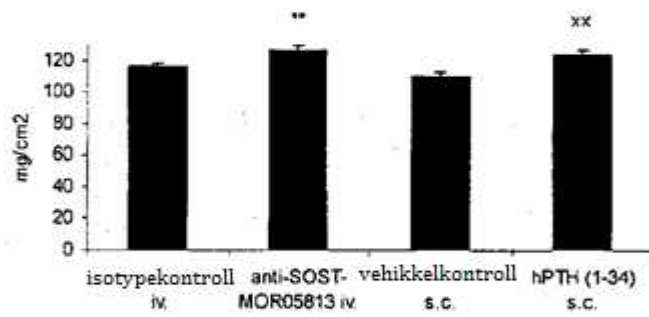


Fig. 13

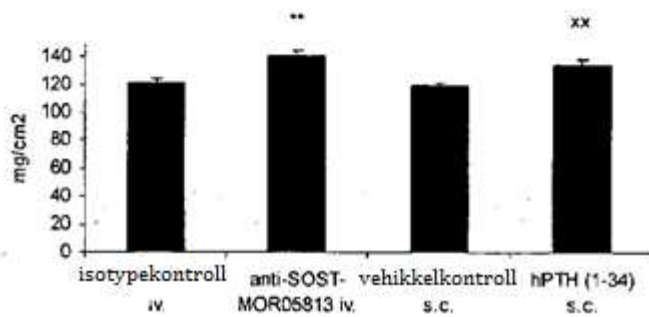


Fig. 14

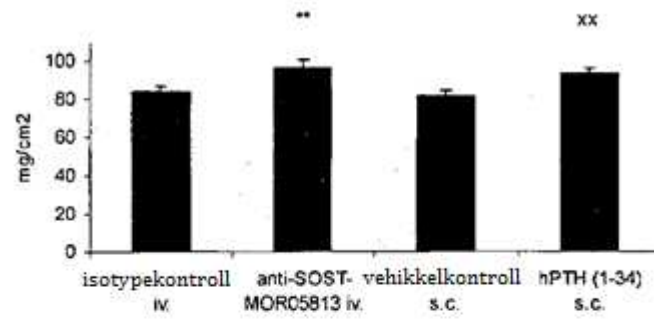


Fig. 15

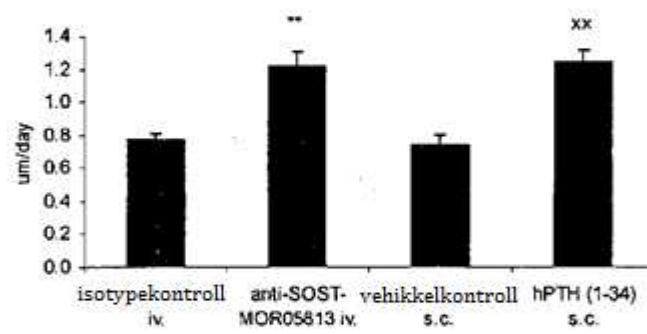


Fig. 16

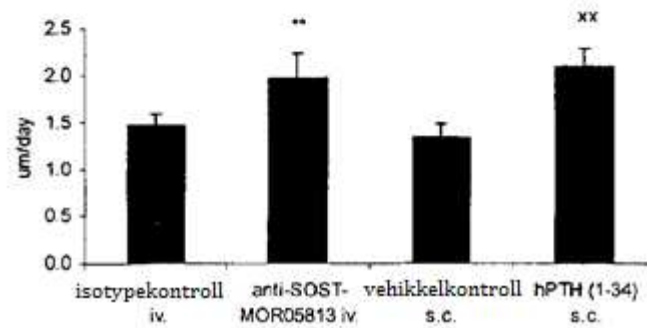


Fig. 17

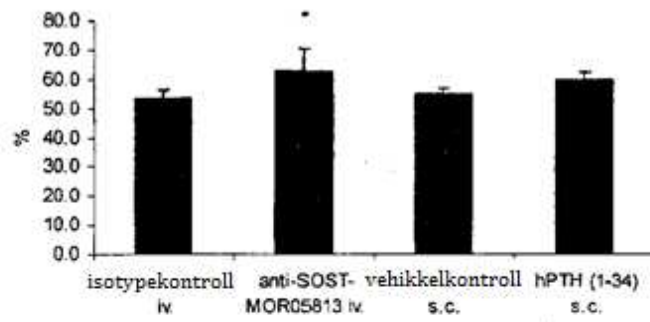


Fig. 18

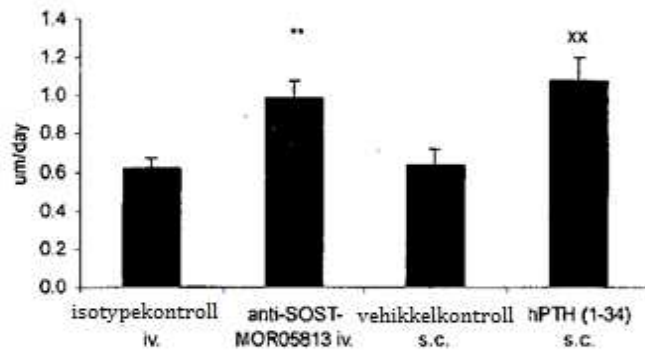


Fig. 19

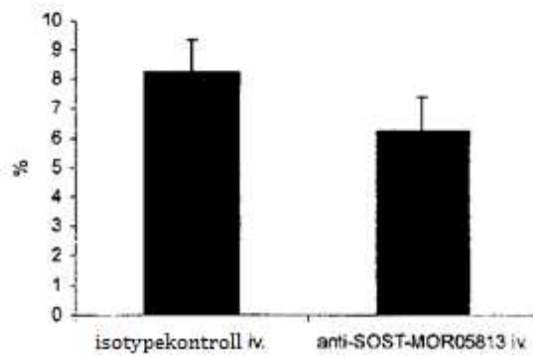


Fig.20

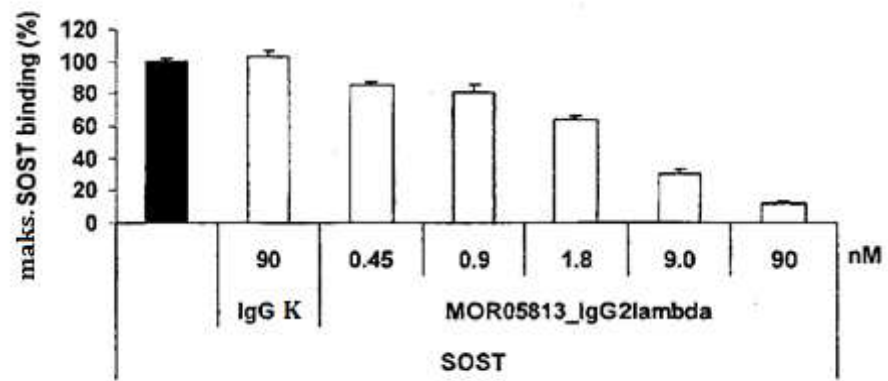
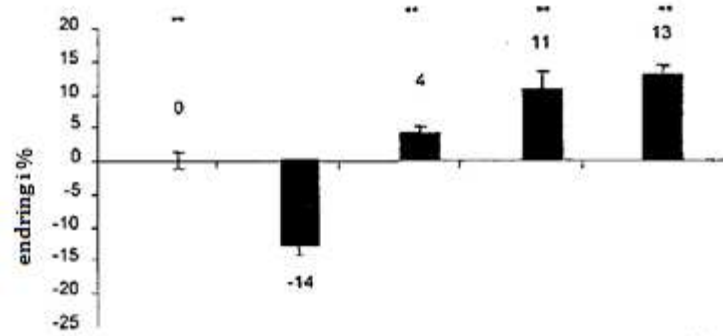
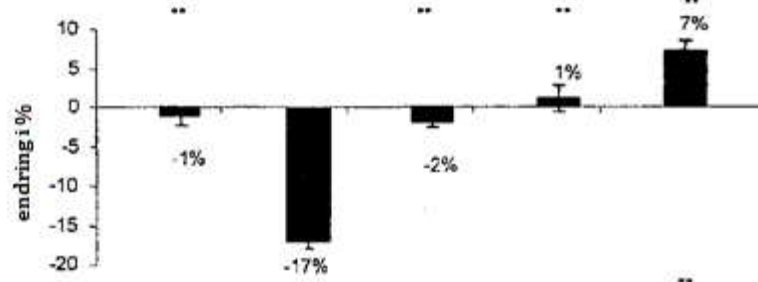
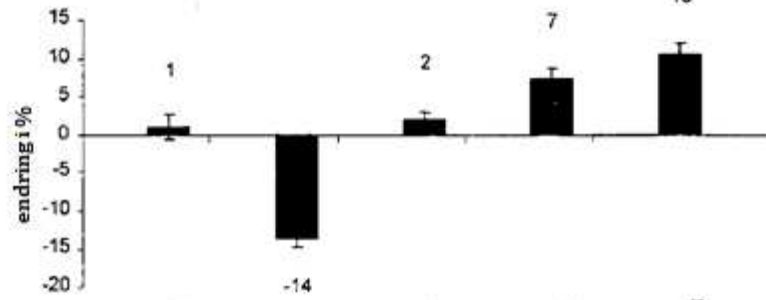


Fig. 21
A

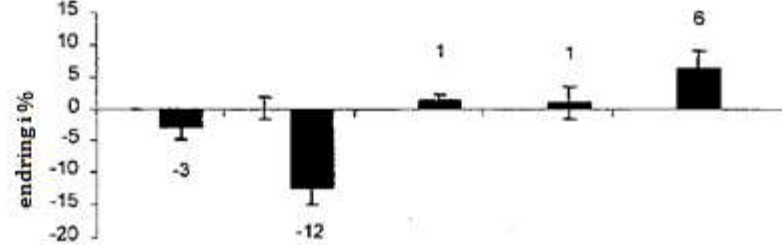
B



C



D



kontroll kontroll zoledronsyre anti-SOST anti-SOST
intakt OVX zoledronsyre zoledronsyre

Fig. 22

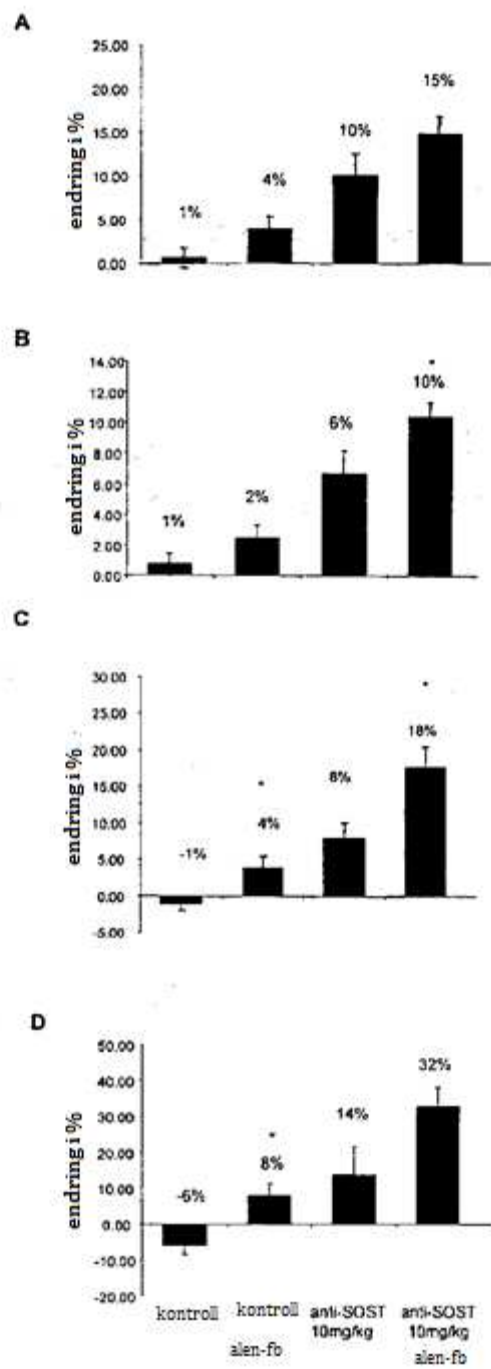


Fig. 23

