

INHIBIDOR DE LA GREMLINA-1 PARA EL TRATAMIENTO DE UNA FRACTURA O DEFECTO ÓSEOS

La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de una fractura o defecto óseos.

- 5 La invención revela el uso efectivo de un anticuerpo antigremlina-1 para acelerar la cicatrización y la formación de un puente de un tejido óseo en la brecha de los defectos segmentarios óseos; y demuestra que los inhibidores de la actividad de la gremlina-1 pueden proporcionar terapias mejoradas para tratar o prevenir la no unión de fracturas.

10 ANTECEDENTES

Una fractura ósea es una fractura o fisura en el tejido óseo y puede ser el resultado de una lesión traumática como una caída o un impacto, pero también puede ocurrir como resultado de enfermedades que afectan la integridad ósea.

15

Las fracturas óseas no estabilizadas se curan mediante el proceso de que se inicia mediante la formación de un coágulo de sangre o hematoma. Esto se combina con una osificación endocondral, respuesta inflamatoria que modula las células inmunes y las poblaciones de células madre esqueléticas circundantes. Posteriormente, el hematoma se reemplaza con un callo cartilaginoso mineralizado a través de la acción de varios factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés TGF β) (Cho et al; 2002), factores de crecimiento fibroblástico (FCF) (Schmid et al; 2009) y proteínas morfogénicas óseas (BMP) (Yu et al; 2010). A través de las acciones de los osteoclastos y los osteoblastos, el callo mineralizado es reemplazado por hueso tejido. La etapa final de remodelación implica el reemplazo del hueso fibroso con hueso laminar. La finalización de este proceso puede llevar muchos años dependiendo de la edad y el estado de la enfermedad del paciente.

20

25

Las fracturas óseas generalmente se tratan clínicamente a través de la estabilización, mediante el uso de un soporte como una férula, yeso o soporte. En casos extremos que implican fracturas complejas, se puede necesitar una intervención quirúrgica e implica el uso de fijadores internos y externos que se unen directamente al hueso. Incluso con estas medidas, en aproximadamente 10 % de los pacientes, el proceso de reparación del tejido es deficiente (Einhorn et al; 2014), lo que resulta en una unión ósea demorada (no hay unión 6 meses después de la fractura) o en que no haya unión. Una no unión se define como una cura incompleta en 9 meses, combinada con una falta de características radiológicas asociadas con la curación de fracturas que se observa durante tres meses

35

consecutivos (Buza et al; 2016). Las técnicas quirúrgicas actuales para reparar una no
unión de fractura y defectos óseos críticos a menudo son limitadas en términos de
cantidad y calidad de los materiales disponibles. Los tratamientos de uso común
involucran el injerto autólogo o alogénico, sin embargo, estos conllevan el riesgo adicional
5 de morbilidad en el sitio donante (Goulet et al; 1997) e infección (Bostrom et al; 2005),
respectivamente.

Un defecto óseo es una pérdida de hueso debido a un trauma o enfermedad.

10 Actualmente existe una gran necesidad médica que no ha sido suplida de mejorar el
tratamiento de fracturas y defectos óseos. Por consiguiente, es un objeto de la presente
invención proporcionar nuevos métodos para el tratamiento de una fractura o defecto
óseo.

15 La presente invención proporciona inhibidores de la actividad de gremlina-1 para su uso
en el tratamiento de una fractura o defecto óseos. La invención revela el uso efectivo de
un anticuerpo antigremlina-1 para acelerar la cicatrización y la formación de un puente de
un tejido óseo en la brecha de los defectos segmentarios óseos; y demuestra que los
inhibidores de la actividad de la gremlina-1 pueden proporcionar terapias mejoradas para
20 tratar o prevenir la no unión de fracturas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos utilizados en
este documento tienen el mismo significado que un experto en la materia comúnmente
entiende. Todas las publicaciones mencionadas en este documento se incorporan por
referencia.

30 Se apreciará que cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento
puede combinarse.

La presente invención proporciona un inhibidor de la actividad de gremlin-1 para su uso
en el tratamiento de una fractura o defecto óseo. La invención también proporciona el
35 uso de un inhibidor de la actividad de gremlin-1 para la fabricación de un medicamento
para el tratamiento de una fractura o defecto óseo. La invención proporciona además un

método para el tratamiento de una fractura o defecto óseo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la actividad de gremlina-1.

La gremlina-1 (también conocida como Dnm y CKTSF1B1) es una glucoproteína de 184 aminoácidos que forma parte de la familia DAN de proteínas secretadas por el nudo de cisteína (junto con Cerberus y Dan, entre otros). La gremlina se une e inhibe la capacidad de la BMP-2, 4 y 7 de comunicarse con un papel pro-angiogénico documentado posiblemente a través del agonismo del VEGFR2. El papel principal de Gremlina-1 es durante el desarrollo, en el que es vital durante la formación de riñones y durante la formación de los esbozos de extremidades.

Se sabe que la señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP) controla la formación del hueso endocondral, siendo la gremlina-1 (GREM1) uno de los antagonistas naturales de esta vía a través de su unión a BMP2, BMP4 y BMP7 (Hsu et al; 1998). La eliminación condicional de GREM1 en los osteoblastos da como resultado la sensibilización de la señalización/actividad de la BMP y la formación mejorada del hueso in vivo (Gazzerro et al; 2007), mientras que la sobreexpresión condicional en el mismo tipo de células causa osteopenia y fracturas espontáneas (Gazzerro et al; 2005). Además, aunque el bloqueo global es letal embrionario en un antecedente de BL6, el 49 % de las crías sobrevivieron más de 24 horas después del nacimiento en el antecedente genético mixto C57BL/6/FVB, y aunque los defectos esqueléticos del desarrollo estaban presentes en forma abundante, se podían observar las tasas elevadas de formación ósea (Canalis et al; 2012). A pesar de esta función de desarrollo de GREM1, no hay datos que sugieran que la inhibición de esta proteína sola mejorará la reparación postnatal de fracturas óseas. De hecho, aunque la formación de hueso endocondral es el mecanismo principal de esqueletogénesis en etapas embrionarias, los mecanismos que regulan el reclutamiento celular son procesos distintos en comparación con la reparación de fracturas postnatales (Ferguson et al; 1999). El papel de la inflamación se ha indicado como un factor clave en la reparación ósea en adultos, por lo que los factores de desarrollo que controlan los procesos de esqueletogénesis no se pueden extrapolar simplemente a los mecanismos de reparación postnatal.

El término gremlina-1, como se utiliza en la presente invención, tiene típicamente la secuencia que se establece en el registro UniProt O60565 (SEQ ID NO: 1). El término Gremlin-1 también puede referirse a un polipéptido Gremlina-1 que:

(a) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con o sin el péptido señal N-terminal, es decir, puede comprender o consistir en la secuencia de péptidos maduros como se muestra en la SEQ ID NO: 21; o

(b) es un derivado que tiene una o más sustituciones, modificaciones, deleciones o inserciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con o sin el péptido señal N-terminal (como se muestra en SEQ ID NO: 21), el cual retiene la actividad de Gremlina-1, como la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

(c) una variante de esta, tales variantes normalmente retienen al menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 (o SEQ ID NO: 20 o 21) (o incluso aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad). En otras palabras, tales variantes pueden retener aproximadamente de 60 % a aproximadamente 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, adecuadamente, aproximadamente de 80 % a aproximadamente 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, más adecuadamente, aproximadamente de 90% a aproximadamente 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y más adecuadamente, aproximadamente 95 % a aproximadamente 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. Las variantes se describen más adelante.

Como se discute más adelante, los números de residuos se citan normalmente con base en la secuencia de la SEC ID NO: 1. Sin embargo, la persona experta podría extrapolar fácilmente la numeración de residuos a una secuencia derivada o variante como se discutió anteriormente. Cuando se citan los números de residuos, la invención también abarca estos residuos en una variante o secuencia derivada.

Los presentes inventores han cristalizado Gremlina-1 humana sola, y en complejo con un anticuerpo denominado Ab 7326 (fragmentos Fab). La cristalización de la Gremlina-1 ha permitido determinar los residuos putativos en el sitio de unión de la BMP. Además, la cristalización con Ab 7326, que es un anticuerpo inhibidor alostérico, ha permitido determinar los residuos en el epítipo del anticuerpo. (WO 2018/115017 A2). Los anticuerpos que se unen a este epítipo tienen potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento de una fractura o defecto óseos.

Inhibidores de la actividad de Gremlina-1

Un inhibidor de la actividad de la gremlina-1, según la presente invención, es un agente que reduce o bloquea la actividad de la gremlina-1. Los inhibidores según la presente

invención pueden inhibir parcial o completamente la actividad de la gremlina-1. Los inhibidores de uso en la presente invención incluyen, entre otros, inhibidores que son capaces de unirse a la gremlina-1 o a una molécula de ácido nucleico que codifica la gremlina-1 o que son capaces de inhibir la expresión de la gremlina-1. Dichos inhibidores
5 pueden ser, entre otros, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, ARN antisentido y ARNsi), carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas.

En una realización, el inhibidor de la actividad de la gremlina-1 es un anticuerpo anti-
10 gremlina-1 o un fragmento, variante o derivado funcionalmente activo del mismo.

El término "anticuerpo" al que se hace referencia en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas individuales de estos. Un anticuerpo o inmunoglobulina
15 típicamente se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de esta. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. Cada cadena liviana está compuesta por una región
20 variable de la cadena liviana (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de la cadena liviana. Las regiones variables de las cadenas pesada y liviana contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas,
25 denominadas regiones marco (FR).

Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del
30 sistema de complemento clásico.

Un anticuerpo para su uso en la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, y normalmente será un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo para su uso en la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado
35 con CDR, un nanocuerpo, un anticuerpo humano o humanizado o una porción de unión a antígeno de cualquiera estos.

Los anticuerpos policlonales se pueden producir mediante métodos de rutina, como la inmunización de un animal adecuado con el antígeno de interés. Posteriormente, se puede extraer sangre del animal y purificar la fracción de inmunoglobulina.

- 5 Se pueden obtener anticuerpos contra la Gremlina-1, donde es necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a un animal, por ejemplo, un animal no humano, que utiliza protocolos conocidos y rutinarios, véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, como los conejos, los
10 ratones, las ratas, las ovejas, las cabras, las vacas, los camellos, las llamas o los cerdos pueden ser inmunizados. Sin embargo, los conejos, los ratones y las ratas son generalmente los más adecuados.

- Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido
15 en la técnica, como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica EBV-hibridoma (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

- 20 Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden generarse utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales clonando y expresando ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93(15): 7843-7848;
25 WO 92/02551; WO 2004/051268 y WO 2004/106377.

- Los anticuerpos para su uso en la presente invención también pueden generarse utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica, e incluyen los descritos por Brinkman et al (in J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames *et al.*
30 (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough *et al.* (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic *et al.* (Gene, 1997 187 9-18), Burton *et al.* (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) and WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5,698,426; US 5,223,409; US 5,403,484; US 5,580,717; US 5,427,908; US 5,750,753; US 5,821,047; US 5,571,698; US 5,427,908;
35 US 5,516,637; US 5,780,225; US 5,658,727; US 5,733,743 y US 5,969,108.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos en los que las regiones variables y las regiones constantes (donde están presentes) de las cadenas pesada y liviana son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, pero no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos

5 completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante los métodos de presentación de fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que la inmunoglobulina murina variable y opcionalmente los genes de la región constante han sido reemplazados por sus homólogos humanos, por ejemplo, tal y como se describe en términos generales en los documentos EP 0546073, US

10 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, EP 0438474 y EP 0463151.

Como alternativa, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede producirse mediante un método que comprende inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno

15 Gremlina-1, obtener una preparación de anticuerpos de dicho mamífero; derivar a partir de los mismos unos anticuerpos monoclonales que reconocen la Gremlina-1.

Las moléculas de anticuerpo para su uso en la presente invención pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y livianas de longitud

20 completa o un fragmento o porción de unión a antígeno de estas. El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse selectivamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los anticuerpos y sus fragmentos y

25 porciones de unión a antígeno pueden ser, entre otros, Fab, Fab modificado, Fab', Fab modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH), anticuerpos scFv, bi, tri o tetravalente, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126- 1136; Adair y Lawson, 2005, Drug

30 Design Reviews - Online 2 (3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab descritos en las solicitudes de patente internacional WO 2005/003169, WO 2005/003170

35 y WO 2005/003171 y fragmentos Fab-dAb descritos en la solicitud de patente internacional WO 2009/040562. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (ver, por ejemplo, los

documentos WO 92/22853 y WO 2005/113605). Estos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se pueden tamizar para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

5

En un ejemplo, el fragmento de anticuerpo funcionalmente activo para su uso en la presente invención es una Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv.

10 Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo para uso en la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse considerando las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios humanos de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. Particularmente, se pueden utilizar dominios de región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Como alternativa, los isotipos 15 IgG2 e IgG4 pueden utilizarse cuando no se requieren funciones efectoras de anticuerpos. En un ejemplo, el isotipo es IgG4P, según lo descrito por Angal S. et al, Mol Immunol, Vol 30 (1), p105-108, 1993.

20 El anticuerpo para su uso en la invención se puede preparar, expresar, crear o aislar mediante medios recombinantes como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o a transcromosómico para los genes de inmunoglobulina de interés o un hibridoma preparado a partir de estos, (b) anticuerpos asilados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo de interés, por ejemplo, de una transfectoma, (c) anticuerpos preparados, expresados, creados o 25 aislados mediante cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias del gen de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

30 Un anticuerpo para su uso en la invención puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto la región marco como la CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos para su uso en la invención pueden incluir residuos 35 de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo

humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

- 5 Este anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dicho anticuerpo monoclonal humano puede ser producido por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena liviana fusionado a una célula inmortalizada.

10

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguida de transformación de los linfocitos con el virus de Epstein-Barr.

15

El término "derivado" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o molécula efectora.

20

Una molécula efectora puede comprender una sola molécula efectora o dos o más de dichas moléculas unidas de modo que formen una fracción única que puede unirse a los anticuerpos para su uso en la presente invención. En los casos en que se desee obtener un fragmento de anticuerpo ligado a una molécula efectora, este se puede preparar mediante procedimientos estándar de químicos o de ADN recombinante en los que el fragmento de anticuerpo está unido directamente, o a través de un agente de acoplamiento, a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la técnica (ver, Hellstrom et al.,
25 Controlled Drug Delivery, 2º Ed., Robinson et al., Eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62: 119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 2003/031581. Como alternativa, cuando la molécula efectora es una proteína o
30 polipéptido, el enlace se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como los descritos en los documentos WO 86/01533 y EP 0392745.

35

La molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo* o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo o mejorar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmune. Entre los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo se incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina como los descritos en el documento WO 2005/117984.

El término "anticuerpo humanizado" pretende referirse a moléculas de anticuerpo injertadas en la CDR en las que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales de la región marco dentro de las secuencias marco humanas.

Como se utiliza en el presente documento, el término "molécula de anticuerpo injertada en la CDR" se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada o liviana contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino o de rata) injertado en un marco de región variable de cadena pesada o liviana de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan *et al*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una realización, en lugar de transferir toda la CDR, solo uno o más de los residuos determinantes de especificidad de cualquiera de las CDR descritas anteriormente en este documento se transfieren al marco de anticuerpos humanos (ver, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). En una forma de realización, sólo los residuos determinantes de especificidad de una o más de las CDR descritas anteriormente en este documento se transfieren al marco de anticuerpo humano. En otra forma de realización, sólo los residuos determinantes de especificidad de cada una de las CDR descritas anteriormente en este documento se transfieren al marco de anticuerpo humano.

Cuando se injertan las CDR o los residuos determinantes de la especificidad, se puede utilizar cualquier secuencia marco de región variable aceptora apropiada teniendo en cuenta la clase / tipo del anticuerpo donante del que se derivan las CDR, incluidas las regiones marco de ratón, primate y humano. De forma adecuada, el anticuerpo injertado en la CDR para su uso en la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones marco de aceptor humano, así como una o más de las CDR o residuos determinantes de especificidad descritos anteriormente. Por lo tanto, en una realización se proporciona un anticuerpo neutralizador injertado en la CDR, en el que el dominio variable comprende regiones marco del aceptor humano y CDR de donantes no humanos.

Ejemplos de marcos humanos que se pueden utilizar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM pueden utilizarse para la cadena pesada, REI puede utilizarse para la cadena liviana y

EU, LAY y POM pueden utilizarse tanto para la cadena pesada como para la cadena liviana. Como alternativa, pueden utilizarse secuencias de línea germinal humana; estas están disponibles, por ejemplo, en: <http://www.vbase2.org/> (ver Retter et al, Nucl. Acids Res. (2005) 33 (suplemento 1), D671-D674).

5

En un anticuerpo injertado en la CDR para su uso en la presente invención, la cadena pesada y la liviana, ambas aceptoras, no necesitan necesariamente derivarse del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas compuestas que tengan regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

10

Además, en un anticuerpo injertado en la CDR para su uso en la presente invención, las regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales pueden cambiarse a residuos más frecuentes para esa clase o tipo de cadena aceptora. Como alternativa, los residuos seleccionados en las regiones marco aceptoras pueden cambiarse de modo que correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (ver Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Tales cambios deben mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. En el documento WO 91/09967 se establece un protocolo para seleccionar residuos en las regiones marco aceptoras que pueden necesitar ser cambiados.

20

Un experto en la materia también entenderá que los anticuerpos pueden sufrir una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones a menudo dependen de la línea de células huésped utilizada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glucosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico de carboxilo-terminal (tal como lisina o arginina), debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995).

30

En una forma de realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

35

Las moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, dando así a la molécula una carga positiva o negativa neta. La cantidad de carga general "observada" dependerá de la secuencia de

aminoácidos absoluta de la entidad, el medio ambiente local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al que una molécula o superficie particular no tiene carga eléctrica neta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de acuerdo con la presente divulgación tiene un punto isoeléctrico (pI) de al menos 7. En una realización, el anticuerpo o fragmento tiene un punto isoeléctrico de al menos 8, tal como 8,5; 8,6; 8,7; 8,8 o 9. En una realización, el pI del anticuerpo es 8. Se pueden utilizar programas tales como ** ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html (ver Walker, The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), 571-607) para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

Los anticuerpos para uso en la invención pueden comprender al menos una, al menos dos o las tres secuencias de la CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 4 a 6 (HCDR1/HCDR2/HCDR3 respectivamente). Estas son las secuencias HCDR1/HCDR2/HCDR3 del anticuerpo Ab7326 de los ejemplos, tal como se determinan utilizando la metodología Kabat.

Los métodos de Kabat y Chothia para determinar secuencias de CDR son bien conocidos en la técnica (así como otras técnicas). Las secuencias de la CDR pueden determinarse utilizando cualquier método apropiado, y en la presente invención, si bien se emplea Kabat, también podrían utilizarse otras técnicas. En el presente caso, SEQ ID NO: 3 presenta la secuencia Ab7326 HCDR1 tal y como se determina utilizando una definición combinada de Chothia y Kabat.

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden comprender al menos una, al menos dos o las tres secuencias CDR de cadena liviana de SEQ ID NOS: 7 a 9 (LCDR1/LCDR2/LCDR3 respectivamente). Estas son las secuencias LCDR1/LCDR2/LCDR3 de Ab7326 que utilizan la metodología Kabat.

En una realización, el anticuerpo comprende al menos una secuencia HCDR3 de SEQ ID NOS: 6.

Normalmente, el anticuerpo comprende al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NOS: 4 a 6, y al menos una secuencia de la CDR de cadena liviana seleccionada de SEQ ID NOS 7 a 9. El anticuerpo puede comprender al menos dos secuencias de la CDR de cadena pesada seleccionadas de SEQ ID NOS: 4 a 6, y al menos dos secuencias de la CDR de cadena liviana seleccionadas de SEQ ID

NOS: 7 a 9. El anticuerpo normalmente comprende las tres secuencias de la CDR de cadena pesada de SEQ ID NOS: 4 a 6 (HCDR1/HCDR2/HCDR3 respectivamente) y las tres secuencias de la CDR de la cadena liviana SEQ ID NOS: 7 a 9 (LCDR1/LCDR2/LCDR3 respectivamente). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados.

El anticuerpo puede comprender una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) de SEQ ID NOS: 10 o 12 (la HCVR de las variantes 1 y 2 de Ab7326). El anticuerpo puede comprender una secuencia de región variable de cadena liviana (LCVR) de SEQ ID NO: 11 o 13 (la LCVR de las variantes 1 y 2 de Ab7326). El anticuerpo comprende preferiblemente la secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 10 o 12 y la secuencia de la región variable de cadena liviana de la SEQ ID NOS: 11 o 13 (especialmente los pares HCVR/LVCR de las SEQ ID NOS: 10/11 o 12/13).

Las variantes 1 y 2 de Ab7326 difieren en un solo aminoácido en la región variable de cadena pesada, y en un solo aminoácido en la región variable de cadena liviana, de la siguiente manera:

- La variante 1 de la región variable de cadena pesada tiene ácido glutámico (E) en la posición 6. (SEQ ID NO: 10)
- La variante 2 de la región variable de cadena pesada tiene glutamina (Q) en la posición 6. (SEQ ID NO: 12)
- La variante 1 de la región variable de cadena liviana tiene serina (S) en la posición 7. (SEQ ID NO: 11)
- La variante 2 de la región variable de cadena liviana tiene treonina (T) en la posición 7. (SEQ ID NO: 13)

Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada (HCVR) de SEQ ID NO: 10, en la que el residuo de ácido glutámico en la posición 6 está sustituido con un residuo de glutamina (E6Q); en donde la numeración de los residuos se encuentra de acuerdo con la SEQ ID NO: 10.

En una realización, el anticuerpo comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada (HCVR) de SEQ ID NO: 12, en la que el residuo de glutamina en la posición 6 está sustituido con un residuo de ácido glutámico (Q6E); en donde la numeración de los residuos se encuentra de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.

En una realización, el anticuerpo comprende una secuencia de la región variable de cadena liviana (LCVR) de SEQ ID NO: 11, en la que el residuo de serina en la posición 7 está sustituido con un residuo de treonina (S7T); en donde la numeración de los residuos se encuentra de acuerdo con la SEQ ID NO: 11.

5

En una realización, el anticuerpo comprende una secuencia de la región variable de cadena liviana (LCVR) de SEQ ID NO: 13, en la que el residuo de treonina en la posición 7 está sustituido con un residuo de serina (T7S); en donde la numeración de los residuos se encuentra de acuerdo con la SEQ ID NO: 13.

10

En una realización, el anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 o 4 para HCDR1, la secuencia de SEQ ID NO: 5 para HCDR2, la secuencia de SEQ ID NO: 6 para HCDR3, la secuencia de SEQ ID NO: 7 para LCDR1, la secuencia de SEQ ID NO: 8 para LCDR2 y la secuencia de SEQ ID NO: 9 para LCDR3; y en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad (por ejemplo, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con la secuencia de SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena liviana comprende una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad (por ejemplo, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con la secuencia de SEQ ID NO: 11.

15

20

En una realización, el anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 o 4 para HCDR1, la secuencia de SEQ ID NO: 5 para HCDR2, la secuencia de SEQ ID NO: 6 para HCDR3, la secuencia de SEQ ID NO: 7 para LCDR1, la secuencia de SEQ ID NO: 8 para LCDR2 y la secuencia de SEQ ID NO: 9 para LCDR3; y en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad (por ejemplo, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con la secuencia de SEQ ID NO: 12 y la región variable de cadena liviana comprende una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad (por ejemplo, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con la secuencia de SEQ ID NO: 13.

25

30

El anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena pesada (cadena H) de SEQ ID NO: 14 variante 1 de cadena pesada de IgG1 de longitud completa de ratón, o SEQ ID NO: 28 variante 2 de cadena pesada de IgG1 de longitud completa de ratón, o SEQ ID NO: 30 variante 1 de cadena pesada de IgG1 de longitud completa de humano, o SEQ ID NO: 16 variante 2 de cadena pesada de IgG1 de longitud completa de humano, o SEQ ID NO: 22 variante 1 de cadena pesada de IgG4P de longitud completa de humano,

35

o

SEQ ID NO: 34 variante 2 de cadena pesada de IgG4P de longitud completa de humano,
o

SEQ ID NO: 18 variante 1 de cadena pesada de Fab, o

SEQ ID NO: 32 variante 2 de cadena pesada de Fab.

5

El anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena liviana (Cadena L) de

SEQ ID NO: 15 variante 1 de cadena liviana de IgG1 de longitud completa de ratón, o

SEQ ID NO: 29 variante 2 de cadena liviana de IgG1 de longitud completa de ratón, o

SEQ ID NO: 31 variante 1 de cadena liviana de IgG1 de longitud completa de humano, o

10 SEQ ID NO: 17 variante 2 de cadena liviana de IgG1 de longitud completa de humano, o

SEQ ID NO: 23 variante 1 de cadena liviana de IgG4P de longitud completa de humano,

o

SEQ ID NO: 35 variante 2 de cadena liviana de IgG4P de longitud completa de humano,

o

15 SEQ ID NO: 19 variante 1 de cadena liviana de Fab, o

SEQ ID NO: 33 variante 2 de cadena liviana de Fab.

En un ejemplo, el anticuerpo comprende un par de secuencias de cadena pesada/cadena ligera de

20 SEQ ID NOS: 14/15 variante 1 de IgG1 de longitud completa de ratón, o

SEQ ID NOS: 28/29 variante 2 de IgG1 de longitud completa de ratón, o

SEQ ID NOS: 30/31 variante 1 de IgG1 de longitud completa de humano, o

SEQ ID NOS: 16/17 variante 2 de IgG1 de longitud completa de humano, o

SEQ ID NOS: 22/23 variante 1 de IgG4P de longitud completa de humano, o

25 SEQ ID NOS: 34/35 variante 2 de IgG4P de longitud completa de humano, o

SEQ ID NOS: 18/19 variante 1 de cadena liviana de Fab, o

SEQ ID NOS: 32/33 variante 2 de cadena liviana de Fab.

Las formas variantes de las secuencias correspondientes pueden intercambiarse. Por
ejemplo, el anticuerpo puede comprender un par de secuencias de cadena
pesada/cadena ligera de

30 SEQ ID NOS: 14/29 variante 1 de cadena pesada/variante 2 de cadena liviana de IgG1
de longitud completa de ratón, o

SEQ ID NOS: 28/15 variante 2 de cadena pesada/variante 1 de cadena liviana de IgG1

35 de longitud completa de ratón, o

SEQ ID NOS: 30/17 variante 1 de cadena pesada/variante 2 de cadena liviana de IgG1
de longitud completa de humano, o

- SEQ ID NOS: 16/31 variante 2 de cadena pesada/variante 1 de cadena liviana de IgG1 de longitud completa de humano, o
- SEQ ID NOS: 22/35 variante 1 de cadena pesada/variante 2 de cadena liviana de IgG4P de longitud completa de humano, o
- 5 SEQ ID NOS: 34/23 variante 2 de cadena pesada/variante 1 de cadena liviana de IgG4P de longitud completa de humano, o
- SEQ ID NOS: 18/33 variante 1 de cadena pesada/variante 2 de cadena liviana de Fab, o
- SEQ ID NOS: 32/19 variante 2 de cadena pesada/ variante 1 de cadena liviana de Fab.
- 10 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados.
- El anticuerpo alternativamente puede ser, o puede comprender, una variante de una de las secuencias específicas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, una variante puede ser una variante de sustitución, deleción o adición de cualquiera de las secuencias de
- 15 aminoácidos anteriores.
- Un anticuerpo variante puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20 o más (normalmente hasta un máximo de 50) sustituciones o deleciones de aminoácidos de las secuencias específicas discutidas anteriormente. Las variantes de "deleción" pueden
- 20 comprender la deleción de aminoácidos individuales, la supresión de pequeños grupos de aminoácidos tales como 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o la supresión de regiones de aminoácidos más grandes, tal como la supresión de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Las variantes de "sustitución" normalmente implican el reemplazo de uno o más aminoácidos con el mismo número de aminoácidos y hacer sustituciones
- 25 conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, un aminoácido puede sustituirse con un aminoácido alternativo que tenga propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrofílico, otro aminoácido hidrofóbico , otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20
- 30 aminoácidos principales que se pueden utilizar para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

Tabla 1: Propiedades de aminoácidos.

Ala	alifático, hidrofóbico, neutral	Met	hidrofóbico, neutral
Cys	polar, hidrofóbico, neutral	Asn	polar, hidrofílico, neutral

Asp	polar, hidrofílico, cargado (-)	Pro	hidrofóbico, neutral
Glu	polar, hidrofílico, cargado (-)	Gln	polar, hidrofílico, neutral
Phe	aromático, hidrofóbico, neutral	Arg	polar, hidrofílico, cargado (+)
Gly	alifático, neutral	Ser	polar, hidrofílico, neutral
His	aromático, polar, hidrofílico, cargado (+)	Thr	polar, hidrofílico, neutral
Ile	alifático, hidrofóbico, neutral	Val	alifático, hidrofóbico, neutral
Lys	polar, hidrofílico, cargado (+)	Trp	aromático, hidrofóbico, neutral
Leu	alifático, hidrofóbico, neutral	Tyr	Aromático, polar, hidrofóbico

Los “derivados” o “variantes” generalmente incluyen aquellos en los que, en lugar de un aminoácido natural, el aminoácido que aparece en las secuencias es un análogo estructural del mismo. Los aminoácidos utilizados en las secuencias también pueden ser

5 derivatizados o modificados, por ejemplo, etiquetados, proporcionando la función del anticuerpo no se ve significativamente afectado negativamente.

Los derivados y las variantes tal como se describieron anteriormente pueden prepararse durante la síntesis del anticuerpo o por modificación posterior a la producción, o cuando

10 el anticuerpo está en forma recombinante utilizando las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o escisión enzimática o ligación de ácidos nucleicos.

Los anticuerpos variantes pueden tener una secuencia de aminoácidos que tiene más de

15 aproximadamente 60 % o más de aproximadamente 70 %, por ejemplo, 75 u 80 %, normalmente más de aproximadamente 85 %, por ejemplo, más del 90 % o 95 % de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos descritas en este documento (particularmente las secuencias HCVR/LCVR y las secuencias de cadenas H y L). Además, el anticuerpo puede ser una variante que tiene más de aproximadamente

20 60 %, o más de aproximadamente 70 %, por ejemplo, 75 u 80 %, normalmente más de aproximadamente 85 %, por ejemplo, más del 90 % o 95 % de identidad de aminoácidos con las secuencias HCVR/LCVR y las secuencias de cadenas H y L descritas en este documento, mientras se conservan las CDR exactas descritas para estas secuencias. Las variantes pueden retener al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las secuencias HCVR/LCVR y con las

25

secuencias de cadenas H y L descritas en el presente documento (en algunas circunstancias mientras se conservan las CDR exactas).

5 Las variantes normalmente retienen aproximadamente 60 % a aproximadamente 99 % de identidad, aproximadamente 80 % a aproximadamente 99 % de identidad, aproximadamente 90 % a aproximadamente 99 % de identidad o aproximadamente 95 % a aproximadamente 99 % de identidad. Este nivel de identidad de aminoácidos se puede observar en la longitud total de la secuencia de SEQ ID NO relevante o en una parte de la secuencia, por ejemplo, a en 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 o más aminoácidos,
10 dependiendo del tamaño del polipéptido de longitud completa.

En relación con las secuencias de aminoácidos, la "identidad de secuencia" se refiere a secuencias que tienen el valor establecido cuando se evalúan usando ClustalW (Thompson et al., 1994, supra) con los siguientes parámetros:

15 Parámetros de alineación por pares -Método: preciso, Matriz: PAM, penalización por apertura de hueco (Gap open penalty): 10.00, penalización por extensión de hueco (Gap extension penalty): 0.10;

Múltiples parámetros de alineación -Matriz: PAM, penalización por apertura de hueco: 10,00, % de identidad por retraso: 30, penalizar huecos finales: activado, distancia de separación de huecos: 0, matriz negativa: no, penalización por extensión de hueco:
20 0,20, penalizaciones por huecos específicos de residuos: activado, penalizaciones por hueco hidrofílico: activado, residuos hidrofílicos: GPSNDQEKR. La identidad de secuencia en un residuo particular pretende incluir residuos idénticos que simplemente se han derivatizado.

25

Por lo tanto, los anticuerpos que tienen secuencias específicas y derivados y variantes que mantienen la función o actividad de estas cadenas se proporcionan para su uso en la presente invención.

30 El término "derivados", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidas. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento enlazador a un polímero. Se apreciará que el residuo de un grupo de este tipo en algunos casos formará parte del producto como grupo de enlace entre el fragmento de
35 anticuerpo y el polímero.

El polímero puede ser un polímero sintético o natural, por ejemplo, un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homo o heteropolisacárido.

- 5 Los sustituyentes opcionales específicos, que pueden estar presentes en un polímero sintético, incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) o sus derivados, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido, tal como el

- 10 metoxipoli (etilenglicol) o sus derivados.

Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

- 15 El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero generalmente estará en un rango de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo, de 5000 a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular sobre la base del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizar ciertos tejidos o extender la semivida circulante (para revisión, ver Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando el
- 20 producto está destinado a salir de la circulación y penetrar en el tejido, puede ser conveniente utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo, con un peso molecular de alrededor de 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

25

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo y especialmente con un peso molecular en el intervalo desde alrededor de 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

30

En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención están unidos a fracciones de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se pueden unir mediante cualquier cadena lateral de aminoácidos o grupo funcional de aminoácidos terminal disponible

- 35 localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden producirse de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden ser diseñados en el fragmento usando métodos de

- ADN recombinante (ver, por ejemplo, las patentes US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo es un fragmento Fab modificado en el que la modificación consiste en la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región de pivoteo modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que la molécula efectora se puede unir. Se pueden utilizar sitios múltiples para unir dos o más moléculas de PEG.
- 10 Los anticuerpos pueden competir por unirse a la Gremlina-1 con, o unirse al mismo epítipo que, los definidos anteriormente en términos de secuencias de cadena H/cadena L, HCVR/LCVR o CDR. En particular, un anticuerpo puede competir por unirse a la Gremlina-1 con, o unirse al mismo epítipo que, un anticuerpo que comprende una combinación de secuencias 0HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de SEQ ID
- 15 NOS: 4/5/6/7/8/9. Un anticuerpo puede competir por unirse a la Gremlina-1 con, o unirse al mismo epítipo que, un anticuerpo que comprende un par de secuencias de HCVR y LCVR de SEQ ID NO: 10/11 o 12/13 o cadenas de longitud completa de SEQ ID Nos: 14/15 o 16/17.
- 20 Un "epítipo" es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo. Los epítipos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítipos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítipos estructurales y tienen aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítipos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos de aminoácidos no lineales. En
- 25 ciertas realizaciones, los epítipos pueden incluir determinantes que son agrupaciones de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas o características específicas de carga.
- 30 Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo como, o compite por unirse con, un anticuerpo de referencia mediante el uso de métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo como anticuerpo de referencia para su uso en la invención, se permite
- 35 que el anticuerpo de referencia se una a una proteína o péptido bajo condiciones de saturación. Posteriormente, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la proteína o péptido. Si el anticuerpo de prueba puede unirse a la proteína o

péptido después de la unión de saturación con el anticuerpo de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítopo diferente al anticuerpo de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no puede unirse a la proteína o péptido seguido de la unión de saturación con el anticuerpo de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítopo que el epítopo unido con el anticuerpo de referencia de la invención.

Para determinar si un anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos direcciones. En una primera dirección, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína/péptido bajo condiciones de saturación seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula de proteína/péptido. En una segunda dirección, se permite que el anticuerpo de prueba se una a la proteína/péptido bajo condiciones de saturación seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la proteína/péptido. Si, en ambas direcciones, solo el primer anticuerpo (saturante) es capaz de unirse a la proteína/péptido, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a la proteína/péptido. Como apreciará la persona experta, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia no necesariamente se une al epítopo idéntico como el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia uniéndolo a un epítopo superpuesto o adyacente.

Dos anticuerpos se unen al mismo epítopo o se superponen si cada uno inhibe (bloquea) de forma competitiva la unión del otro al antígeno. Es decir, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro al menos en un 50 %, 75 %, 90 % o incluso 99 %, medido en un ensayo de unión competitivo (ver, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res, 1990: 50: 1495-1502). Como alternativa, dos anticuerpos tienen el mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

Luego se puede llevar a cabo una experimentación rutinaria adicional (por ejemplo, el análisis de mutación peptídica y unión) para confirmar si la falta observada de unión del anticuerpo de prueba se debe realmente a la unión al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo se pueden realizar usando ELISA, RIA,

resonancia de plasmón superficial, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión a anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica.

Se ha encontrado que el anticuerpo anti-gremlina-1 de los ejemplos, Ab7326, se une a los siguientes residuos de Gremlina-1: Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 y Gln175; donde Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 y Gln175 están presentes en un monómero de Gremlina-1 y el Ile131 está presente en el segundo monómero de Gremlina-1. La numeración se basa en el registro UniProt O60565 de la SEQ ID NO: 1. Como se discute en la sección de ejemplos, estos residuos de epítomos se identificaron utilizando análisis NCONT en 4 Å del complejo Fab Gremlina-1-Ab7326.

Por lo tanto, los anticuerpos para uso en la invención pueden unirse a un epítomo que comprende al menos un residuo seleccionado de Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 y Gln175 (con la numeración de los residuos basada en la SEQ ID NO: 1). Los anticuerpos para su uso en la invención pueden unirse a un epítomo que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o los 9 de estos residuos (preferiblemente al menos 5 residuos).

Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden reconocer un epítomo en el que Ile131 está presente en un monómero de Gremlina-1 diferente a los otros residuos.

Aunque estos residuos se proporcionan para una secuencia particular de Gremlina-1 humana, la persona experta podría extrapolar las posiciones de estos residuos a otras secuencias de Gremlina correspondientes utilizando técnicas de rutina. Por lo tanto, los anticuerpos que se unen a epítomos que comprenden los residuos correspondientes dentro de estas otras secuencias de Gremlina también se proporcionan para su uso en la invención.

Para tamizar anticuerpos que se unen a un epítomo particular, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Otros métodos incluyen mutantes de exploración de alanina, transferencias de péptidos (Reineke (2004) Methods Mol Biol 248: 443-63) o análisis de escisión de péptidos. Adicionalmente, se pueden emplear métodos como la escisión del epítomo, la extracción del epítomo y la modificación química de los antígenos (Tomer (2000) Protein Science 9: 487-496). Tales métodos son reconocidos en la técnica.

Los epítomos de anticuerpos también pueden determinarse mediante análisis de cristalografía de rayos X. Por lo tanto, los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden evaluarse mediante análisis de cristalografía en rayos X del anticuerpo
5 unido a la Gremlina-1. Los epítomos pueden, en particular, ser identificados de esta manera determinando los residuos en la Gremlina-1 dentro de 4 Å de un residuo del paratopo del anticuerpo.

Los anticuerpos pueden ser ensayados para la unión a Gremlina-1 mediante, por
10 ejemplo, ELISA estándar o electrotransferencia (*Western blot*). También se puede utilizar un ensayo ELISA para detectar hibridomas que muestren reactividad positiva con la proteína objetivo. La selectividad de unión de un anticuerpo también se puede determinar monitoreando la unión del anticuerpo a las células que expresan la proteína
15 objetivo, por ejemplo, por citometría de flujo. Por lo tanto, un método de detección puede comprender el paso de identificar un anticuerpo que es capaz de unirse a la Gremlia-1 mediante la realización de una prueba ELISA o de una Western blot o mediante citometría de flujo.

Los anticuerpos pueden reconocer de manera selectiva (o específica) la Gremlina-1. Un
20 anticuerpo u otro compuesto "se une selectivamente" o "reconoce selectivamente" una proteína cuando se une con afinidad preferencial o alta a la proteína para la cual es selectiva pero no se une sustancialmente, o se une con baja afinidad, a otras proteínas. La selectividad de un anticuerpo puede estudiarse adicionalmente determinando si el anticuerpo se une o no a otras proteínas relacionadas como se discutió anteriormente o si
25 este discrimina entre ellas. Los anticuerpos para uso en la invención normalmente reconocen la Gremlina-1 humana.

Los anticuerpos también pueden tener reactividad cruzada para proteínas relacionadas o para la Gremlina-1 humana o Gremlina-1 de otras especies.

30

Por específico (o selectivo) se entenderá que el anticuerpo se une a la proteína de interés sin ninguna reactividad cruzada significativa para cualquier otra molécula. La reactividad cruzada se puede evaluar mediante cualquier método adecuado descrito en este documento. La reactividad cruzada de un anticuerpo se puede considerar significativa si
35 el anticuerpo se une a la otra molécula en al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 100 % tan fuerte como se une a la proteína de interés. Un anticuerpo que es

específico (o selectivo) se puede unir a otra molécula en menos de aproximadamente 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 % o 20% de la fuerza con la que se une a la proteína de interés. El anticuerpo se puede unir a la otra molécula en menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 % o menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 2 % o menos de aproximadamente 1 % de la fuerza con la que se une a la proteína de interés.

Por lo tanto, los anticuerpos adecuados para su uso en la presente invención pueden tener una unión de alta afinidad por la Gremlina-1 (humana). El anticuerpo puede tener una constante de disociación (K_D) de menos de <1 nM, y preferiblemente < 500 pM. En un ejemplo, el anticuerpo tiene una constante de disociación (K_D) de menos de 200 pM. En un ejemplo, el anticuerpo tiene una constante de disociación (K_D) de menos de 100 pM. Se pueden utilizar una variedad de métodos para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo por su antígeno objetivo, tales como ensayos de resonancia de plasmones de superficie, ensayos de saturación o inmunoensayos como ELISA o RIA, como son bien conocidos por los expertos en la materia. Un ejemplo de un método para determinar la afinidad de unión es mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales en un instrumento BIAcore™ 2000 (Biacore AB, Friburgo, Alemania) utilizando chips sensores CM5, como los descritos por Krinner et al., (2007) Mol. Immunol. Febrero; 44(5):916-25. (Epub 2006 11 de mayo)).

El anticuerpo anti-Gremlina-1 de los ejemplos, es un inhibidor alostérico de la actividad de la Gremlina-1 que se une a un epítipo distal de sitio de unión de la BMP. (WO 2018/115017 A2). El Ab7326 se une a la Gremlina-1 con afinidad excepcionalmente alta con un valor K_d < 100pM, y se espera que sea particularmente útil para su uso en la presente invención.

Un inhibidor de la actividad de la gremlina-1 puede tener un efecto sobre cualquiera de las funciones de la Gremlina-1, pero generalmente reduce la unión de la Gremlina-1 a la BMP (BMP 2, 4 o 7). La Gremlina-1 es un regulador negativo de BMP y, por lo tanto, la unión reducida aumenta la señalización a través de la BMP.

La unión y señalización de la BMP puede detectarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Los ejemplos de la presente solicitud describen dos ensayos funcionales para evaluar si un agente reduce la unión de la gremlina-1 a la BMP. El ejemplo 3 describe un ensayo de gen indicador Id1, donde el gen Id1 es un gen objetivo de

señalización de la BMP. Se puede utilizar un aumento en la señalización en este ensayo para determinar si un agente reduce la unión de la Gremlina-1 a la BMP. El ejemplo 5 describe un ensayo de fosforilación SMAD. Las SMAD1, 5 y 8 se fosforilan tras la señalización de la BMP. Por lo tanto, se puede utilizar un aumento en la fosforilación de la SMAD para determinar si un agente reduce la unión de la Gremlina-1 a la BMP.

Una vez que se ha identificado y seleccionado un anticuerpo adecuado, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se puede identificar por métodos conocidos en la técnica. Los genes que codifican el anticuerpo pueden clonarse utilizando cebadores degenerados. El anticuerpo puede ser producido de forma recombinante por métodos de rutina.

En la lista de secuencias se proporcionan ejemplos de secuencias de ADN que codifican cadenas pesadas de longitud completa y cadenas ligeras de Ab7326:

- SEQ ID NO: 24 (variante 1 de ADN de cadena pesada de IgG1 humana)
- SEQ ID NO: 25 (variante 1 de ADN de cadena liviana de IgG1 humana)
- SEQ ID NO: 26 (variante 1 de ADN de cadena pesada de IgG4P humana)
- SEQ ID NO: 27 (variante 1 de ADN de cadena liviana de IgG4P humana)

Composiciones farmacéuticas, dosificación y regímenes de dosificación

Se puede proporcionar un inhibidor de la actividad de la gremlina-1 para su uso en la presente invención en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica normalmente será estéril y típicamente incluirá un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica para su uso en la invención puede comprender adicionalmente un adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "*sal farmacéuticamente aceptable*" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada de la molécula madre y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado. Entre los ejemplos de estas sales se incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base.

Como se utiliza en el presente documento, el término "*portador farmacéuticamente aceptable*" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y

- retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El portador puede ser adecuado para parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo, por inyección o infusión. Como alternativa,
- 5 el portador puede ser adecuado para la administración no parenteral, como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa. El portador puede ser adecuado para administración oral. Dependiendo de la vía de administración, el inhibidor puede estar recubierto con un material para protegerlo de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el inhibidor.
- 10
- Los portadores farmacéuticamente aceptables comprenden portadores o diluyentes acuosos. Los ejemplos de portadores acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención incluyen el agua, el agua tamponada y la solución salina. Los ejemplos de otros portadores incluyen el etanol, los
- 15 polioles (como el glicerol, el propilenglicol, el polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de estos, los aceites vegetales, como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como el manitol, el sorbitol o el cloruro de sodio en la composición.
- 20
- Las composiciones farmacéuticas por lo general deben ser estériles y estables en condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, micro emulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco.
- 25
- Las composiciones farmacéuticas para su uso en la invención pueden comprender ingredientes activos adicionales.
- También se contemplan kits que comprenden un inhibidor de la actividad de la gremlina-1
- 30 e instrucciones para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la invención.
- Los agentes para su uso en la invención o sus formulaciones o composiciones pueden administrarse para tratamientos terapéuticos o profilácticos.
- 35
- En aplicaciones terapéuticas, los agentes se administran a un sujeto que ya padece un trastorno o afección, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la afección o uno o más de sus síntomas. Este tratamiento terapéutico puede resultar en

una disminución en la severidad de los síntomas, o un aumento en la frecuencia o duración de los períodos sin síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "*cantidad terapéuticamente efectiva*".

- 5 En aplicaciones profilácticas, los agentes se administran a un sujeto en riesgo de un trastorno o afección, en una cantidad suficiente para prevenir o reducir los efectos posteriores de la afección o uno o más de sus síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "*cantidad profilácticamente efectiva*". Las cantidades efectivas para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o de la
- 10 lesión, así como del peso y el estado general del sujeto.

Un sujeto para la administración puede ser un animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, los mamíferos y no mamíferos, por ejemplo, los primates no humanos, los perros, los gatos, los caballos, las

15 ovejas, las vacas, los pollos, los anfibios, los reptiles, etc.; la administración a humanos es típica.

Un agente o composición farmacéutica para su uso en la invención puede administrarse a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de una variedad de

20 métodos conocidos en la técnica. Como apreciará la persona versada en la materia, la ruta o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los ejemplos de rutas de administración para agentes o composiciones farmacéuticas para su uso en la invención incluyen rutas parenterales, como las rutas de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea o

25 espinal, por ejemplo, por inyección o infusión. Como alternativa, un agente o composición farmacéutica se puede administrar a través de una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosa. El agente o composición farmacéutica puede ser para administración oral.

30 Un médico experto puede determinar una dosis adecuada de un agente inhibidor o composición farmacéutica para su uso en la invención. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y

35 modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, la ruta de

administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

5

Una dosificación adecuada puede ser, por ejemplo, en el rango de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal, normalmente de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100mg/kg de peso corporal del paciente a tratar. Por ejemplo, una dosificación adecuada puede ser de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 10mg/kg de peso corporal al día o de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5mg/kg de peso corporal al día.

10

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una dosis única, se puede administrar varias dosis divididas con el paso del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indique la situación terapéutica. La forma de unidad de dosificación como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de agente activo y calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

15

20

La administración puede ser en dosis únicas o múltiples. Se puede administrar dosis múltiples a través de estas o diferentes rutas y a las mismas o diferentes ubicaciones.

25

Como alternativa, las dosis pueden ser a través de una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia pueden variar según la semivida del agente inhibidor en el paciente y la duración del tratamiento deseado.

30

Los agentes, formulaciones o composiciones farmacéuticas para su uso en la invención pueden administrarse juntamente con uno u otro agente terapéutico más. La administración combinada de dos o más agentes se puede lograr de varias maneras diferentes. Ambos pueden administrarse juntos en una sola composición o pueden administrarse en composiciones separadas como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, uno puede administrarse antes, después o simultáneamente con el otro.

35

Indicaciones terapéuticas

Los inhibidores de la actividad de la gremlina-1, de acuerdo con la presente invención, se proporcionan para el tratamiento de una fractura o defecto óseos. Una fractura ósea es una fractura o fisura en el tejido óseo y puede ser el resultado de una lesión traumática como una caída o un impacto, pero también puede ocurrir como resultado de enfermedades que afectan la integridad ósea. Un defecto óseo es una pérdida de hueso debido a un trauma o enfermedad.

La fractura puede ser una fractura de cualquier hueso del cuerpo.

El defecto óseo puede ser un defecto óseo en cualquier hueso del cuerpo.

El defecto óseo puede ser un defecto óseo en cualquier hueso del cuerpo. Una fractura de unión retardada se define como una fractura que no logra alcanzar la unión dentro de los 6 meses posteriores a la fractura. Una no unión de fractura se define como la curación incompleta en 9 meses, combinada con la falta de características radiológicas asociadas con la curación de la fractura que se observa durante tres meses consecutivos. (Einhorn et al; 2014; Buza et al; 2016). Entre los ejemplos de fracturas que son propensas a un desarrollo de unión tardía o no unión se incluyen las de tibia, radio distal, cuello femoral y escafoides.

En una realización, la fractura o defecto óseos se produce como resultado de una enfermedad que afecta la integridad ósea. Los ejemplos de enfermedades que afectan la integridad ósea incluyen, entre otros, osteoporosis, osteogénesis imperfecta, diabetes, enfermedad ósea de Paget, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, mieloma múltiple, cáncer primario de huesos (por ejemplo, osteosarcoma, sarcoma de Ewing y condrosarcoma), cánceres con metástasis al hueso (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de pulmón), hiperostosis esquelética idiopática difusa, osteomielitis, enfermedad renal, distrofia muscular de Duchenne y talasemia mayor.

FIGURAS

La figura 1 muestra el porcentaje de restauración de la señal para los anticuerpos derivados de inmunización en el ensayo del gen reportero HEK-ID1.

La figura 2 muestra el porcentaje de restauración de la señal para los anticuerpos derivados de librerías en el ensayo del gen reportero HEK-ID1.

La figura 3 muestra los resultados para el ensayo del gen reportero HEK-ID1 con titulaciones de Gremlina humana (figura 3A) y Gremlina de ratón (Figura 3B) y el efecto del anticuerpo 7326 (mostrado como anticuerpo PB376) en la restauración de la señalización de la BMP.

La figura 4 muestra un modelo estructural del complejo Gremlina-Fab, con las posibles regiones de unión a la BMP y el epítipo Fab resaltado.

La figura 5 muestra el examen del área desprovista de callos/tejido óseo durante la reparación de la fractura en imágenes de rayos X adquiridas. El área dentro del defecto, que carecía de tejido, se cuantificó utilizando un análisis de imagen definitivo y posteriormente se comparó entre el grupo control y el grupo tratado con anti-gremlina 1. Los resultados se presentan como la media $\pm$ DE de 10 ratas/grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ medido por la prueba U de Mann-Whitney.

La figura 6 muestra el examen de HBM (hueso bajo en minerales; hueso recién formado) y HAM (hueso alto en minerales; hueso maduro) dentro de un defecto óseo femoral de 3 mm. Panel A: análisis 3D μ Ct de la región del defecto óseo femoral para detectar hueso recién formado o hueso maduro. Se midió el porcentaje de volumen óseo/volumen de tejido y se comparó a todos los sujetos (total) entre el control frente a los tratamientos con anti-gremlina 1. También se realizaron comparaciones entre el grupo de control versus el grupo tratado con anti-gremlina 1 en animales separados como de baja respuesta (BR- puente incompleto) y alta respuesta (AR- puente completo). Los resultados se presentan como la media $\pm$ DE. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ medido por la prueba U de Mann-Whitney. Panel B: μ Ct representativo que ilustra las representaciones en 3D del volumen óseo de los grupos BR y AR en el control y después del tratamiento con anti-gremlina 1.

La figura 7 muestra el análisis histomorfométrico del defecto óseo femoral. El porcentaje de volumen óseo/volumen de tejido (VO/VT (%)), número trabecular (N.Tb.) y separación trabecular (Sp.Tb.) se comparó entre el grupo control frente al grupo tratado con anti-gremlina 1. Los resultados se presentan como la media $\pm$ DE de 10 ratas/grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ medido por la prueba U de Mann-Whitney.

La figura 8 muestra la correlación del análisis 3D μ CT y el análisis de histomorfometría 2D del % total de VO/VT. Las correlaciones se realizaron en ambos grupos en HBM (hueso bajo en minerales; hueso recién formado) y HAM (hueso alto en minerales; hueso maduro) dentro de un defecto óseo femoral de 3 mm y se compararon con los datos de puntuación de histomorfometría 2D (n = 20). La puntuación de Pearson indica una correlación significativa del % de VO/VT entre el análisis 3D μ CT y el análisis de histomorfometría 2D.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1- Expresión, purificación, replegamiento y determinación estructural de proteínas

Expresión de proteínas y preparación de cuerpos de inclusión

Una secuencia codificadora de Gremlin-1 humana truncada (SEQ ID NO: 20), optimizada para la expresión en E. coli, se clonó en un vector pET32a modificado (Merck Millipore) usando BamHI/XhoI, generando un vector que codifica la secuencia Gremlina con una etiqueta 6His-TEV N-terminal (pET-hGremlina1).

Secuencia expresada

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTI
HEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLP
PTKKKRVTRVKQCRCISIDLD; SEQ ID NO: 2 (con residuos no gremlinos de la etiqueta
6His-TEV N-terminal mostrados en cursiva). Numeración de secuencia según UniProt
O60565 y SEQ ID NO: 1.

El ADN plasmídico del pET-hGremlina1 se utilizó para transformar células BL21(DE3). Se recogió una única colonia resistente a ampicilina de una placa de agar LB/Amp y se utilizó para inocular un cultivo iniciador de 100 ml de LB/Amp. Después de agitar (a 200 rpm) durante 16 horas a 37 °C, se utilizaron 25 ml del cultivo iniciador para inocular 500 mL de medio 2xTY/Amp. El cultivo se agitó (a 250 rpm) a 37 °C hasta que se alcanzó un DO600 de 3. Posteriormente, el cultivo se complementó con 20 mL de una mezcla de alimentación MOPS + glicerol (MOPS 1M pH de 7,4, glicerol al 40 %, MgSO4 al 0,5 %, 31

MgCl₂ al 0,42%), se indujo con 300 µM de IPTG y se incubó adicionalmente a 17 °C, a 180 rpm por 16 horas. Las células se recolectaron en una centrifuga (4000 g durante 20 minutos a 4 °C).

- 5 Los sedimentos celulares se resuspendieron en solución tampón de lisis (PBS pH de 7,4, 0,35 mg/mL de lisozima, 10 µg/mL de DNasa y 3 mM de MgCl₂) a 4 °C y la fracción insoluble se recolectó por centrifugación a 3500 g durante 30 minutos a 4 °C . Los cuerpos de inclusión precipitados se lavaron tres veces resuspendiendo en solución tampón de lavado (50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, Triton X-100 al 0,5 %, pH de 8,0),
- 10 seguido de centrifugación a 21000 g durante 15 minutos. Se realizaron dos lavados adicionales utilizando solución tampón de lavado sin Triton X-100.

Solubilización

- 15 Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en solución tampón desnaturizante (8 M de urea, 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 10 mM de Na₂S₄O₆ y 100 mM de Na₂SO₃, pH de 8,5), se agitaron durante 16 horas a temperatura ambiente y se clarificaron por centrifugación a 21000 g durante 15 minutos.

20 Purificación antes del replegamiento

- Los cuerpos de inclusión solubilizados se cargaron en una columna Sephacryl S-200 26/60 (120 mL) equilibrada en 8 M de urea, 50 mM de MES, 200 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, pH de 6,0. Las fracciones que contenían proteína Gremlina-1 se diluyeron con 6
- 25 M de urea, 20 mM de MES, pH de 6,0 y se cargaron en columnas de intercambio catiónico HiTrap SP HP, y se eluyeron con un gradiente de 1 M de NaCl sobre 10 volúmenes de columna (10 VC). Se agruparon las fracciones que contenían proteína hGremlina-1 desnaturizada purificada.

30 Replegamiento

- La proteína Gremlin-1 purificada desnaturizada se añadió gota a gota al tampón de replegado (50 mM de Tris, pH de 8,5, 150 mM de NaCl, 5 mM de GSH y 5 mM de GSSG, 0,5 mM de cisteína, 5 mM de EDTA, 0,5 M de arginina) a una concentración final de 0,1
- 35 mg /mL e incubada a 4 °C con agitación constante durante 5 días. Después de 5 días, la proteína Gremlina-1 se dializó contra 20 mM de HEPES, 100 mM de NaCl, pH de 7,5.

Después de la diálisis, se aplicó proteína a la columna de heparina HiTrap y se eluyó utilizando un gradiente de 0-100 % de solución tampón de elución de heparina (HEPES 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5) durante 20 VC. La proteína plegada correctamente se eluyó en 1 M de NaCl, mientras que cualquier proteína mal plegada se eluyó a concentraciones de sal más bajas.

La proteína que se eluyó a 1 M de NaCl se concentró y se purificó adicionalmente en una columna S75 26/60 equilibrada con 20 mM de Hepes, pH de 7,5, 1 M de NaCl.

La proteína se caracterizó por SDS PAGE (cambio en el gel), demostró tener el peso molecular esperado y la disposición correcta de los enlaces disulfuro mediante cromatografía líquida de espectrometría de masas (LC-MS) y ser activa en un ensayo celular (ensayo reportero ID1).

15 Determinación de la estructura de la Gremlina 1

Los cristales de proteína Gremlina 1 se cultivaron utilizando el método de gota colgante mezclando una solución de Gremlina 1 a 6,6 mg/mL y 0,1 M de ácido cítrico con pH de 4; 1 M de cloruro de litio y 27 % de polietilenglicol (PEG) 6000 en una relación 1:1. Antes de la recolección de datos, los cristales se protegieron criogénicamente agregando 20 % de glicerol a la solución tampón de cristalización. Los datos de difracción se recolectaron en la Diamond Light Source y se procesaron utilizando XDS (Kabsch, Wolfgang (2010) Acta Crystallographica Sección D 66, 125-132). Las estadísticas de datos de difracción se resumen en la tabla a continuación:

25

Tabla 2: Estadísticas de datos de difracción

Estadísticas de difracción	
Longitud de onda (Å)	0,97949;
Grupo espacial	C2
Dimensiones de la celda	a= 84,55 Å, b=107,22 Å, c=77,09 Å; $\alpha=90,00^\circ$, $\beta=120,43^\circ$, $\gamma=90,00^\circ$
Rango de resolución * (Å)	26,19-2,72 (2,79-2,72)
Compleitud (%)	98,5 (99,0)
Multiplicidad	3,4 (3,4)

I/sigma	9,6 (2,0)
Rmerge	0,095 (0,622)
Estadísticas de refinamiento	
Rango de resolución (Å)	26,19 - 2,72
R _{cryst}	0,24
R _{free}	0,29
R.m.s.d. enlaces (Å)**	0,013
R.m.s.d. ángulos (°)	1,782

* Los valores entre paréntesis corresponden a la estructura de mayor resolución

** Raíz del error cuadrático medio (R.m.s.d. por sus siglas en inglés).

- 5 La estructura de la Gremlina-1 se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando Phaser (McCoy et al, J Appl Cryst (2007), 40, 658-674) y un modelo de Gremlina-1 disponible a partir de las coordenadas del complejo patentado Gremlin-1/Fab. El modelo resultante de Gremlina-1 contenía cuatro copias del monómero Gremlina 1 organizadas como dos dímeros. Las correcciones del modelo se realizaron con Coot (Emsley et al. 10 Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66 (4), 486-501) y las coordenadas se refinaron utilizando Refmac (Murshudov et al REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2011;67(Pt 4):355-367). Las coordenadas finales se validaron con Molprobity (Chen et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for 15 macromolecular crystallography. Acta Crystallographica D66:12-21). En la Tabla 2 anterior se muestra un resumen de las estadísticas de refinamiento del modelo.

Ejemplo 2- Residuos de unión de la BMP en la Gremlina-1

20

Como se discutió anteriormente, la Gremlina-1 pertenece a la familia de proteínas antagonistas de la proteína morfogénica ósea (BMP) dentro de un subgrupo conocido como la familia DA, dentro de la cual, la Gremlina-1 comparte la mayor homología con Gremlina-2 (PRDC).

25

La estructura de la Gremlina-1 humana de 2.7 Å resuelta en el Ejemplo 1 comparte muchas características en común con la estructura de la Gremlina-2 de ratón publicada (Nolan et al (2013), Structure, 21, 1417–1429). El pliegue general es muy similar, con

dos copias de Gremlina-1 formando un dímero antiparalelo no covalente, dispuesto en un arco. Cada monómero adopta la disposición característica dedo-muñeca-dedo con un motivo de nudo de cistina hacia el extremo de la muñeca, opuesto a los dedos. La identidad de secuencia entre las proteínas aumenta en un 52 % a un 67 % dentro de la secuencia visible en las dos estructuras. La región más altamente conservada se encuentra en la interfaz de dímero extensa donde todos los residuos de contacto clave están 100 % conservados.

Los residuos implicados en la unión de BMP 2, 4 y 7 a la Gremlina-2 (PRDC) de ratón y DAN (NBL1) se han identificado utilizando mutagénesis (Nolan et al (2013), Structure, 21, 1417-1429 y Nolan et al (2014) J. Biol. Chem. 290, 4759-4771). El epítipo de unión a BMP previsto abarca un parche hidrófobo que se extiende a través de ambos monómeros en la superficie convexa del dímero. Se identificaron seis residuos por mutagénesis; Trp72, Phe96, Tyr98, Phe104, Tyr105 y Phe117 y están 100 % conservados en la Gremlina-1 humana (numeración basada en la secuencia de Gremlina-2 de ratón). El grado de homología se extiende al posicionamiento de las cadenas laterales que adoptan una conformación idéntica en ambas proteínas.

La numeración de los aminoácidos utilizados en el archivo PDB de la Gremlina coincide la numeración en la estructura de la Gremlina-2 de ratón publicada con base en una alineación estructural. Esto permite una comparación de aminoácidos al describir las estructuras. Sin embargo, para más claridad, los residuos clave identificados como aquellos que juegan un papel importante en la unión de BMP se muestran a continuación con la numeración basada en el archivo PDB y en el archivo UniProt de la SEQ ID NO: 1 en paréntesis:

Trp72(93), Phe96(117), Tyr98(119), Phe104(125), Tyr105(126) & Phe117(138).

Tanto en la Gremlina-2 de ratón como en la Gremlina-1 humana, el epítipo de unión a BMP hidrófobo está parcialmente enterrado por una hélice alfa formada por los residuos N-terminales de cada proteína. Se ha propuesto un modelo de unión BMP mediante el cual el extremo N puede flexionarse, exponiendo la interfaz de unión BMP completa (Nolan et al (2013), Structure, 21, 1417–1429). En el presente análisis, los residuos N-terminales se eliminaron de las estructuras de la Gremlina-1 humana y de la Gremlina-2 de ratón antes de generar una superficie para revelar la similitud de las caras de unión a BMP en cada proteína.

La literatura solo describe la mutagénesis de seis residencias que tienen un efecto sobre la unión de BMP. Es posible que el epítipo BMP real cubra un área de superficie más amplia, abarcando aminoácidos vecinos. Al resaltar todos los residuos, dentro de 6 Å de los mutados, en la superficie de Gremlina-1, se revela una región más grande de la Gremlina-1 que podría ser objetivo de un agente terapéutico. Esta región más extensa abarca los siguientes aminoácidos del Gremlina-1 humana:

Asp92-Leu99
Arg116-His130
Ser137-Ser142
Cys176-Cys178

(Numeración basada en la SEQ ID NO: 1)

Al combinar la información publicada con la información de la estructura cristalina de la Gremlina-1 humana, se han identificado regiones de la Gremlina-1 humana que se ofrecen como una ruta potencial para la intervención terapéutica que bloquea su interacción con las BMP.

Ejemplo 3: ensayo del gen reportero Hek Id1

Antecedentes

El ensayo del gen reportero Hek Id1 utiliza células reporteras Clon 12 Hek293-Id1. Esta línea celular se transfectó de manera estable con el factor de transcripción Id1. Dicho Id1 es un factor de transcripción en la vía de señalización de la BMP. Se sabe que la Gremlina se une a las BMP para evitar la unión a sus receptores reduciendo la señal de luciferasa del gen reportero. Por lo tanto, utilizando este ensayo reportero, es posible tamizar anticuerpos anti-Gremlina y observar si hay alguno que bloquee la interacción de la Gremlina con la BMP. Se ve una restauración de la señal de la luciferasa en estas células si hay un bloqueo de esta interacción.

Método

Las células del Clon 12 se cultivaron en DMEM el cual contenía FCS al 10 %, 1x L-Glutamina y 1x NEAA. Las células también se cultivan en presencia de higromicina B

(200 µg/mL) para garantizar que las células no pierdan la expresión del gen Id1. Las células se analizaron en DMEM que contenía 0,5 % de FCS, 1x L-Glutamina y 1x NEAA. La higromicina B no es necesaria por el corto tiempo en que las células están en el ensayo.

5

Las células se lavaron en PBS, se retiraron utilizando una solución tampón de disociación celular, se centrifugaron y se contaron antes de sembrarse a 5×10^4 /pozo en 70 µl (densidad de $7,14 \times 10^5$ /mL). Las placas que se utilizaron eran estériles, de 96 pozos, recubiertas con poli-D-lisina blanca opaca. Las células se llevan a la incubadora durante aproximadamente 3 a 4 horas para asentarse. Los heterodímeros de la BMP se reconstituyeron a 200 µg/mL en 4 mM de HCl. Se diluyó la BMP a 10 µg/mL en medio de ensayo utilizando un vial de vidrio para dar un nuevo stock de trabajo.

10

15

En una placa de polipropileno, la Gremlina-1 se diluyó 1:2 para una curva de respuesta a la dosis de 8 puntos con una dosis final superior de 1 µg/mL.

Se añadió un volumen adicional de 20 µl de medio por pozo y las placas se incubaron a 37 °C durante 45 minutos.

20

Se añadió BMP preparado a 100x a todos los pozos, excepto a los que contenían únicamente células. Todos los pozos se completan hasta 60 µl con medio de ensayo y se incuban durante 45 minutos adicionales a 37 °C.

25

Después de la incubación, se transfirieron 30 µl de muestra por pozo de placa de ensayo y se incubaron durante 20 a 24 horas antes de medir la señal de luminiscencia.

30

El Cell Steady Glo se descongeló por adelantado a temperatura ambiente. Las placas de ensayo se enfriaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 a 15 minutos antes de agregar el reactivo. La señal de luciferasa se detectó mediante la adición de reactivo glo estable de células (100 µl) durante 20 minutos en un agitador a temperatura ambiente y midiendo la luminiscencia utilizando el protocolo glo de titulación celular en Synergy 2.

35

La señal máxima se generó a partir de los pozos que contenían BMP y la señal mínima se generó solo a partir de los pozos que solo contenían células.

Resultados

Las formas completas y truncadas de la Gremlina-1 se probaron en el ensayo del gen reportero Hek-Id1 para confirmar la actividad de bloqueo contra la BMP4/7.

- 5 El porcentaje de inhibición de los ensayos de respuesta a la dosis se calculó con base en las señales máximas y mínimas en el ensayo y los datos ajustados utilizando un ajuste logístico de 4 parámetros. La CI_{50} se calculó en función del punto de inflexión de la curva.
- 10 **Tabla 3:** Resultados de potencia para la Gremlina-1 de longitud completa y Gremlina-1 truncada en el ensayo del gen reportero Hek-Id1.

Ensayo del gen reportero Hek-Id1	N	Media geométrica (nM)	95 % CI (o rango donde N=<4)
Gremlina 1 de longitud completa	2	1,6	1,3-1,9
Gremlina 1 de longitud completa	2	1,7	1,1-2,5

Conclusión

20

La Gremlina 1 pudo inhibir la señalización de la BMP 4/7 en el ensayo del gen indicador Hek-Id1.

25 **Ejemplo 4 - Producción de anticuerpos anti-Gremlina-1**

Los anticuerpos anti-Gremlina-1 se derivaron por inmunización utilizando gremlina-1 purificada como se describe en el Ejemplo 1, y por selección de la biblioteca. La biblioteca se generó internamente como una biblioteca humana, sin previo tratamiento,

30 con las regiones V amplificadas a partir de donaciones de sangre.

La inmunización produjo 26 anticuerpos distintos que se unían a la Gremlina-1 de la primera ronda de inmunización. Estos anticuerpos se ampliaron y se purificaron para la prueba en ensayos de tamización.

35

Se analizaron 25 anticuerpos de reacción cruzada humanos y de ratón de la biblioteca

utilizando Gremlina humana recombinante de R&D Systems. Se seleccionaron 10 anticuerpos para escalar y purificar como scFvs para probar en los ensayos de selección.

5 **Ejemplo 5 - Matización de anticuerpos anti-Gremlina-1**

Los anticuerpos se tamizaron utilizaron el ensayo del gen reportero Hek-Id1 descrito en el Ejemplo 3 y midiendo la fosforilación de las SMAD. Las SMAD1, 5 y 8 se fosforilan tras la señalización de la BMP. Por lo tanto, los inhibidores de Gremlinla-1, aumentan la fosforilación de las SMAD.

Los ensayos de fosforilación SMAD se llevaron a cabo en células A549 o en fibroblastos de pulmón humano. Los niveles de fosforilación se determinaron utilizando la prueba MSD.

15 **Resultados**

En el ensayo del gen reportero Hek-Id1, no hubo resultados aparentes con los anticuerpos derivados de la inmunización (con un exceso 10 veces del anticuerpo probado frente a un heterodímero BMP4/7. Los resultados se muestran en la figura 1.

Por el contrario, un número de anticuerpos derivados de la biblioteca pudieron restaurar la señal en el ensayo del gen reportero Hek-Id1(50 veces de exceso de anticuerpos con una dosis de 50 % de Gremlina) (Figura 2). De estos, el Ab2416 y el Ab2417 tenían niveles altos de endotoxina. El Ab7326 mantuvo la capacidad de bloqueo con un exceso de 10 veces y una concentración de Gremlina-1 de inhibición del 80 %.

Se presentan resultados adicionales en las Figuras 3A (gremlina humana) y 3B (Gremlina de ratón). Estas figuras muestran titulaciones del Ab7326 (etiquetadas como PB376) hasta 15 nM. Se demostró que el Ab7326 restaura la señalización de la BMP cuando es bloqueado por un humano (CI₅₀ de 1,3 nM) o un ratón (CI₅₀ de Gremlina 0,2 nM). El anticuerpo funciona como IgG1 humana y de ratón.

Las secuencias la IgG1 de longitud completa humana y de ratón se presentan a continuación. Para sintetizar las proteínas IgG1 de longitud completa de ratón y humano, las regiones variables Ab7326 derivadas de la biblioteca se volvieron a clonar en vectores que comprenden los dominios constantes de anticuerpo apropiados.

Ya que el Ab7326 provino de una biblioteca humana sin previo tratamiento, donde los Abs se clonan como scFvs, para volver a clonar las regiones variables 7326 como Abs o Fabs de longitud completa, fue necesario amplificar por PCR las VH y VK utilizando grupos de cebadores/cebadores degenerados. Los productos de PCR amplificados se digirieron y se clonaron simultáneamente en vectores ratones y humanos. A medida que las VH y VK se amplificaban mediante grupos de cebadores/cebadores degenerados, se obtuvieron dos formas variantes de los productos, que diferían en un solo residuo de aminoácido derivado de cebadores sutilmente diferentes que se aparean durante el proceso de PCR.

Las dos formas variantes de la región variable de la cadena pesada diferían en un solo aminoácido en la posición 6, y las dos formas variantes de la región variable de la cadena liviana diferían en un solo aminoácido en la posición 7, como se muestra a continuación:

- La variante 1 de la región variable de cadena pesada tiene ácido glutámico (E) en la posición 6.
- La variante 2 de la región variable de cadena pesada tiene glutamina (Q) en la posición 6.
- La variante 1 de la región variable de cadena liviana tiene serina (S) en la posición 7.
- La variante 2 de la región variable de cadena liviana tiene treonina (T) en la posición 7.

Variante 1 de cadena pesada - IgG1 de longitud completa de ratón (SEQ ID NO: 14)

QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY AEKFQGRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**
RGSGSYYPNH FDYWGQGLV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG
CLVKGYFPEP VTTVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP
SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD
VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST
FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISKI KGRPKAPQVY
TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD
TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTK SLSPGK

Variante 1 de cadena liviana – IgG1 de longitud completa de ratón (SEQ ID NO: 15)

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP
KLLIYW**ASTR ESGV**PDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**
PTFGQGRLE IKRTDAAPTQ SIFPPSSEQL TSGGASVCF LNNFYPKDIN
VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QDSKSTYSM SSTLTTLTKDE YERHNSYTCE

ATHKTSTSPI VKSFNRNEC

Variante 2 de cadena pesada - IgG1 de longitud completa de ratón (SEQ ID NO: 28)

5 QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY AEKFQGRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**
RGSGSYYPNH FDYWGQGLTV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG
CLVKGYFPEP VTVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP
10 SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD
VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST
FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISKI KGRPKAPQVY
TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD
TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTK SLSHSPGK

Variante 2 de cadena liviana – igG1 de longitud completa de ratón (SEQ ID NO: 29)

20 DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP
KLLIY**WASTR** **ES**GVDPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VFYFC**QQYYDT**
PTFGQGRLE IKRTDAAPTQ SIFPPSSEQL TSGGASVCF LNNFYPKDIN
VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QDSKDYISM SSTLTITKDE YERHNSYTCE
ATHKTSTSPI VKSFNRNEC

Variante 1 de cadena pesada - IgG1 de longitud completa de humano (SEQ ID NO: 30)

30 QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY AEKFQGRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**
RGSGSYYPNH FDYWGQGLTV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
35 REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSLKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SPGK

Variante 1 de cadena liviana - IgG1 de longitud completa de humano (SEQ ID NO: 31)

40 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP
KLLIY**WASTR** **ES**GVDPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VFYFC**QQYYDT**
PTFGQGRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK
45 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYISL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNREGC

Variante 2 de cadena pesada - IgG1 de longitud completa de humano (SEQ ID NO: 16)

50 QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VDPEDGETIY AEKFQGRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**

5 **RGSGSYYPNH** **FDY**WGQGLV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
 CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
 GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPCPCAPE LLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 SPGK

10

Variante 2 de cadena liviana - IgG1 de longitud completa de humano (SEQ ID NO: 17)

15 DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCK**KSSQSVL** **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP
 KLLIY**WASTR** **ES**GVDPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**
PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

20 Se determinaron las CDR de anticuerpo utilizando el método Kabat (resaltadas en negrita en las secuencias anteriores). Los residuos de HCDR1 adicionales utilizando la definición Chothia se encuentran en cursiva. Las secuencias de región constante se encuentran subrayadas.

25 La restauración de la señalización de p-SMAD con anticuerpos anti-Gremlina-1 se muestra en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Restauración de la señalización de p-SMAD

	2417	2418	2419	2481	2482	2483	2484	7326	8427
BMP 2 50ng/mL	109,1 % +/- 2,8 %	58,2 % +/- 1,9 %	32,6 % +/- 1,4 %	40,4 % +/- 0,6 %	35,3 % +/- 0,8 %	43,1 % +/- 2,1 %	104,0 % +/- 2,7 %	107,2 % +/- 3,5 %	51,3 % +/- 1,4 %
BMP 4 25 ng/mL	109,6 % +/- 3,0 %	71,3 % +/- 3,1 %	31,7 % +/- 1,2 %	60,1 % +/- 2,2 %	54,4 % +/- 1,3 %	72,5 % +/- 2,1 %	105,2 % +/- 3,3 %	110,0 % +/- 3,8 %	78,2 % +/- 2,5 %
BMP 7 200 ng/mL	111,5 % +/- 3,8 %	99,5 % +/- 3,2 %	53,8 % +/- 3,4 %	64,4 % +/- 1,3 %	52,3 % +/- 1,1 %	66,2 % +/- 1,2 %	105,2 % +/- 4,3 %	108,0 % +/- 3,2 %	72,6 % +/- 2,5 %

BMP-2/7 50 ng/mL	119,3% +/- 2,6 %	78,6 % +/- 3,6 %	50,8 % +/- 2,7 %	53,7 % +/- 3,1 %	47,6 % +/- 1,5 %	56,1 % +/- 2,5 %	120,4 % +/- 4,4 %	128,5 % +/- 2,9 %	62,8 % +/- 2,5 %
BMP4/7 50 ng/mL	113,7 % +/- 3,1 %	78,0 % +/- 4,0 %	61,4 % +/- 4,0 %	48,3 % +/- 2,1 %	41,7 % +/- 1,7 %	50,8 % +/- 1,7 %	112,4 % +/- 2,5 %	127,0 % +/- 3,1 %	63,3 % +/- 2,1 %

Los resultados se muestran como un porcentaje de la fosforilación de las SMAD por BMP solamente (control BMP). Los experimentos se realizaron con fibroblastos de pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. La rhGremlina-1 y los anticuerpos anti-Gremlina-1 se preincubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron la rhGremlina-1 y los anticuerpos anti-Gremlina-1 con la BMP a las células durante 30 minutos.

La Tabla 5 luego muestra resultados adicionales en el ensayo de fosforilación SMAD, donde se investigó el desplazamiento de la BMP-2 o BMP4/7 de los complejos Gremlina 1-BMP por anticuerpos anti-Gremlina-1. Los experimentos se realizaron nuevamente utilizando fibroblastos de pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. La rhBMP-2 o rhBMP 4/7 se preincubaron con rhGremlina-1 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos BMP-2- o BMP4/7-Gremlina-1 se incubaron con diferentes concentraciones de los anticuerpos anti-Gremlina-1 durante la noche a 4 °C. Las concentraciones de anticuerpos representan la concentración final en la placa.

Tabla 5: Desplazamiento de BMP-2 o BMP4/7 de complejos de Gremlina 1-BMP mediante anticuerpos anti-Gremlina-1

		81,3 µg/mL	40,6 µg/mL	20,3 µg/mL	10,2 µg/mL	5,1 µg/mL	2,55 µg/mL	1,27 µg/mL	0,63 µg/mL
2484	BMP 2 50ng/mL	100,3% +/- 3,5 %	98,8 % +/- 2,7 %	97,0 % +/- 2,9 %	93,5 % +/- 2,6 %	86,4 % +/-2,0 %	79,9 % +/- 1,9 %	66,5 % +/-2,8 %	54,8 % +/-0,3 %
2484	BMP4/7 50 ng/mL	136,4 % +/- 4,2 %	133,2 % +/- 1,0 %	121,4 % +/- 1,4 %	108,1 % +/- 4,9%	86,6 % +/- 4,4 %	74,7 % +/- 2,2 %	65,8 % +/- 0,6 %	60,7 % +/- 1,5 %

7326	BMP 2 50ng/mL	103,7 % +/- 1,1 %	101,5 % +/- 2,4 %	99,4 % +/- 3,8 %	103,8 % +/- 2,4 %	100,3 % +/- 2,2 %	103,2 % +/- 4,3 %	102,8 % +/- 2,8 %	97,0 % +/- 2,9 %
7326	BMP4/7 50 ng/mL	133,7% +/- 0,8 %	132,3 % +/- 1,8 %	130,3 % +/- 4,2 %	125,6 % +/- 10,0 %	121,4 % +/- 4,2 %	120,9 % +/- 3,3 %	111,1 % +/- 2,3 %	102,0 % +/- 4,5 %

Los resultados que se muestran en la Tabla 5 demuestran que el Ab7326 puede ya desplazar la BMP-2 o BMP4/7 de los complejos Gremlina 1-BMP. El Ab7326 puede alcanzar este desplazamiento en concentraciones mucho más bajas que el anticuerpo de comparación 2484. Esto da evidencia de que el Ab7326 es un inhibidor alostérico, consistente con nuestro hallazgo, que el sitio de unión para el Ab7326 es distante de las regiones de unión de la BMP. Por lo tanto, el Ab7326 puede acceder al sitio de unión alostérico incluso cuando la BMP está acomplejada con la gremlina-1, lo que resulta en una inhibición significativamente mejorada de la actividad de la gremlina.

10

Ejemplo 6 – Obtención de la estructura cristalina de la Gremlina-1 en complejo con el 7326 Fab

La estructura cristalina de la Gremlina-1 humana en complejo con el Ab7326 Fab se resolvió en una resolución de 2,1 Å. A continuación se muestran las secuencias Fab:

15

Cadena pesada: SEQ ID NO: 18

20 QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPNHFYDWGQGLTVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

25 Cadena liviana: SEQ ID NO: 19

30 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

El software NCONT - CCP4 se utilizó posteriormente para identificar todos los contactos en 4 Å entre la Gremlina-1 y Fab. Se identificaron los siguientes residuos: Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 y Gln175 (numeración basada

35

en la secuencia UniProt de SEQ ID NO: 1 (numerada como Ile110, Lys126, Lys127, Phe128, Thr129, Thr130, Arg148, Lys153 y Gln154 en el archivo de estructura que coincide con la numeración del Gremlina-2 de ratón).

- 5 La Figura 4 muestra modelos estructurales del complejo Gremlina-Fab, con los residuos del epítipo Fab mostrados en relación con las regiones de unión a BMP.

El Ab7326 es un anticuerpo inhibidor que actúa de forma alostérica, es decir, se une lejos de las regiones de unión de la BMP.

10

Ejemplo 7 – Medidas de afinidad para la unión del anticuerpo Ab73236 anti-gremlina-1 a la Gremlina-1

Método

- 15 La afinidad de la mIgG anti-Gremlina para Gremlina 1 human se determinó mediante un análisis de interacción biomolecular utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR por sus siglas en inglés) en un sistema Biacore T200, GE Healthcare Bio-Sciences AB. La mIgG anti-Gremlina se capturó por una superficie inmovilizada de Fc anti-ratón y la Gremlina 1 se tituló sobre la mIgG capturada.

- 20 El ligando de captura (affinipure F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG, Fc fragment specific, 115-006-071, Jackson ImmunoResearch Inc.) se inmovilizó a 50 µg/ml en 10 mM de NaAc, pH de 5,0 en la celda de flujo 2 de un chip sensor CM4 mediante química de acoplamiento de amina, usando inyecciones de activación y desactivación de 600s, a un nivel de ~1600 unidades de respuesta (UR). Se utilizó una solución tampón HBS-EP+ (0,01 M HEPES, pH de 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM EDTA, tensoactivo P20 al 0,05 %) como solución de tampón de corrida con una tasa de flujo de 10 µl/min. Se preparó una superficie de referencia en la celda de flujo 1 activando y desactivando la superficie como para la celda de flujo 2 pero omitiendo el ligando de captura.

- La solución tampón de ensayo fue HBS-EP + más 150 mM de NaCl adicionales para dar una concentración final de 300 mM de NaCl más CMD40 al 1 %. Se pasó una inyección de 60 g de mIgG anti-Gremlina (a 5 µg/mL en solución tampón de corrida) sobre las celdas de flujo 1 y 2 para dar un nivel de captura de aproximadamente 100 RU en la superficie Fc de IgG anti-ratón inmovilizada. La Gremlina 1 humana recombinante se tituló en solución tampón de 5 nM (usando diluciones dobles) y se inyectó sobre las celdas de flujo 1 y 2 a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 3 minutos seguido de una fase de disociación de 5 minutos. También se incluyó un solo control de solución tampón. La superficie se regeneró a una tasa de flujo de 10 µl/min
- 30
- 35

mediante una inyección a 60s de 50 mM de HCl, una inyección a 30s de 5 mM de NaOH y una inyección a 30s de 50 mM de HCl.

Los datos cinéticos se determinaron utilizando el software de evaluación Biacore T200.

Las medidas de afinidad se realizaron a 25 °C.

5 Resultados

Se descubrió que la afinidad de unión, tomada como el valor promedio de K_D para 5 determinaciones, era inferior a 100 pM.

10 **Ejemplo 8. Inhibición de la actividad de gremlina-1 acelera la curación y la formación de puente en un modelo in vivo de reparación de fracturas óseas.**

8.1. Materiales y métodos

15 **Modelo de fractura en rata y administración del medicamento**

Los modelos de defectos segmentarios de huesos largos se han utilizado ampliamente para la investigación de curación y regeneración del hueso (Sato et al; 2014). En el presente estudio se creó un defecto femoral de 3mm en ratas macho de 10 semanas de edad y se estabilizó utilizando una placa PEEK de 8 orificios (RIS. 602.105, RISystem,

20 Suiza). La placa se fijó al hueso con unas pinzas en el medio de la diáfisis, antes de perforar el hueso y fijarlo con tornillos. Se creó una brecha de fractura de 3 mm utilizando una sierra Gigly de 0,44 mm. El tamaño, la consistencia y la fijación del defecto se controló por calidad mediante imágenes de rayos X utilizando Faxitron (MX-20-DC5, Faxitron Bioptics LLC, EE. UU.), este punto en el tiempo se definió como el Día 0.

25 La dosificación semanal se inició el día 1 durante un período de 8 semanas como se describe en la Tabla 1.

Posteriormente se obtuvieron imágenes de rayos X durante la fase de vida del estudio en los días 11, 25, 39 y 57 para evaluar la formación de callos y el progreso de la curación.

30 El análisis de imagen Definiens se utilizó para cuantificar el área del defecto que carecía de tejido óseo en las imágenes de rayos X capturadas.

Tabla 6: Grupo de tratamiento

Grupo	Número del animal	Tratamiento	Dosificación	Régimen de dosificación	Tiempo
-------	-------------------	-------------	--------------	-------------------------	--------

1	10	Vehículo	Vehículo: 1 mL, s.c.	Una vez a la semana	Total de 57 días
2	10	Anti-Gremlina-1	30 mg/kg, 1mL, s.c.	Una vez a la semana	

Análisis Micro-CT de la curación de la fractura

Los fémures (costado fracturado) se escanearon a una resolución de 17,2 μm utilizando un micro-CT (SkyScan 1076). Se adquirió una región de aproximadamente 15 mm del

5 callo con la fractura en el centro. Los escáneres se reconstruyeron utilizando el software Skyscan NRECON (1.7.10) y luego los cortes reconstruidos se segmentaron aún más para excluir los pines de fijación en una región definida de 3 mm calculada desde el punto medio del defecto de fractura femoral. El análisis histomorfométrico del callo de la

10 fractura en 3D se realizó mediante el software SkyScan (v. 1.13.1). Se determinó el punto medio dentro del defecto de fractura femoral de 3 mm y se segmentaron cortes de 1,5 mm distales y proximales al punto medio para cada extremidad medida.

Posteriormente, la binarización de los conjuntos de datos reconstruidos y la segmentación se realizaron siguiendo dos umbrales definidos, uno para delinear el callo poco mineralizado (cuantificando así el hueso recién formado) y el otro para definir el

15 hueso maduro. La segmentación adicional de estos datos se llevó a cabo en fémures de animales clasificados como de baja respuesta en función de satisfacer los criterios de formación de puente incompleto del defecto femoral o de alta respuesta que exhiben formación de puente del sitio de fractura.

20 Análisis histomorfométrico de la fractura.

Los fémures se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % durante 24 h, se deshidrataron y se incrustaron en metacrilato de metilo (MMA) a baja temperatura. Se

tiñeron secciones de 50 μm de espesor con azul de toluidina para cuantificar los

elementos óseos de la brecha del defecto en proceso de curación. Los parámetros

25 histomorfométricos se midieron en el hueso trabecular del sitio del defecto de fractura. Las mediciones se realizaron mediante análisis de imagen.

Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como valores medios $\pm$ DE. El análisis estadístico se

30 realizó utilizando una prueba bilateral U de Mann Whitney con el software GraphPad Prism a menos que se indique lo contrario.

8.2 Resultados.

El análisis de las imágenes de rayos X obtenidas durante la fase de vida del estudio indicó que el anticuerpo anti-gremlina-1 aceleró la curación de fracturas con el control y los grupos tratados divergieron significativamente después de 25 días ($P < 0,05$). Este efecto fue evidente para el resto del estudio (Figura 5).

El análisis por micro-CT de muestras terminales reveló que el tratamiento con anticuerpo anti-gremlina-1 (30 mg/kg/una vez por semana) condujo a un aumento en el hueso recién formado dentro del sitio del callo de la fractura ($P = 0,06$).

La incidencia de no unión de fractura en este modelo es aproximadamente del 60 % sin intervención (Sato et al; 2014). Para evaluar si la inhibición de la gremlina-1 redujo la incidencia del desarrollo de la no unión, los animales se clasificaron como de baja respuesta (BR) y de alta respuesta (AR). La inhibición de la Gremlina-1 resultó en un aumento significativo en el porcentaje de volumen óseo/volumen de tejido (% VO/VT) dentro del HBM (hueso bajo en minerales; hueso recién formado) ($P < 0,01$) y HAM (hueso alto de minerales; hueso maduro) ($P < 0,01$) en el grupo de respuesta baja en comparación con los controles, lo que indica una reparación progresiva de la cohorte que probablemente forme una no unión.

Además, hubo una tendencia (no significativa) hacia un aumento de HBM y HAM % BV/TV en el grupo de respuesta alta en respuesta al tratamiento anti-gremlina-1 (Figura 6A, se muestran imágenes representativas de BR y AR en la Figura 6B).

El análisis histomorfométrico bidimensional de los parámetros óseos se realizó en secciones histológicas del sitio de fractura (Figura 7). El tratamiento con anticuerpo anti-gremlina-1 aumentó significativamente el porcentaje de volumen óseo/volumen de tejido (% BV/TV) ($P < 0,05$) en comparación con el control. La anti-gremlina-1 aumentó significativamente el número trabecular (N. Tb.) ($P < 0,001$) y disminuyó significativamente la separación trabecular (Sp. Tb.) ($P < 0,01$) lo que indica un aumento del hueso trabecular debido al tratamiento con anti-gremlina-1.

Se realizaron correlaciones entre el análisis histomorfométrico bidimensional y el análisis μ CT tridimensional comparando los grupos HBM y HAM segmentados en el análisis μ Ct y el análisis histomorfometría bidimensional de secciones de fractura (Figura 8). Las comparaciones medidas mediante la correlación de Pearson revelaron una correlación positiva y significativa entre la histomorfometría y el análisis μ CT en los grupos HBM ($P < 0,0001$) y HAM ($P < 0,0001$) validando así los datos de cada conjunto de datos.

8.3. Conclusión.

La inhibición de la actividad de la gremlina-1 utilizando un anticuerpo anti-gremlina-1 neutralizador dio como resultado la reparación acelerada de la fractura, con diferencias significativas entre el control y los grupos tratados, evidente después de 25 días (3 dosis de anticuerpo). Adicionalmente, el análisis terminal del sitio de la fractura indicó la formación mejorada de tejido óseo en los animales de baja respuesta, los cuales, de otra manera, posiblemente formarían una no unión. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la gremlina-1 es una terapia prometedora para la prevención o el tratamiento de la no unión de fracturas, y puede ser de valor particular para el tratamiento de fracturas que son propensas al desarrollo de la no unión, por ejemplo, de la tibia, del radio distal, del cuello femoral y del escafoides.

LISTADO DE SECUENCIAS

15

SEQ ID NO: 1 (Gremlina-1 Humana; ID Uniprot: O60565)

MSRTAYTVGALLLLLTLLPAAEGKKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRG
QGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGGC
NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPPELQPPTKKRVTRVKQCRCISIDL
D

20

SEQ ID NO: 2 (Gremlina-1 truncada humana utilizada en cristalografía con etiqueta N-terminal)

MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEE
GCNSRTIINRFCYGGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPPELQPPTKK
KRVTRVKQCRCISIDLD

25

SEQ ID NO: 3 (Ab7326 HCDR1 combinado Kabat & Chothia)

GYTFTDYMH

30

SEQ ID NO: 4 (Ab7326 HCDR1 Kabat)

DYYMH

SEQ ID NO: 5 (Ab7326 HCDR2 Kabat)

35

LVDPEDGETIYAEKFQG

SEQ ID NO: 6 (Ab7326 HCDR3 Kabat)

DARGSGSYYPNHFDY

5 **SEQ ID NO: 7 (Ab7326 LCDR1 Kabat)**

KSSQSVLYSSNNKNYLA

SEQ ID NO: 8 (Ab7326 LCDR2 Kabat)

WASTRES

10

SEQ ID NO: 9 (Ab7326 LCDR3 Kabat)

QQYYDTPT

15 **SEQ ID NO: 10 (Variante 1 de región variable de cadena pesada de Ab7326)**

QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFQGRVTITADTSTDYMEISLRSDDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTV
SS

20 **SEQ ID NO: 11 (Variante 1 de región variable de cadena liviana de Ab7326)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLSAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIK

25 **SEQ ID NO: 12 (Variante 2 de región variable de cadena pesada de Ab7326)**

QVQLVQSGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFQGRVTITADTSTDYMEISLRSDDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTV
SS

30

SEQ ID NO: 13 (Variante 2 de región variable de cadena liviana de Ab7326)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLSAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIK

SEQ ID NO: 14 (Variante 1 de cadena pesada de IgG1 de longitud completa de ratón)

QVQLVESGAIEVKKPGATVKISKVSGYTFTDYIMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
5 EKFAQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGTLLTVV
SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS
DLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIF
PPKPKDVLITLTLPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVS
ELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSL
10 TCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCS
VLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

SEQ ID NO: 15 (Variante 1 de cadena liviana de IgG1 de longitud completa de ratón)

15 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTREIKRTDAAPTQSI
FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSST
LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

20 **SEQ ID NO: 16 (Variante 2 de cadena pesada de IgG1 de longitud completa de humano)**

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGYTFTDYIMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFAQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGTLLTVV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
25 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTA
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

SEQ ID NO: 17 (Variante 2 de cadena liviana de igG1 de longitud completa de humano)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTREIKRTVAAPSVFI

FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 18 (Variante 1 de cadena pesada de Fab)

5 QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10 **SEQ ID NO: 19 (Variante 1 de cadena liviana de Fab)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

**SEQ ID NO: 20 (Gremlina-1 truncada humana utilizada en
cristalografía sin etiqueta N-terminal)**

AMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYI
PRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKRVTRVKQCRCSIDL

20

**SEQ ID NO: 21 (Secuencia de Gremlina-1 madura de SEQ ID NO: 1
que carece del péptido señal de aminoácidos 1-21)**

KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTE
RKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKP
25 KKFTTMMVTLNCPQLPPTKKRVTRVKQCRCSIDL

SEQ ID NO: 22 (Variante 1 de cadena pesada de IgG4P humana)

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTV
30 SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF

SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 23 (Variante 1 de cadena liviana de IgG4P humana)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
5 SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 24 (variante 1 de ADN de cadena pesada de IgG1 humana)

10 caagtgcaactgggtggaatccggggccgaagtgaaaaagcccgagccactgtgaagatct
cttgcaaagtgtccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcaggcacc
tggaagggccttgagtggatgggtctgggtcgatcccgaggacggcgaaactatctacgcc
gagaagttccagggctcgcgtcaccatcaccgcccagacacttccaccgacaccgcgtacatgg
15 agctgtccagcttgaggtccgaggacacagccgtgtactactgcgccacggatgctcgggg
aagcggcagctactacccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgactgtc
tcgagcgttctacaaagggccctcgtgttcccgctcgtccatcatcgaagtctacca
gcgaggcactgcggctctcggttgccctcgtgaaggactacttcccgagccgggtgaccgt
gtcgtggaacagcggagccctgaccagcggggtgcacaccttccggccgtcttgagtc
20 agcggcctttactccctgtcatcagtgggtgactgtcccgtccagctcattgggaacccaaa
cctacatctgcaatgtgaatcacaacctagcaacaccaaggttgacaagaaagtcgagcc
caaatcgtgtgacaagactcacacttgtccgcccgtgcccggaaccgaactgctgggaggt
cccagcgtctttctgttccctccaaagccgaaagacacgctgatgatctcccgcaccccg
aggtcacttgctgtggtcgtggacgtgtcacatgaggaccagaggtgaagttcaattggta
25 cgtggatggcgtcgaagtccacaatgccaaaactaagcccagagaagaacagtacaattcg
acctaccgcgtcgtgtccgtgctcacgggtgttgcatcaggattgggtgaacgggaaggaat
acaagtgcaaagtgtccaacaaggcgtgccggcaccgatcgagaaaactatctccaaagc
gaagggacagcctagggaaacctcaagtctacacgctgccaccatcacgggatgaactgact
aagaatcaagtctcactgacttgtctgggtgaaggggtttaccctagcgacattgccgtgg
30 agtgggaatccaacggccagccagagaacaactacaagactaccctccagtgtcgcactc
ggatggatcggttcttctttactcgaagctcacggtggataagtcccgggtggcagcagga
aacgtgttctcctgctcgggtgatgcataagccctccataaccactatacccaaaagtcgc
tgtccctgtcgcgggaaag

SEQ ID NO: 25 (variante 1 de ADN de cadena liviana de IgG1 humana)

gacattgtgatgacccagtcctcccgattcgcttgcggtgtccctgggagaacgggccacca
ttaactgcaagagctcacagtcctgctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatg
5 gtatcagcagaagcctggacagcctcccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaa
tccggggtgccggatagattctccggatcgggttcgggcactgacttcactctgactatca
actcactgcaagccgaggatgtcgcggtgtacttctgtcagcagtactacgacaccccgac
ctttggacaaggcaccagactggagattaagcgctacgggtggccgctccctccgtgttcac
tccccaccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtcgtgtgcctgctgaaca
10 acttctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcgggcaa
ctcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagcacctactccctgtcctccacc
ctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgaccacc
agggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc

15 SEQ ID NO: 26 (variante 1 de ADN de cadena pesada de IgG4P humana)

caagtgcactgggtggaatccggggccgaagtgaaaaagcccgagccactgtgaagatct
cttgcaaagtgtccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcaggcacc
tggaagggccttgagtggatgggtctggctgatcccgaggacggcgaaactatctacgcc
20 gagaagttccagggtcgcgctcaccatcaccgccgacacttcaccgacaccgcgtacatgg
agctgtccagcttgaggtccgaggacacagccgtgtactactgcgccacggatgctcgggg
aagcggcagctactaccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgactgtc
tcgagcgttctacaaagggccctccgtgttcctctggtcccttgctcccggtccacct
ccgagtctaccgccgctctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgagcccgtagcagt
25 gtccctggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacaccttcctgcccgtgctgcagtcc
tccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccagcctgggcaccaaga
cctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatc
taagtacggccctccctgccccccctgccctgccctgaatttctgggcggaccttcctgtg
ttcctgttccccccaaagcccaaggacacctgatgatctcccgacccccgaagtgcct
30 gcgtgggtgggtggacgtgtcccaggaagatcccggaggtccagttcaattggtacgtggacgg
cgtggaagtgcacaatgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaactccacctaccgg
gtgggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgc
aggtgtccaacaagggcctgccctccagcatcgaagaccatctccaaggccaagggcca
gccccgcgagccccaggtgtacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccag

gtgtccctgacctgtctggtcaagggttctaccctccgacattgccgtggaatgggagt
ccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgtctggacagcgacggctc
cttcttcctgtactctcggtgacctggacaagtcccggtggcaggaaggcaacgtcttc
tcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaaagtccctgtccctga
gcctgggcaag

SEQ ID NO: 27 (variante 1 de ADN de cadena liviana de IgG4P humana)

gacattgtgatgacccagtcccccgattcgcttgcggtgtccctgggagaaacggggccacca
ttaactgcaagagctcacagtcctgctctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatg
gtatcagcagaagcctggacagcctcccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaa
tccgggggtgccggatagattctccggatcggggttcggggcactgacttcactctgactatca
actcactgcaagccgaggatgtcgcggtgtacttctgtcagcagtaactacgacaccccgac
ctttggacaaggcaccagactggagattaagcgtacggtggccgctccctccgtgttcac
tccccaccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtcggtgtgctgtgaaca
acttctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgccttgcagtccggcaa
ctcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggacagcacctactccctgtcctccacc
ctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgaccacc
agggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtg

20

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFRTDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATDARGSGSYYPNHFQYWGQGTLLTVV
SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGSLSSGVHTFPAVLQS
DLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIF
PPKPKDVLITITLTPKVTCVVDDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVS
ELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDQVSL
TCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCS
VLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

SEQ ID NO: 29 (Variante 2 de cadena liviana de IgG1 de longitud completa de ratón)

DIVMTOTPD SLAVSLGERATINCKSSOSVLYSSNNKNYLA WYOOKPGOPPKLLIYWASTRE

SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTDAAPT VSI
FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSST
LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

5 **SEQ ID NO: 30 (Variante 1 de cadena pesada de IgG1 de longitud completa de humano)**

QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
10 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

15

SEQ ID NO: 31 (Variante 1 de cadena liviana de IgG1 de longitud completa de humano)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFI
20 FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 32 (Variante 2 de cadena pesada de Fab)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
25 EKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO: 33 (Variante 2 de cadena liviana de Fab)

30 DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 34 (Variante 2 de cadena pesada de IgG4P humana)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGYTFTDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYA
EKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDYAVYYCATDARGSGSYYPNHFYWGQGTLLVTV
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
5 SGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSIVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

10

SEQ ID NO: 35 (Variante 2 de cadena liviana de IgG4P humana)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLST
15 LTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

REFERENCIAS

- 20 Bostrom, M. P. & Seigerman, D. A. (2005), HSS journal: The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery 1, 9-18. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study.
- 25 Buza, J. A., 3rd & Einhorn, T. (2016), Clinical cases in mineral and bone metabolism: The Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases 13, 101-105. Bone healing in 2016.
- Canalis, E., Parker, K. & Zanolini, S. (2012), J.Cell Physiol 227, 269-277. Gremlin1 is
30 required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis.
- Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. (2002), Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research 17, 513-520. Differential temporal expression of members of the transforming growth
35 factor beta superfamily during murine fracture healing.

- Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. (2015), *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 45-54. Fracture healing: mechanisms and interventions.
- 5 Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T. & Helms, J. A. (1999), *Mechanisms of development* 87, 57-66. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?
- Gazzerro, E. et al. (2005), *Endocrinology* 146, 655-665. Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia.
- 10 Gazzerro, E. et al. (2007), *J.Biol.Chem.* 282, 31549-31557. Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass.
- Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L. & Greenfield, M. L. (1997), *Clinical*
- 15 *Orthopaedics and Related Research*, 76-81. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment.
- Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M. & Harland, R. M. (1998), *Mol. Cell* 1, 673-683. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted
- 20 proteins that antagonize BMP activities.
- Sato, K., Watanabe, Y., Harada, N., Abe, S., Matsushita, T., Yamanaka, K., Kaneko, T., & Sakai, Y. (2014) *Tissue Eng Part C. Methods* 20, 1037-1041.
- 25 Schmid, G. J., Kobayashi, C., Sandell, L. J. & Ornitz, D. M. (2009), *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 238, 766-774. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice.
- 30 Yu, Y. Y. et al. (2010), *Bone* 46, 841-851. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair.