

ANTAGONISTA DE GREMLIN-1 PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un antagonista anti-GREM1 para uso en un método para el tratamiento del cáncer. El cáncer es típicamente un cáncer sólido que tiene un estroma, que tiene típicamente una sobreexpresión estromal de GREM1. El cáncer puede tener una sobreexpresión epitelial de GREM1. La presente invención se refiere además a una terapia de combinación con un
10 antagonista de GREM1 y un agente anticanceroso adicional (tal como un agente quimioterapéutico), y composiciones relacionadas. La presente invención también se refiere a la detección, diagnóstico y selecciones de tratamiento para el cáncer basados en sobreexpresión de estromal GREM1.

Antecedentes de la Invención

15 Gremlin-1 (también conocido como Dm y CKTSF1B1 y GREM1) es una glucoproteína de aminoácido 184 que forma parte de la familia DAN de proteínas secretadas de nódulos de cistina (junto con Cerberus y Dan, entre otros). GREM1 se une a BMP-2, 4 y 7 e inhibe su capacidad para señalizar junto con una función pro-angiogénica documentada posiblemente a través del agonismo
20 de VEGFR2. La función principal de GREM1 es durante el desarrollo, en el cual es vital durante la formación del riñón y durante la formación de la yema de las extremidades. Estas funciones vitales hacen que la inactivación homocigota de GREM1 sea letal para embriones en ratones.

 En la edad adulta, los altos niveles de GREM1 han sido asociados con
25 fibrosis pulmonar idiopática y con hipertensión arterial pulmonar en la que la señalización de BMP2, 4 y 7 es reducida con un aumento asociado en niveles de TGF β . En nefropatía tanto diabética como crónica del injerto, la expresión de GREM1 se corresponde con valores de fibrosis.

 Los niveles aumentados de GREM1 han sido también asociados *inter alia*
30 con esclerodermia, nefropatía diabética, glioma, cáncer de cabeza y de cuello, cáncer de próstata y cáncer colorrectal (Sneddon *et al*; Guan *et al*). Se ha demostrado que GREM1 activa la invasión y proliferación *in vitro* de las células cancerosas y se cree que participa en los carcinomas uterinos, de cuello uterino, de pulmón, de ovario, de riñón, de mama, de colon, pancreático y sarcoma.

35 Es necesario identificar terapias efectivas para uso en el tratamiento y

prevención del cáncer.

Sumario de la Invención

Los inventores han demostrado de manera sorprendente que los antagonistas de GREM1 son agentes terapéuticos y preventivos efectivos contra la neoplasia con sobreexpresión estromal y/o epitelial de GREM1, incluyendo
5 cáncer colorrectal y mieloma múltiple. Los inventores prevén en función de estos resultados, que los antagonistas de GREM1 serán de utilidad general en el tratamiento y prevención del cáncer, incluyendo otros tipos de cáncer que tengan sobreexpresión estromal de GREM1. Los resultados *in vitro* proporcionados en
10 la presente ilustran la prevención a largo plazo de la inducción de neoplasia en varios modelos de tumor de ratones por administración de un antagonista de GREM1, e impacto terapéutico significativo sobre tumores existentes por administración de un antagonista de GREM1. Los descubrimientos de los inventores proporcionan de este modo un nuevo enfoque acerca de la
15 prevención y tratamiento del cáncer, incluyendo tipos de cáncer resistentes a los agentes quimioterapéuticos convencionales.

De esta manera, en un primer aspecto de la presente invención se proporciona un antagonista anti-GREM1 para uso en un método para el tratamiento o prevención de un cáncer.

20 En otro aspecto de la invención, se proporciona un agente anticanceroso para uso en un método para el tratamiento de un cáncer en donde el método comprende la administración separada, secuencial o simultánea de un antagonista anti-GREM1.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para el
25 tratamiento de un cáncer que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista anti-GREM1 a un sujeto que lo necesite.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona una composición o kit que comprende un antagonista anti-GREM1 y un agente anticanceroso
30 adicional.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar cáncer en un paciente, comprendiendo el método la medición de la expresión estromal de GREM1 en el paciente, en donde la sobreexpresión estromal de GREM1 indica que el paciente posee un cáncer.

35 En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un método para

pronosticar un cáncer en un paciente, comprendiendo el método determinar si el cáncer posee sobreexpresión estromal de GREM1 o no, en donde la sobreexpresión estromal de GREM1 en el cáncer indica que el paciente tiene un pronóstico peor que en la situación de expresión estromal de GREM1 normal.

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar si un paciente que tiene o se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer es potencialmente capaz de responder a un tratamiento con un agente quimioterapéutico o no, cuyo método comprende medir la expresión estromal de GREM1 en el paciente y, de ese modo, predecir si un paciente es
10 potencialmente capaz de responder al tratamiento con el agente quimioterapéutico o no.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar si un paciente que tiene o se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer es potencialmente capaz de responder a un tratamiento con
15 un antagonista de GREM1 o no, comprendiendo el método medir la expresión estromal del GREM1 en el paciente, y de ese modo predecir si el paciente es potencialmente capaz de responder al tratamiento con el antagonista GREM1 o no.

Breve Descripción de las Figuras

20 Figura 1. Restauración porcentual de señal para anticuerpos derivados de inmunización en el ensayo del gen indicador HEK-ID1.

Figura 2. Restauración porcentual de señal para anticuerpos derivados de genoteca en el ensayo del gen indicador HEK-ID1.

Figura 3. Resultados para el ensayo del gen indicador HEK-ID1 con
25 titulaciones de Gremlin humano (Figura 3A) y Gremlin de ratón (Figura 3B) y el efecto del anticuerpo 7326 (ilustrado como anticuerpo PB376) en la señalización de restauración de BMP.

Figura 4. Un modelo estructural del complejo Gremlin-Fab, con las regiones de unión a BMP posibles y el epítipo Fab resaltado.

30 Figura 5. Cultivo de organoides de criptas intestinales de ratón en el día 0 y en el día 7 siguiendo a la diseminación. El medio contiene suplementación de proteína recombinante y/o anticuerpo anti-Grem1 de prueba. E = Factor de Crecimiento Epidérmico, G=Grem1, R=Rspo1.

Figura 6. Transferencia de Western en proteínas extraídas del epitelio de
35 ratón Vil1-Grem1. 6 semanas de administración de anticuerpos a 30 mg/kg es

capaz de restaurar la señalización epitelial de pSMAD1,5.

Figura 7. Fenotipo de animal *Vil1-Grem1* tratado con anticuerpo después de 6 semanas de tratamiento con anticuerpo anti-Grem1. El tratamiento con anticuerpo normaliza el fenotipo del intestino delgado y previene el desarrollo de poliposis profunda. El tratamiento con anticuerpo previene la formación de criptas ectópicas de vellosidad y normaliza la determinación del destino celular con restricción apropiada de Ki67, Sox9, EphB2 y tinción de lisozima a la base de la cripta intestinal, y resolución de tinción de CK20 normal en las células de diferenciación de la vellosidad del intestino delgado.

Figura 8. Diagramas de Kaplan-Meier de la supervivencia de las cepas de ratón de poliposis iniciado por Grem1 tras un tratamiento de anticuerpo anti-Grem1 a largo plazo.

Figura 9. Grem1 estromal en tumorigénesis impulsada por APC. A. Grem1 ISH en tipo silvestre y Villin-CreERT2; ratones *Apc fl/fl* que muestran regulación en alza profunda del Grem1 estromal en respuesta a la pérdida de *Apc* epitelial aguda. B. Eliminación transgénica del Grem1 estromal en ratones *ApcMin* reduce la carga tumoral de *Apc* mutante a 285 días. C. El tratamiento prolongado con anticuerpo anti-Grem1 (30 mg/kg/semana) reduce la carga tumoral de *ApcMin* y prolonga el tiempo de vida del animal.

Figura 10. La expresión de Grem1 es elevada en cultivos estromales primarios de pacientes con mieloma. Se extrajo ARN de cultivos de células estromales derivadas de trépano de médula ósea de donantes sanos emparejados por edad y género y pacientes con mielomas y la expresión en Grem1 fue analizada por PCR en tiempo real. La expresión de Grem1 fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con mielomas en comparación con donantes sanos. Los datos presentados como expresión de ARNm normalizada a ActB (promedio $\pm$ DT, ** $P < 0,001$, prueba T, Normal; $n=17$ y MM; $n=15$).

Figura 11. La expresión Grem1 fue (A) analizada en el hueso compacto de ratones sanos C57Bl6/KaLwRij.Hsd y ratones a los que se han inyectado PCs 5TGM1.Bmx1 MM con enfermedad detectable a través de BLI. (promedio $\pm$ DT, $P=0,1120$, examen T, Normal; $n=11$ y Carga tumoral; $n=9$). (B) La expresión de Grem1 en el estroma de MO aislado desde las extremidades posteriores de ratones portadores de tumores se relacionó con la carga tumoral en las respectivas extremidades, como fue detectado por BLI (Correlación de Pearson;

$p < 0,05$, $R^2 = 0,414$).

Figura 12. La expresión de Grem1 fue analizada en las líneas celulares OP9 estromales derivadas de la médula ósea, murina, tras 24, 48 y 72 h de co-cultivo con (A) células 5TGM1.Bmx1, co-cultivadas en el transwell de 3 μ m superior (B) células parentales 5TGM1., fijadas directamente sobre las células estromales adherentes. Para cultivos de contacto, las células OP9.GFP+ fueron clasificadas por FACS desde las PC MM parentales 5TGM1 para análisis de la expresión de Grem1 a través de PCR en tiempo real. Se observó un aumento significativo en la expresión de Grem1 en las células estromales OP9 tras 72 h de co-cultivo. Los datos presentados como expresión de ARNm en relación con ActB y normalizados para control medio solamente (promedio $\pm$ ETM de 3 experimentos réplica, * $P < 0,05$, prueba de t).

Figura 13. La expresión de Gremlin1 fue analizada en co-cultivos de estroma humano normal con varias líneas celulares MM humanas durante 72 h. Las células MM se lavaron del estroma antes de la recolección para análisis de la expresión de Grem1. Un incremento significativo en la expresión de Gremlin1 en condiciones de co-cultivo KMS-11 ($p = 0,0159$) y U266 ($p = 0,0343$) (ANOVA). Los datos presentados como réplicas de co-cultivo con tres donantes de estroma normales separados, normalizados para control de medio solamente.

Figura 14. La expresión de transgenes Grem1 en células OP9-estomales fue confirmada por (A) RT-PCR y (B) transferencia de Western. PC MM 5TGM1 en (D) co-cultivos de transwell de (C) contacto celular con células OP9-estromales modificadas para sobre-expresar Grem1 expuso tasas incrementadas de proliferación en comparación con co-cultivos con controles solo de vector OP9, medidos por la actividad luciferasa relativa. (promedio $\pm$ ETM de 3 experimentos réplica, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, prueba T).

Figura 15. (A) Los ratones C57Bl6/KaLwRij a los que se habían inyectado PC MM 5TGM1.Bmx1 y posteriormente tratados con un anticuerpo neutralizante de Grem1 presentaron una reducción significativa en la carga tumoral general en comparación con los ratones tratados con un control IgG después de 4 semanas como se ilustra en BLI. Promedio $\pm$ ETM, $n = 13$ ratones por grupo **** $P < 0,0001$, ANOVA unidireccional. (B) Se llevó a cabo SPEP en ratones a los que se extrajo sangre en la semana 4 posterior a la inyección de células tumorales. Se utilizó intensidad de muestras adicionales M relativas a la albúmina sérica como medida de carga de enfermedad. Los ratones tratados con el anticuerpo anti-Grem1

tienen una intensidad de muestras adicionales M significativamente menor en comparación con los ratones que reciben el tratamiento de control IgG. Promedio $\pm$ DT, $**P < 0,01$, prueba de t. (C) Imágenes escaneadas de BLI ventral representativas para ratones tratados con control IgG y anticuerpo neutralizante de Grem1.

Figura 16. Las células 5TGM1 MM fueron co-cultivadas en transwells de 3 μ m en presencia de células que sobre-expresan OP9-Grem1 o controles solo vectoriales durante 72 h. El lisado de las células 5TGM1 fue analizado por transferencia de Western para fosforilación de Smads 1/5/9. Las células 5TGM1 exponen una reducción en fosforilación de Smads 1/5/9 cuando son cultivadas en presencia de células estromales de MO con sobreexpresión de Grem1, en comparación con controles solo vectoriales. Se utilizó Hsp90 como control de carga. Imagen representativa de los dos experimentos réplica.

Figura 17. La línea celular estromal de MO, OP9 fue evaluada para expresión de Grem1 tras el tratamiento con 20 ng/ml de IL6 recombinante durante 72 h. Se observó un incremento significativo en la expresión de Grem1 en las células OP9 estimuladas con IL6. (Promedio $\pm$ ETM de 3 experimentos réplica, $** P < 0,01$).

Figura 18. (A) Los ratones C57Bl6/KaLwRij que recibieron tratamiento de anticuerpo neutralizante de Grem1 (Ab7326) antes de la inoculación con PC MM 5TGM1.Bmx1 presentaron una reducción significativa en la carga tumoral general después de 4 semanas posteriores a la inoculación celular, en comparación con los ratones tratados con ello recibieron un control IgG (Ab101.4), como se ilustra en BLI. Promedio $\pm$ ETM, $n=7-8$ ratones por grupo $****P < 0,0001$, ANOVA unidireccional. (B) Se llevó a cabo SPEP en ratones de los que se extrajo sangre en la semana 4 después de la inyección de células tumorales. Se usó la intensidad de las muestras adicionales M relativas a la albúmina sérica como medida de carga de enfermedad. Los ratones tratados con el anticuerpo anti-Grem1, tienen intensidad de muestras adicionales M significativamente menor en comparación con ratones que reciben el tratamiento de control IgG. Promedio $\pm$ DT, $**P < 0,0001$, prueba T. (C) Imágenes escaneadas de BLI ventral representativo para ratones tratados con control IgG y anticuerpo neutralizante de Grem1 4 semanas después de la inoculación de células tumorales.

Figura 19. Análisis cuantitativo RT-PCR de expresión de ARNm de

Grem1. La expresión del gen Grem1 fue analizado en (A) células de cáncer de mama humano MDA-MB-231-TXSA y (B) fibroblastos mamarios MF9 humanos después de 48 h de cultivo en condiciones normóxicas e hipóxicas (n=1). Los niveles de expresión fueron medidos por RT-PCR y normalizados a β -actina.

5 Promedio $\pm$ DT de pocillos triplicados, *p<0,05, **p<0,005, prueba de t de Student para muestras independientes.

Figura 20. Proliferación de células cancerosas mamarias humanas en respuesta a la estimulación con Grem1. Las células MDA-MB-231-TXSA fueron estimuladas con varias concentraciones de rhGrem1 y cultivadas bajo
10 condiciones normóxicas (barra del lado izquierdo de cada par) e hipóxicas (barra del lado derecho para cada par) durante (A) 24 y (B) 48 h. Los datos son representativos de los tres experimentos independientes realizados por triplicado. Promedio $\pm$ DT, *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ANOVA bidireccional con examen de comparaciones múltiples de Tukey.

15 Figura 21. Proliferación de células cancerosas mamarias murinas 4T1 en respuesta a Grem1 derivado del estroma. Las células 4T1 fueron co-cultivadas con células estromales OP9 de control vectoral o con expresión de Grem1 durante 72 h. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Promedio $\pm$ DT, ***p<0,0005, prueba de
20 t de Student para muestras independientes (de dos colas).

Figura 22. El anticuerpo anti-Grem1 nuevo (Ab7326) revierte la inhibición mediada por Grem1 de fosforilación de SMAD1/5/9 en células cancerosas mamarias murinas 4T-1. Las células cancerosas mamarias murinas 4T1 fueron estimuladas durante 2 horas con combinaciones de tratamientos según se indica
25 y sujetas a análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo reactivo a fosfo-Smad1/5/9 (panel superior). β -actina (panel inferior) actúa como control de carga.

Figura 23. El efecto de la monoterapia y terapia de combinación en ratones VG/Min.

30 Figura 24. Expresión de Grem1 en varios tumores sólidos.

Figura 25. La relación entre la expresión de Grem1 y consecuencias de supervivencia en carcinoma vesical. Línea superior – Grem1 bajo; línea inferior – Grem1 alto.

Figura 26. La relación entre la expresión de Grem1 y las consecuencias
35 de supervivencia en adenocarcinoma pancreático ductal. Línea superior –

Grem1 bajo; línea inferior – Grem1 alto.

Figura 27. La relación entre la expresión de Grem1 y las consecuencias de supervivencia en adenocarcinoma ovárico. Línea superior – Grem1 bajo; línea inferior – Grem1 alto.

5 Figura 28. La relación entre la expresión de Grem1 y las consecuencias de supervivencia en carcinoma de mama basal. Línea superior – Grem1 bajo; línea inferior – Grem1 alto.

10 Figura 29. La relación entre la expresión de Grem1 y las consecuencias de supervivencia en carcinoma pulmonar. Línea superior – Grem1 bajo; línea inferior – Grem1 alto.

Figura 30. Fenotipo de intestino *Vil1-Grem1* tratado con anticuerpo después de 6 semanas de tratamiento con el anticuerpo anti-Grem1.

15 Figura 31. Diagramas de supervivencia de Kaplan-Meier de cepas de ratón de poliposis iniciadas por Grem1 después de un tratamiento con anticuerpo anti-Grem1 a largo plazo. (A) ratones *Vil1-Grem1*. (B) ratones *Vil1-Grem1;Apc^{Min}*.

Figura 32. (A) Diagrama de Kaplan-Meier que ilustra que el tratamiento prolongado con anticuerpo anti-Grem1 (30 mg/kg/semana) reduce la carga tumoral de *Apc^{Min}* y prolonga la longevidad animal (B) Hibridación *in situ* para *Apc^{Min}* y *Grem1*.

20 Figura 33. Carga tumoral en ratones C57B16/KaLwRij es significativamente reducida en los huesos de las extremidades posteriores cuando los ratones son tratados con anticuerpo neutralizante de Grem1, Ab7326, (A) posterior a la inoculación de células tumorales y (B) anterior a la inoculación de células tumorales, comparado con el control IgG (como se ilustra por diagnóstico por imágenes de bioluminiscente (BLI)). Se observa una tendencia a la baja en la carga tumoral esplénica entre los grupos de tratamiento en las configuraciones (C) posterior o (D) anterior a la inoculación de células tumorales. Prueba de t de Student, ** p< 0,01, *** p< 0,001.

30 Figura 34. Diagramas de supervivencia de Kaplan Meier para tratamiento de poliposis establecida en (A) ratones *Vil1-Grem1* y (B) ratones *Apc^{Min}*. Mediana de supervivencia: *Apc^{Min}*: Vehículo: 192 días (n=15); *Apc^{Min} anti-Grem1*: 264,5 días (n=10); Vehículo *Vil-Grem1*: 242 días (n=13); y *Vil-Grem1 anti-Grem1*: 477 días (n=8), orden logarítmico p<0,01 en ambos casos. Las flechas indican la iniciación del tratamiento en los grupos tratados.

35 Figura 35. Gráficos que ilustran la carga de pólipos colónicos y

supervivientes en cuatro grupos de tratamiento, a saber: (i) ratones *Vil1-Grem1* no tratados (VG+sin tratamiento); (ii) ratones *Vil1-Grem1* tratados únicamente con azoximetano (VG+AOM+sin tratamiento); (iii) ratones *vil1-Grem1* tratados únicamente con anticuerpo anti-Grem1 (VG+ α -Grem1); y (iv) ratones *Vil1-Grem1* tratados tanto con azoximetano como con anticuerpo anti-Grem1 (VG+AOM+ α -Grem1). (A) Curva de Kaplan-Meier que demuestra la supervivencia de los ratones. (B) Gráfico que ilustra la carga de pólipos colónicos. (C) Gráfico que ilustra el tamaño de los pólipos colónicos.

Figura 36. Niveles de estroma de expresión de *Foxl1* en vellosidades de ratones TS, *Vil1-Grem1* no tratados y *Vil1-Grem1* tratados con anticuerpo anti-Grem1 (*: p-valor < 0,05, **: p-valor <0,01).

Figura 37. ISH fluorescente múltiple para *Foxl1* (verde) y *Wnt5a* (rojo) en el intestino delgado de ratón *Vil1-Grem1*. Las secciones fueron contrateñidas utilizando DAPI. Se observó expresión combinada de *Foxl1* y *Wnt5a* (en las áreas amarillas).

Figura 38. Expresión de tejido de ligandos Wnt y marcador de célula telocito en modelos de tratamiento, *Vil1-Grem1* y de tipo silvestre. Expresión de marcador de telocito (A) *Wnt 5A*; (B) *Wnt 2B*; (C) *Foxl1* utilizado ISH en ratones *Vil1-Grem1* y de tipo silvestre y cuantificado después del tratamiento con anticuerpo.

Figura 39. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier de modelos de ratón *Vil1-Grem1;Apc^{Min}* tratados con vehículo de control (línea D, mediana de supervivencia 45 días, n=13) y con anticuerpo anti-Grem1 a 15 mg/kg semanalmente (línea A, mediana de supervivencia 76,5 días, n=6), 30 mg/kg semanalmente (línea B, mediana de supervivencia 108 días, n=15, experimento en curso: dos ratones aún con vida) y 60 mg/kg semanalmente (línea C, mediana de supervivencia 111 días, n=7, experimento en curso: cinco ratones aún con vida).

Figura 40. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier para terapia preventiva y tratamiento de poliposis establecida. Las flechas indican el momento de inicio del tratamiento en grupos tratados.

(A) ratones *Vil1-Grem1*. Vehículo (línea sólida): mediana de supervivencia 242 días (n=13); tratamiento de etapa avanzada de terapia anti-Grem1 (línea de puntos): 519 días, n=7; tratamiento de etapa temprana anti-Grem1 (línea discontinua); 540 días, (n=11) orden logarítmico p<0,01 para ambos grupos. (B)

ratones *Apc^{Min}*. Vehículo (línea sólida); mediana de supervivencia: 192 días (n=15); tratamiento de etapa avanzada anti-Grem1 (línea de puntos): 261 días (n=11); tratamiento de etapa temprana anti-Grem1 (línea discontinua); 424,5 días (n=10), orden logarítmico $p < 0,01$ para ambos grupos.

5 Figura 41. Los ratones C57BL6 inoculados con células de cáncer de mama PyMT-B01 por inyección de CA sistémica y tratadas con anticuerpo neutralizante de Grem1 (Ab7326) tienen una carga tumoral significativamente reducida en comparación con los ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo (Ab101.4). (A) El diagnóstico por imágenes IVIS BLI de ratones al concluir el estudio (en el día 13) muestra una carga tumoral significativamente reducida en ratones tratados con Ab7326 en comparación con ratones tratados con AB101.4. Promedio $\pm$ ETM, prueba de t de Student, Ab101.4; n=12, Ab7326; n=13, * $p < 0,05$. (B) Imágenes BLI representativas en el día 13.

15 Figura 42. Los ratones C57BL6 portadores de tumores PyMT-B01 tratados con anticuerpo neutralizante de Grem1 (Ab7326) han reducido la metástasis de pulmón e hígado, en comparación con los ratones tratados con control de isotipo (Ab101.4). (A) Gráfico que ilustra los resultados del diagnóstico por imágenes de BLI ex vivo para carga tumoral en los pulmones de ratones tratados con AB7326 en comparación con ratones tratados con Ab101.4. (B) Gráficos que ilustran los resultados del diagnóstico por imágenes de BLI para carga tumoral de hígado en grupos de tratamiento Ab7326 y Ab101.4. Promedio $\pm$ ETM, prueba de t de Student, Ab101.4; n=6, Ab7326; n=7, * $p < 0,05$.

25 Figura 43. Gráficos que ilustran los resultados del diagnóstico por imágenes de IVIS BLI de ratones NSG portadores de tumor MDA-MB-231 tratados con anticuerpo de control de isotipo (AbA33) y anticuerpo neutralizante de Grem1 (UCB6114). Promedio $\pm$ ETM, prueba de t de Student, n=8, $p > 0,05$.

30 Figura 44. Imágenes de IVIS BLI representativas de ratones portadores de tumor MDA-MB-231 tratados con control de isotipo (AbA33) o anticuerpo neutralizante de Grem1 (UCB6114) el día 22 posterior a la inoculación de célula cancerosa.

35 Figura 45. Gráficos que ilustran los resultados del diagnóstico por imágenes de IVIS BLI ex vivo de los pulmones de ratones NSG portadores de tumor MDA-MB-231 tratados con anticuerpo de control de isotipo (AbA33) o anticuerpo neutralizante de Grem1 (UCB6114). Promedio $\pm$ ETM, prueba de t de Student, n=8, $p > 0,05$.

Figura 46. Gráficos que ilustran los resultados del diagnóstico por imágenes de BLI de ratones NSG inoculados con células de cáncer de próstata PC-3 por inyección sistémica CA y tratados con anticuerpo neutralizante de Grem1 (UCB6114) o anticuerpo de control de isotipo (AbA33). El diagnóstico por imágenes de BLI se llevó a cabo en (A) la totalidad del cuerpo; (B) BLI de hígado *ex vivo*; (C) extremidades inferiores *ex vivo*; y (D) pulmones *ex vivo*. Promedio $\pm$ ETM, prueba de t de Student, n=57, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Figura 47. Imágenes de BLI representativas de ratones NSG con carga tumoral PC-3 sistémica tratados con anticuerpo de control de isotipo (AbA33) o anticuerpo neutralizante de Grem1 (UCB6114) al concluir el estudio (en el día 25). El hígado, las extremidades inferiores y los pulmones fueron disecados y diagnosticados por imágenes *ex vivo* inmediatamente después del escaneo final de cuerpo completo.

Descripción Detallada de la Invención

Se entiende que las diferentes aplicaciones de los productos y métodos divulgados pueden ser adaptadas a las necesidades específicas del estado de la técnica. También se entiende que la terminología utilizada en la presente es a los fines de la descripción de formas de realización particulares de la invención únicamente, y no tiene la intención de ser limitativa.

Asimismo, como se usa en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "la/el" incluyen referencias plurales a menos que el contenido claramente estipule lo contrario. De este modo, por ejemplo, una referencia a "un inhibidor" incluye dos o más de dichos inhibidores, o referencia a "un oligonucleótido" incluye dos o más de dichos oligonucleótidos y similares.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente, ya sea con anterioridad o a continuación, quedan incorporadas a la presente por referencia en su totalidad.

Tratamiento y prevención del cáncer

La presente invención proporciona un antagonista anti-GREM1 para uso en un método para la prevención o tratamiento del cáncer. El cáncer típicamente tiene una estroma (tal como un estroma desmoplásico), que típicamente tiene una sobreexpresión estromal de GREM1. El cáncer puede adicional o alternativamente tener sobreexpresión epitelial de GREM1 o estar iniciado por GREM1.

Cáncer

El cáncer puede ser cualquier cáncer o tumor que tenga un estroma, típicamente un estroma desmoplásico. El cáncer puede ser cualquier cáncer o tumor que sea iniciado por GREM1. El cáncer puede ser cualquier cáncer en
 5 donde se observe la sobreexpresión de GREM1 estromal y/o epitelial. El cáncer o tumor puede tener sobreexpresión estromal de GREM1 y no sobreexpresión epitelial de GREM1. El cáncer o tumor puede tener sobreexpresión epitelial de GREM1 y no sobreexpresión estromal de GREM1. En formas de realización preferidas, el cáncer o tumor tiene una sobreexpresión de GREM1 en el estroma
 10 desmoplásico.

El cáncer o tumor puede ser un tumor sólido. El tumor sólido puede tener un estroma desmoplásico.

Los cánceres particularmente preferidos que pueden ser tratados incluyen cáncer colorrectal, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga,
 15 cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer estomacal, cáncer de duodeno, cáncer esofágico, cáncer prostático, cáncer de cabeza y cuello cáncer de endometrio, cáncer hepático, cáncer de bazo, cáncer de hueso, y osteosarcoma. El cáncer que puede ser tratado puede ser cáncer intestinal, cáncer de colon o cáncer rectal. El cáncer a ser tratado puede ser un cáncer diseminado, por
 20 ejemplo, un cáncer metastásico. Por cáncer diseminado se entiende uno que se ha propagado desde su sitio inicial de origen dentro del cuerpo. Por ejemplo, un cáncer diseminado puede ser uno que se originó en la médula ósea, colon, próstata o tejido mamario de un paciente pero se propagó, por ejemplo, al hígado o pulmón del paciente.

25 El antagonista de GREM1 también puede usarse para prevenir la diseminación de un cáncer.

El antagonista de GREM1 puede usarse para evitar la poliposis asociada con el cáncer.

En la biología y medicina del cáncer se usan sistemas de gradación para
 30 categorizar las células cancerosas con respecto a su falta de diferenciación celular. Esto refleja la medida en que las células cancerosas difieren en morfología de las células sanas encontradas en el tejido desde el cual se originó la célula cancerosa. El sistema de gradación puede ser usado para proporcionar una indicación de cuán rápido puede esperarse que crezca un cáncer particular.
 35 Típicamente, las gradaciones usadas de cáncer son Grados (G) X y 1 a 4. GX

indica que el grado de cáncer no puede ser evaluado. Las células cancerosas G1 (grado bajo) tienen una morfología similar a las células normales sanas (esto es, están bien diferenciadas) y puede esperarse que crezcan despacio, y son menos propensas a propagarse. Las células cancerosas G2 (grado intermedio) están moderadamente diferenciadas, esto es, se presentan de manera más anormal y puede esperarse que crezcan ligeramente más rápido que las células G1. Las células cancerosas G3 (grado alto) tienen una morfología muy diferente en comparación con las células normales (esto es, están poco diferenciadas) y puede esperarse que crezcan de manera más rápida que las células G1 y G2. Las células cancerosas G4 (grado alto) son indiferenciadas (también referidas como anaplásicas) y puede esperarse que tengan la capacidad máxima de proliferación.

La gradación del cáncer es diferente de la estadificación del cáncer, lo que da una indicación de cómo se podrá propagar el cáncer. Un sistema de estadificación de cáncer común tiene cinco etapas, a saber, Etapa 0: células cancerosas *in situ* (esto es, ubicadas en su tejido normal); Etapa I: el cáncer está ubicado en una parte del cuerpo; Etapa II: el cáncer está localmente avanzado; Etapa III: el cáncer también está localmente avanzado (la designación de un cáncer como Etapa II o Etapa III puede depender del tipo específico de cáncer); y Etapa IV: el cáncer está usualmente con metástasis o propagado a otros órganos o a través del cuerpo.

Una persona experta en la técnica conoce cómo determinar el grado y/o etapa de un cáncer. En una forma de realización, la invención se refiere al uso de un antagonista anti-GREM1 para el tratamiento y/o prevención de un cáncer establecido. En una forma de realización, el cáncer es un cáncer establecido. Un cáncer establecido puede ser un cáncer de grado alto, por ejemplo, un cáncer G3 o G4. Un cáncer establecido puede ser un cáncer que está en Etapa II o superior. Un cáncer establecido puede ser un cáncer de Etapa III o Etapa IV. En una forma de realización, el cáncer establecido es un cáncer de Etapa IV que ha hecho metástasis.

Cáncer Colorrectal

La invención se refiere en un aspecto preferido a la prevención o tratamiento del cáncer colorrectal. A modo de antecedente, la mucosa intestinal es un ecosistema complejo y el epitelio tiene una relación de interdependencia con este microambiente, especialmente el estroma subyacente. La

intercomunicación epitelial-mesénquimal está íntimamente involucrada en la regulación de la homeostasis y es dinámicamente alterada en la regeneración y cáncer intestinal. Las redes de señalización celular son los canales efectores de la intercomunicación inter-compartmental y controlan la determinación del destino de las células epiteliales, pero pueden ser absorbidas y corrompidas por el microambiente tumoral en el cáncer colorrectal.

El manejo quimioterapéutico actual del cáncer colorrectal no ha cambiado sustancialmente durante los últimos 20 años y está predominantemente basado en el uso de una combinación de agentes citotóxicos (tales como regímenes FOLFOX y FOLFIRI <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs>) contra el epitelio del tumor proliferativo, y puede aparecer resistencia a estos agentes dirigidos al epitelio. Resulta ahora más importante que nunca identificar nuevas terapias para uso en cáncer colorrectal.

Un cáncer o tumor particularmente preferido para tratamiento es por tanto el cáncer colorrectal o un tumor colorrectal. Una forma especialmente preferida de cáncer colorrectal para tratamiento es el cáncer colorrectal que se caracteriza por tener sobreexpresión de GREM1 en células estromales, esto es, sobreexpresión estromal de GREM1. Las células estromales pueden ser fibroblastos asociados al cáncer. Un cáncer colorrectal con sobreexpresión estromal de GREM1 puede no presentar ninguna sobreexpresión epitelial de GREM1. Un cáncer colorrectal con sobreexpresión estromal de GREM1 puede comprender sobreexpresión estromal de Foxl1. Una forma particularmente adecuada de cáncer colorrectal para tratamiento es el cáncer colorrectal que es un subtipo mesénquimal de cáncer colorrectal, también descrito como CMS4 (Guinney *et al*, Nat Med 2015). También pueden tratarse cualquier otro subtipo de cáncer colorrectal incluyendo cualquiera de CMS1, CMS2 y CMS3 como se describe en Guinney *et al* mencionado anteriormente. Un cáncer colorrectal como se describe en la presente puede ser un cáncer colorrectal proximal (o un tumor colorrectal proximal). El colon proximal es la región de flujo ascendente del intestino grueso del ángulo esplénico, es decir el ciego del intestino grueso, el colon ascendente y el colon transversal. Los cánceres o tumores en esta región también se denominan cánceres o tumores de lado derecho. La invención puede referirse al tratamiento del cáncer colorrectal del lado derecho o a un tumor colorrectal del lado derecho.

El cáncer colorrectal puede ser un cáncer colorrectal distal (o un tumor colorrectal distal). El colon distal es la región de flujo descendiente del intestino grueso del ángulo esplénico, es decir, el colon descendiente, el colon sigmoide y el recto. Los cánceres o tumores en esta región también se denominan
5 cánceres o tumores del lado izquierdo. La invención puede referirse al tratamiento de cáncer colorrectal del lado izquierdo o un tumor colorrectal del lado izquierdo. Un cáncer que tiene sobreexpresión estromal de GREM1 puede ser preferiblemente un cáncer esporádico. El cáncer esporádico puede estar causado por una mutación somática. El cáncer esporádico puede estar causado
10 por un agente carcinogénico. Un cáncer esporádico no se debe a una mutación genética heredada. El cáncer esporádico puede provocar la sobreexpresión estromal de GREM1. La proliferación del cáncer esporádico puede depender de la sobreexpresión estromal de GREM1 en el cáncer.

Al menos tres polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) cercanos al
15 GREM1 están independientemente asociados con el riesgo de cáncer colorrectal (CRC) en europeos blancos del norte, y probablemente en otros grupos étnicos (Tomlinson *et al*, PLoS Genet, 2011). Existe un vínculo directo con la expresión de GREM1 y es probable que los otros SNPs tengan efectos similares. Asimismo, dos SNPs comunes cerca de BMP2, dos cerca de BMP4 y uno cerca
20 de BMP7 influyen en la expresión de los ligandos BMP y afectan al riesgo de CRC. De este modo, el cáncer puede comprender uno o más de los SNPs antes mencionados.

Otro tipo de cáncer o tumor para tratamiento de acuerdo con la invención es uno que exhibe sobreexpresión de GREM1 en células epiteliales. La
25 sobreexpresión de GREM1 en células epiteliales puede provocar el cáncer. La proliferación del cáncer puede depender de la sobreexpresión epitelial de GREM1. De este modo, el cáncer puede ser de origen epitelial. El cáncer es típicamente cáncer colorrectal o cáncer de duodeno. Preferiblemente, el cáncer es cáncer colorrectal. El cáncer puede ser iniciado por GREM1. Por Iniciado por
30 GREM1 se entiende que un evento mutágeno que realce la actividad o expresión de GREM1 es la causa del cáncer. Dicho cáncer puede ser debido a una mutación genética heredada. El cáncer puede entonces ser un cáncer familiar (ver a continuación).

Un tipo preferido de cáncer colorrectal para el tratamiento puede ser
35 resistente a uno o más de los agentes anticancerosos conocidos (tales como

agentes quimioterapéuticos), según se describe a continuación.

El cáncer colorrectal puede ser un cáncer colorrectal diseminado. El cáncer colorrectal puede ser un cáncer colorrectal metastásico. El cáncer colorrectal puede ser un cáncer colorrectal metastásico del pulmón. El cáncer colorrectal puede ser un cáncer colorrectal metastásico del hígado. El cáncer colorrectal puede ser un cáncer colorrectal metastásico del hueso.

El cáncer colorrectal puede estar caracterizado por sobreexpresión estromal del *Foxl1*. El cáncer colorrectal puede estar caracterizado por sobreexpresión estromal de uno o más ligandos *Wnt*. Por ejemplo, el cáncer colorrectal puede estar caracterizado por sobreexpresión estromal de *Wnt5A* y/o *Wnt2B*. Un cáncer colorrectal puede ser particularmente apropiado para la prevención o tratamiento utilizando un antagonista de GREM1 si dicho cáncer colorrectal tiene sobreexpresión estromal de *Foxl1* y/o un ligando *Wnt*, por ejemplo, *Wnt5A* o *Wnt2B*.

15 Cáncer familiar

Los cánceres familiares incluyen cánceres que resultan de una mutación o mutaciones en el gen codificador de GREM1, o cualquier otra mutación que afecte a la expresión del gen de GREM1. La condición autosómica dominante Síndrome de Poliposis Mixta Hereditaria (HMPS) está provocada por un flujo ascendente de duplicación de 40 kb de GREM1 que resulta en un cambio de expresión de compartimento patológico desde un gradiente mesenquimal restringido a expresión de gen GREM1 ectópico a través del epitelio.

El sujeto que se va a tratar con el antagonista anti-GREM1 puede haber sido previamente determinado como en riesgo de desarrollar un cáncer familiar. Por ejemplo, el sujeto puede haber sido determinado como en riesgo en función de su historia familiar y/o porque el sujeto porta una mutación en un gen conocido por originar, o incrementar el riesgo de desarrollar, el cáncer familiar.

El cáncer familiar puede ser el síndrome de Lynch, que también se denomina cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC). El cáncer familiar puede ser una poliposis adenomatosa familiar (FAP).

Los presentes inventores han demostrado que el uso de un anticuerpo anti-GREM1 sustancialmente aumenta la supervivencia de los modelos de ratones *Apc^{Min}* (ver, por ejemplo, los Ejemplos 11, 19 y 23 que siguen). Los ratones *Apc^{Min}* son un modelo bien establecido de poliposis adenomatosa familiar (FAP). De este modo, los pacientes o sujetos que padecen FAP pueden

ser particularmente adecuados para el tratamiento con el antagonista anti-GREM1. El cáncer familiar que se va a tratar o prevenir con el antagonista anti-GREM1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-GREM1) puede ser FAP. A un sujeto que ha padecido previamente FAP puede preventivamente administrársele un antagonista anti-GREM1, por ejemplo, para prevenir la recaída. A un sujeto que no ha padecido previamente FAP pero que ha sido previamente determinado como en riesgo de desarrollar FAP, puede administrársele preventivamente un antagonista anti-GREM1. Un sujeto puede haber sido determinado en riesgo de desarrollar FAP porque se ha encontrado que el sujeto porta una mutación perjudicial en su gen *Apc*.

Mieloma Múltiple

La invención se refiere en otro aspecto preferido a un tratamiento o prevención de mieloma múltiple. Mieloma Múltiple (MM) es un tumor maligno hematológico caracterizado por la proliferación clonal de células plasmáticas (CP) dentro de la médula ósea (MO). Es bien conocido que la MO soporta el crecimiento de tumores en MM, con señalización bidireccional entre las células tumorales y la MO fundamental para el crecimiento continuo, proliferación y supervivencia de las CP MM. Los componentes celulares y no celulares de la MO ejercen diferentes efectos sobre el crecimiento y proliferación de las CP MM. Mientras que los estudios recientes han identificado componentes de la MO que participan en la progresión de la enfermedad y se han desarrollado terapias dirigidas a ellos, los tratamientos de referencia en MM aún dependen principalmente de dirigir las células tumorales ellos mismos. Mientras que dichas terapias son efectivas en la prolongación de la supervivencia del paciente, debido a la gran participación de la MO en el crecimiento, proliferación, supervivencia y resistencia a fármacos de las células MM, se necesitan terapias más efectivas que se dirijan a este aspecto importante de la enfermedad. De hecho, MM es una enfermedad en gran parte incurable, con recaídas en la enfermedad como factor clave a enfrentar en el tratamiento efectivo de esta enfermedad.

En consecuencia, la invención es también preferiblemente dirigida al tratamiento o prevención de mieloma múltiple. El mieloma múltiple típicamente comprende la presencia de más de una masa de células plasmáticas dentro de la médula ósea. El mieloma múltiple está de este modo típicamente asociado con la proliferación anómala de células plasmáticas en la médula ósea. Una forma especialmente preferida de mieloma múltiple para tratamiento está

caracterizada por tener sobreexpresión de GREM1 en la médula ósea. El mieloma múltiple puede entonces comprender sobreexpresión estromal de GREM1. La sobreexpresión estromal de GREM1 puede estar presente en el compartimento de hueso compacto del hueso. La sobreexpresión estromal de GREM1 puede reflejar una cantidad aumentada de células estromales, o un incremento en los niveles de expresión de GREM1 dentro de células estromales que expresan GREM1 existentes. La médula ósea puede comprender células madre osteocondrorreticulares (OCR). Las células estromales que sobreexpresan GREM1 pueden comprender células madre OCR. Un tipo preferido de mieloma múltiple para tratamiento puede ser resistente a uno o más de los agentes anticancerosos conocidos (tales como agentes quimioterapéuticos), según se describe a continuación.

Cáncer de Mama

La presente invención se refiere en otro aspecto preferido al tratamiento o prevención del cáncer de mama. Como se describe con más detalle en los Ejemplos, los inventores han observado que GREM1 induce la proliferación de células de cáncer de mama y además que el co-cultivo de células de cáncer de mama con células estromales que expresan Grem-1 también induce dicha proliferación. Adicionalmente, un antagonista de GREM1 es capaz de neutralizar los efectos de activación de GREM1 en células de cáncer de mama.

De conformidad, los resultados obtenidos en cáncer de mama tienen la función de apoyo para GREM1 en la proliferación de las células de cáncer de mama, incluyendo expresión de GREM1 en células estromales.

Los inventores también han demostrado la eficacia *in vivo* de un antagonista de GREM1 en la prevención y tratamiento del cáncer de mama en modelos de ratón pre-clínicos (ver Ejemplo 24 a continuación). En particular, se ha observado que los ratones portadores de tumores de cáncer de mama tratados con el antagonista de GREM1 demostraron una reducción en: carga tumoral general, carga tumoral en el pulmón y carga tumoral en el hígado.

La invención por lo tanto proporciona un tratamiento y prevención de cáncer de mama por administración de un antagonista anti-GREM1. El cáncer de mama puede comprender sobreexpresión estromal de GREM1. Las células de mama estromales que sobreexpresan GREM1 pueden comprender fibroblastos estromales, también descritos en la presente como fibroblastos asociados al cáncer. Un tipo preferido de cáncer de mama para tratamiento

puede ser resistente a uno o más de los agentes anticancerosos conocidos (tales como agentes quimioterapéuticos), según se describe a continuación. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama diseminado. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama metastásico. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama metastásico del pulmón. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama metastásico del hígado. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama metastásico del hueso.

Cáncer de Próstata

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere al tratamiento o prevención del cáncer de próstata.

Como se describe en más detalle en el Ejemplo 25, los inventores han demostrado la eficacia de un antagonista de GREM1 en la prevención y tratamiento del cáncer de próstata en un modelo de ratón pre-clínico. En particular, se ha observado que el ratón portador del tumor de cáncer de próstata tratado con el antagonista de GREM1 demostró una reducción en: carga tumoral general, carga tumoral en el hígado, carga tumoral esquelética, y carga tumoral en el pulmón.

La presente invención por lo tanto además establece el tratamiento y prevención del cáncer de próstata por administración de un antagonista anti-GREM1. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata diseminado. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata metastásico. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata metastásico del pulmón. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata metastásico del hígado. El cáncer de próstata puede ser un cáncer de próstata metastásico del hueso.

Otros tipos de cáncer

Además de las aplicaciones específicamente ejemplificadas en el tratamiento y prevención del cáncer colorrectal, mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de próstata, los inventores contemplan que la eficacia terapéutica de los antagonistas de GREM1 según se demuestra en estos tipos de cáncer también resultará aplicable al tratamiento de otros tipos de cáncer que tengan características correspondientes. En particular, se contempla que los antagonistas de GREM1 serán útiles en la prevención o tratamiento de tipos de cáncer en los que haya sobreexpresión de GREM1 estromal y/o epitelial, y esta sobreexpresión contribuye al crecimiento de células malignas. Dichos tipos de cáncer incluyen cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer pulmonar, cáncer

estomacal, cáncer de duodeno, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, glioma, cáncer de endometrio, cáncer de hígado, cáncer de bazo, cáncer de los huesos y osteosarcoma. La relación entre la expresión de Grem1 y las consecuencias de supervivencia en varios tumores sólidos según se determina
5 utilizando información disponible públicamente (del servidor R2 <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) se ilustra en las Figuras 24 a 29.

Estroma y Epitelio

Los tipos de cáncer descritos para prevención o tratamiento en la presente pueden comprender sobreexpresión de GREM1 estromal y/o epitelial.

10 Las expresiones "célula estromal" o "estroma" como se usan en la presente se refieren a porciones estructurales y/o conectivas de un tejido u órgano.

El tejido estromal está principalmente hecho de matriz extracelular que contiene células de tejido conectivo. La matriz extracelular está principalmente
15 compuesta de sustancia fundamental – un gel hidratado, poroso, hecho principalmente de agregados de proteoglucano – y fibras de tejido conectivo. Hay tres tipos de fibras comúnmente encontradas dentro del estroma: fibras de colágeno tipo I, elásticas y reticulares (colágeno tipo III). Los fibroblastos y pericitos se encuentran entre los tipos más comunes de células estromales.

20 En el contexto de un cáncer o tumor (por ejemplo, comenzando en el epitelio de un tejido u órgano), el estroma del tejido u órgano puede ayudar en el crecimiento y progresión del cáncer. El estroma asociado con el cáncer o tumor puede ser un estroma desmoplásico provocado por el crecimiento de tejido fibroso o conectivo alrededor del cáncer o tumor.

25 La sobreexpresión de GREM1 puede observarse en cualquier parte del estroma/cualquier célula estromal. Las células estromales pueden ser fibroblastos o células de apoyo similares a fibroblastos. Las células estromales pueden ser fibroblastos o células de apoyo similares a fibroblastos aisladas desde un estroma desmoplásico de cualquier cáncer o tumor descrito con
30 anterioridad, tal como desde el colon o recto en un cáncer colorrectal, o la médula ósea en mieloma múltiple. Las células estromales pueden ser fibroblastos asociados al cáncer.

El término "epitelial" como se usa en la presente se refiere a una célula derivada de un revestimiento exterior de un tejido u órgano. En relación con el
35 colon, el epitelio intestinal es la capa de células que forman la superficie luminal

o revestimiento del intestino tanto delgado como grueso del tracto gastrointestinal. Está compuesto por epitelio cilíndrico simple. La "barrera superior" es la capa simple de epitelio intestinal de células cilíndricas compuesto de cuatro tipos de células epiteliales intestinales: los enterocitos absorbentes, las

5 células calciformes, las células de Paneth y las células enteroendocrinas. Las características de la barrera superior son similares en el intestino delgado y grueso. La principal diferencia es la presencia de elevaciones y proyecciones (pliegues circulares, vellosidades y microvellosidades) en el duodeno, yeyuno e íleon que permite el incremento de la superficie de absorción. Esto no se observa

10 en el colon, que al contrario muestra una superficie plana. Entre las protuberancias de la membrana mucosa llamadas vellosidades, existen inflexiones llamadas criptas de Lieberkühn, que son invaginaciones glandulares distintas. La célula en la que se observa la sobreexpresión epitelial de GREM1 puede ser cualquier célula epitelial, tal como cualquier célula epitelial intestinal.

15 Aunque no queden obligados por esta teoría, los presentes inventores postulan que la sobreexpresión de GREM1 en el epitelio y/o estroma puede promover el fenotipo de células madre/progenitoras (incrementando la cantidad de células madre/progenitoras), promoviendo el comportamiento de las células madre epiteliales y conduciendo la progresión del cáncer y/o resistencia a los

20 agentes quimioterapéuticos. De este modo, un antagonista de GREM1 usado de conformidad con la invención puede evitar la inducción de un fenotipo de cáncer anormal de células madre/progenitoras, reducir el comportamiento de las células madre epiteliales y/o disminuir la cantidad de células madre/progenitoras, en el epitelio de un tejido u órgano de un sujeto en el que el cáncer será evitado o

25 tratado, tal como en el epitelio intestinal. La capacidad de un antagonista de GREM1 para afectar el comportamiento de células madre puede ser ensayada clínicamente por la evaluación de epitelio conocido y marcadores de células madre cancerosas.

GREM1

30 Los términos GREM1 o Gremlin-1 como se usan en la presente invención en el contexto de una proteína se refieren a una proteína que típicamente tiene la secuencia de aminoácido como se establece en el UniProt, entrada O60565 (SEQ ID NO: 1), GREM1 humano. Los términos GREM1 y Gremlin-1 también pueden referirse a un polipéptido Gremlin-1 que:

35 (a) comprende o consiste en una secuencia de aminoácido de SEQ ID

NO: 1 con o sin el péptido de señal N-terminal, esto es, puede comprender o consistir en la secuencia del péptido maduro como se ilustra en SEQ ID NO: 21; o

(b) es un derivado que tiene una o más sustituciones, modificaciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con o sin el péptido de señal N-terminal (como se ilustra en SEQ ID NO: 21), que retiene la actividad de Gremlin-1, tal como la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 20.

(c) una variante del mismo, dichas variantes típicamente retienen al menos alrededor del 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % de la identidad con SEQ ID NO: 1 (o SEQ ID NO: 20 o 21) (o incluso alrededor del 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad). En otras palabras, dichas variantes pueden retener alrededor del 60 % - alrededor del 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1, adecuadamente alrededor del 80 % - alrededor del 99 % de identidad SEQ ID NO: 1, más adecuadamente alrededor del 90 % - alrededor del 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1 y más adecuadamente alrededor del 95 % - alrededor del 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1. Se describen variantes a continuación.

Como se analiza a continuación, los números de restos se estiman típicamente basados en la secuencia SEQ ID NO: 1. Sin embargo, la numeración de restos puede fácilmente ser extrapolada por una persona versada en la materia a una secuencia variante o derivada como se ha analizado con anterioridad. Cuando se citan los números de restos, la invención también abarca estos restos en una secuencia derivada o variante.

Una secuencia de ácido nucleico de GREM1 o Gremlin-1 puede comprender o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 o una variante de la misma. Las variantes de secuencias de ácido nucleico se describen a continuación. Una secuencia nucleica de GREM1 o Gremlin-1 puede comprender o consistir en cualquier variante de transcripción de GREM1. Los ejemplos de variantes de transcripciones de GREM1 son Transcripción 1 (NCBI: NM_013372.6; ENSEMBL: ENST00000560677.5); Transcripción 2: NCBI: NM_001191323.1; ENSEMBL: ENST00000560830.1); Transcripción 3: NCBI: NM_001191322.1; ENSEMBL: ENST00000622074.1. Las secuencias disponibles en los números de acceso antes mencionados al 18 de junio de 2018 se incorporan a la presente por referencia.

Sobreexpresión

La sobreexpresión de GREM1 en el estroma y/o epitelio puede determinarse por cualquier medio. La sobreexpresión de GREM1 es típicamente determinada por comparación con el nivel del marcador en las células normales del mismo tipo de tejido, esto es nivel de expresión basal. La expresión es típicamente normalizada contra el nivel de expresión de otros genes, preferiblemente que comprenden uno o más genes constitutivos. GREM1 puede también ser clasificado como ilustración de una sobreexpresión o baja expresión en un porcentaje límite de una población de pacientes con cáncer. La sobreexpresión en cada paciente en la población puede ser más alta que 2 desde la media geométrica. Al menos 10 %, más preferiblemente al menos 15 % o más de los pacientes en la población puede exhibir tal sobreexpresión.

La sobreexpresión estromal de GREM1 se refiere a niveles de GREM1 estromal que son más altos que el de un tejido normal emparejado. Por ejemplo, los niveles de GREM1 estromal pueden ser al menos el doble que el de un tejido normal emparejado.

Cuando GREM1 está sobreexpresada, su cantidad puede estar incrementada por cualquier cantidad con relación a basal. Por ejemplo, los tipos de cáncer iniciados por GREM1, tales como HMPS pueden comprender una regulación al alza de varias miles de veces de GREM1 epitelial, mientras que no se observa expresión de GREM1 en epitelio normal. Los tipos de cáncer esporádicos que comprenden sobreexpresión de GREM estromal pueden comprender cualquier nivel de sobreexpresión estromal sobre el nivel de expresión de GREM1 fisiológico en el estroma normal del órgano. Una persona versada en la materia es capaz de evaluar la existencia de una sobreexpresión en estroma o epitelio en comparación con el nivel de GREM1 en células normales del mismo tipo.

La cantidad determinada puede ser la cantidad de ARNm. El cáncer puede entonces comprender una sobreexpresión de ARNm de GREM1. El cáncer puede comprender una cantidad incrementada de ARNm de GREM1 en comparación con las células normales del mismo tipo de tejido. El ARNm puede ser incrementado por cualquier cantidad. La cantidad de ARNm puede medirse usando una reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR), tal como qRT-PCR en tiempo real, ensayo Quantigene (Affymetrix/Thermo Fisher), por la técnica de transferencia de Northern o

utilizando micromatrices, secuenciación de ARN. La expresión de ARNm es preferiblemente determinada por comparación de la expresión génica de una muestra con la distribución de niveles de expresión del gen específico a través de una muestra de referencia compuesta por tumores que son diploides para dicho gen. Una puntuación z puede obtenerse utilizando ARNseq por algoritmo de maximización de expectativa (RSEM) (cBioportal for Cancer Genomics, www.cbioportal.org; Gao *et al*, 2013 y Serimi *et al* 2012). Una puntuación z de 2 DT más alta o más baja que el promedio de la referencia establecida es preferiblemente considerada como sobreexpresión o baja expresión, respectivamente.

La cantidad determinada puede ser la cantidad de proteína. El cáncer puede comprender una sobreexpresión de proteína GREM1, tal como comparada con las células normales del mismo tipo de tejido. La proteína puede ser incrementada por cualquier cantidad. La cantidad de proteína puede ser medida utilizando inmunohistoquímica, transferencia de Western, espectrometría de masas o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), incluyendo por uso de un anticuerpo anti-GREM1 de la invención. Los umbrales para determinar la expresión pueden variar entre las técnicas usadas, y pueden ser validadas contra resultados de inmunohistoquímica.

Los usos de los antagonistas de GREM1 para el tratamiento o prevención del cáncer en un paciente como se describe en la presente puede entonces comprender (a) medir la cantidad de GREM1 en el cáncer y (b) si el cáncer comprende una sobreexpresión de GREM1, administrar al paciente el antagonista de GREM1 y por consiguiente tratar o prevenir el cáncer. La cantidad de GREM1 puede ser la cantidad de ARNm o proteína, y la sobreexpresión cualquier sobreexpresión analizada anteriormente.

Muestra

Las mediciones antes mencionadas pueden llevarse a cabo en cualquier muestra apropiada del paciente. Las mediciones pueden llevarse a cabo en una biopsia de cáncer o tumor obtenido del paciente. El estroma y/o epitelio (células estromales y/o epiteliales) puede aislarse de la biopsia. El tejido de biopsia puede ser el tejido fresco o tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE). El tejido puede ser tejido pancreático, tejido vesical, tejido pulmonar, tejido endometrial, tejido mamario, tejido estomacal, tejido duodenal, tejido esofágico, tejido de médula ósea o colorrectal. Cualquiera de los métodos analizados con

anterioridad puede llevarse a cabo en la biopsia del cáncer. Dichos métodos pueden también ser llevados a cabo en células cancerosas que circulan en la sangre del paciente. Los métodos de ARN pueden ser llevados a cabo en exosomas urinarios o de la sangre.

5 Antagonista

Un antagonista anti-GREM1 es cualquier molécula que reduzca la función o actividad de GREM1. El antagonista anti-GREM1 puede reducir la función o actividad de GREM1 por cualquier cantidad. El antagonista anti- GREM1 puede reducir la función o actividad de GREM1 por al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %, o puede evitar cualquier función o actividad de GREM1. La medida en que el antagonista anti-GREM1 reduce la función o actividad de GREM1 puede determinarse midiendo la función o actividad de GREM1 en células en presencia y ausencia del antagonista anti-GREM1. Las células pueden ser células normales o células cancerosas. Las células pueden ser células cancerosas como se describe con anterioridad. Pueden ser células cancerosas colorrectales. Las células cancerosas colorrectales pueden estar presentes en modelos de ratón *Vill-Grem1* y/o *APC(Min)* como se describe en los Ejemplos. De este modo, puede realizarse un ensayo *in vivo* para actividad de antagonista de GREM1 en cáncer colorrectal en un modelo de ratón de cáncer iniciado por GREM1 o de un cáncer esporádico que resulta en sobreexpresión estromal de GREM1. De manera alternativa, las células cancerosas pueden ser células cancerosas de mieloma múltiple, tales como células plasmáticas aisladas desde un mieloma presente en la médula ósea. De manera más general, un antagonista de GREM1 que demuestra reducir la función o actividad de GREM1 por cualquier medio puede ensayarse después *in vitro* o *in vivo* para su capacidad para prevenir o reducir la proliferación de células cancerosas, tales como células de cáncer colorrectal o células cancerosas de mieloma múltiple o células de cáncer de mama, o para prevenir, reducir o eliminar un cáncer o tumor.

El antagonista puede disminuir la función GREM1 por cualquier medio. Puede aumentar o disminuir la actividad o cantidad de cualquier molécula que afecte a la función GREM1 directa o indirectamente. Puede disminuir la cantidad de GREM1 en el nivel de proteína o ARNm. Puede aumentar el deterioro de GREM1. Puede disminuir la función de GREM1 por modificación inhibitoria.

Puede disminuir la transcripción de una función GREM1 de estimulación de molécula. Puede alterar ADN que codifica GREM1 o una molécula que estimule la función GREM1, usando un agente tal como una nucleasa con dedos de zinc.

El antagonista puede ser un agente que interactúe con Gremlin-1. Un agente que interactúa con Gremlin-1 es típicamente un agente que se une a Gremlin-1. Los agentes que interactúan con Gremlin-1 pueden modular Gremlin-1. Un agente inhibidor de modulación puede tener un efecto en cualquiera de las funciones de Gremlin-1, pero típicamente reduce la unión de Gremlin-1 a BMP (BMP 2/4/7). El antagonista puede ser una molécula mimética de BMP-7. Gremlin-1 es un regulador negativo de BMP, por lo que la unión reducida incrementa la señalización a través de BMP. Un agente de modulación de activación puede incrementar la unión de Gremlin-1 a BMP.

La unión y señalización de BMP puede ser detectada por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los Ejemplos de la presente solicitud describen un ensayo de fosforilación de SMAD. SMAD1, 5 y 8 son fosforilados tras la señalización de BMP. Un aumento en la fosforilación de SMAD puede por consiguiente ser usado para determinar una señalización de BMP aumentada, lo que puede reflejar una reducción en la unión a Gremlin-1. Los Ejemplos también describen un ensayo de gen indicador Id1, en donde el gen Id1 es un gen diana de señalización de BMP. Un incremento en la recuperación de la señal en este ensayo puede por lo tanto ser usado para determinar si un agente inhibe la unión de Gremlin-1 a BMP.

El antagonista puede actuar uniéndose al sitio activo de GREM1 o actuar de manera alostérica uniéndose en un sitio diferente. El antagonista puede actuar uniéndose a un regulador o ligando para GREM1, para de ese modo reducir la activación de GREM1. El antagonista puede ser reversible o irreversible.

Un antagonista de GREM1 puede ser una pequeña molécula inhibidora, un péptido, una proteína, un anticuerpo, un polinucleótido, un oligonucleótido, un ARN antisentido, ARN interferente pequeño (ARNip) o ARN horquillado corto (ARNhc).

Un antagonista de GREM1 puede ser un oligonucleótido que hibrida específicamente a un ARNm que codifica GREM1 o un ARNm que codifica una molécula que mejora la actividad GREM1. Un antagonista de GREM1 puede ser un polinucleótido que codifica cualquier molécula que disminuya la función

GREM1. Por ejemplo, el antagonista de GREM1 puede ser un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-GREM1 que se describe en la presente.

Un antagonista de GREM1 puede ser un anticuerpo que se une específicamente a cualquier molécula diana (típicamente una proteína) para disminuir la función GREM1 directa o indirectamente. El antagonista puede ser un anticuerpo que se une específicamente a GREM1. En este sentido, el anticuerpo puede disminuir la función GREM1 por inactivación alostérica o bloqueando la interacción entre su diana y un ligando requerido para la actividad.

La interacción de un agente antagonista con restos de proteína puede ser determinada por cualquier método apropiado conocido en la técnica, tal como distancias entre el resto y el agente según se determina por cristalografía de rayos x (típicamente menos de 6 Å o menos de 4 Å). Como se analiza en los Ejemplos que siguen, la región de Gremlin-1 que puede ser atacada por un producto terapéutico puede incluir aminoácidos Asp92-Leu99, Arg116-His130, Ser137-Ser142, Cys176-Cys178. Estos se encuentran dentro de 6 Å de aquellos mutados en la superficie de Gremlin-1.

Antagonistas anticuerpos

El término "anticuerpo", como se hace referencia en el presente documento, incluye la totalidad de los anticuerpos y cualquier fragmento de unión de antígenos (esto es, "porción de unión de antígeno") o cadenas simples de los mismos. Un anticuerpo se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión de antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está formada por una región variable de cadena pesada (en la presente abreviada como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está formada por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones V_H y V_L pueden además ser subdivididas en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco conservadas (FR).

Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos hospedadores o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq)

del sistema de complemento clásico.

Un anticuerpo usado de conformidad con la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, y será típicamente un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo usado de conformidad con la invención
 5 puede ser un anticuerpo híbrido, un anticuerpo con injerto de CDR, un nanocuerpo, un anticuerpo humano o humanizado o una porción de unión a antígeno de cualquiera de los mismos. Para la producción de ambos anticuerpos monoclonales y policlonales, el animal experimental es típicamente un mamífero no humano tal como una cabra, un conejo, una rata o un ratón pero el anticuerpo
 10 puede también inducirse en otras especies.

Los anticuerpos policlonales pueden producirse por métodos de rutina tales como inmunización de un animal apropiado, con el antígeno de interés. Posteriormente puede extraerse sangre del animal y purificarse la fracción de IgG.

15 Los anticuerpos contra Gremlin-1 pueden obtenerse, cuando la inmunización de un animal es necesaria, administrando los polipéptidos a un animal, por ejemplo, a un animal no humano, usando protocolos de rutina conocidos, ver por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra 1986). Pueden
 20 inmunizarse varios animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas son por lo general más apropiados.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados por cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica del hibridoma (Kohler &
 25 Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, págs. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos usados de conformidad con la presente invención pueden
 30 también ser generados usando los métodos de anticuerpos de linfocitos simples clonando y expresando ADNc de región variable de inmunoglobulina generados desde los linfocitos simples seleccionados de la producción de anticuerpos específicos por, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7843-7848; documentos WO92/02551;
 35 WO2004/051268 y WO2004/106377.

Los anticuerpos también pueden generarse usando varios métodos de expresión en fago conocidos en la técnica e incluyen aquellos divulgados por Brinkman *et al.* (en J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames *et al.* (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) y documentos 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; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los cuales las regiones variables y las regiones constantes (si las hubiere) de cadenas tanto pesadas como ligeras son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, pero no necesariamente desde el mismo anticuerpo. Ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, por los métodos de expresión en fago descritos con anterioridad y anticuerpos producidos por ratones en los que la variable de inmunoglobulina murina y opcionalmente los genes de región constante han sido reemplazados por sus homólogos humanos, por ejemplo, como se describe en términos generales en los documentos EP 0546073, U5.545.806, 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.

De manera alternativa, un anticuerpo utilizado de conformidad con la invención puede producirse por un método que comprende la inmunización de un mamífero no humano con un inmunógeno Gremlin-1; obteniendo una preparación de anticuerpo de dicho mamífero; derivando de ahí anticuerpos monoclonales que reconocen Gremlin-1.

Las moléculas de anticuerpo utilizadas de conformidad con la presente invención pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tenga cadenas pesadas y cadenas ligeras completas o un fragmento o porción de unión a antígeno de las mismas. El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse selectivamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo a través de fragmentos de un anticuerpo de extensión completa. Los anticuerpos y fragmentos y porciones de unión a antígeno de los mismos pueden ser, pero no

se limitan a Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetra valentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (ver, por ejemplo, Holliger y Hudson, 5 2005, *Nature Biotech.* 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para uso en la presente invención incluyen los 10 fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacionales WO 2005/003169, WO 2005/003170 y WO 2005/003171 y fragmentos Fab-dAb descritos en la solicitud de patente internacional WO 2009/040562. Los anticuerpos multi-valentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (ver, por ejemplo, documentos WO 92/22853 y WO 15 05/113605). Estos fragmentos de anticuerpos pueden ser obtenidos utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los fragmentos pueden ser examinados para utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los dominios de regiones constantes de la molécula de anticuerpo, si es 20 que hay, pueden ser seleccionados teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que pudieran ser necesarias. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios humanos IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En particular, los dominios de región constante humanos IgG pueden usarse, especialmente para los isotipos IgG1 e 25 IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpo. De manera alternativa, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden usarse cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos.

Un anticuerpo utilizado de conformidad con la invención puede ser 30 preparado, expresado, creado o aislado por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina de interés o un hibridoma preparado del mismo, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo de interés, por ejemplo, de una 35 transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpo

combinatoria recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que incluya el proceso de corte y empalme de secuencias del gen de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El anticuerpo utilizado de conformidad con la invención puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, está destinado a incluir anticuerpos que tienen regiones variables en los que las regiones tanto de marco conservado como CDR se obtienen de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Asimismo, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se obtiene de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos descritos en la presente pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente, no está destinado a incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies mamíferas, tales como un ratón, han sido injertadas en secuencias de marco conservado humanas.

Dicho anticuerpo humano puede ser un anticuerpo humano monoclonal. Dicho anticuerpo humano monoclonal puede ser producido por un hibridoma que incluye una célula B que se obtiene 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 ligera fusionado con una célula inmortalizada.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguido por transformación de los linfocitos con un virus Epstein-Barr.

La expresión "derivados de anticuerpo humano" se refiere a cualquier forma modificada de anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humanizado" está destinada a referirse a moléculas de anticuerpo injertadas con CDR en las que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies mamíferas, tales como un ratón, han sido injertadas en secuencias de marco conservado humano. Se han

realizado modificaciones de región de estructura adicionales dentro de las secuencias de estructura humana.

Como se usa en la presente, la expresión "molécula de anticuerpo injertado con CDR" se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera 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 conservado de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para consulta, ver Vaughan *et al*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una forma de realización, en vez de que se transfiera la CDR entera, solo uno o más de los restos determinantes de especificidad de cualquiera de las CDR descritas en la presente son transferidos al marco conservado de anticuerpo humano (ver, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). En una forma de realización solo los restos determinantes de especificidad desde una o más de las CDR descritas en la presente anteriormente son transferidos al marco conservado de anticuerpo humano. En otra forma de realización, solo los restos determinantes de especificidad desde cada una de las CDR descritas en la presente son transferidos al marco conservado de anticuerpo humano.

Cuando las CDR o restos determinantes de especificidad son injertados, cualquier secuencia de marco conservado de región variable aceptora apropiada puede usarse teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donante del cual derivan las CDR, incluyendo regiones de marco conservado de ratón, primates y seres humanos. Convenientemente, el anticuerpo injertado con CDR de conformidad con la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones marco conservado de aceptor humano así como una o más de las CDR o restos determinantes de especificidad descritos con anterioridad. Por consiguiente, en una forma de realización se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante en donde el dominio variable comprende regiones de marco conservado de aceptor humano y CDR de donantes no humanos.

Son ejemplos de marcos conservados humanos que puedan ser usados en la presente invención KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, mencionado anteriormente). Por ejemplo, KOL y NEWM pueden usarse para la cadena pesada, REI puede usarse para la cadena ligera y EU, LAY y POM pueden usarse tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera.

De manera alternativa, pueden usarse secuencias de línea germinal humanas; estas se encuentran disponibles, por ejemplo, en: <http://www.vbase2.org/> (ver Retter *et al*, Nucl. Acids Res. (2005) 33 (suplemento 1), D671-D674).

En un anticuerpo injertado con CDR descrito en la presente, las cadenas
5 pesadas y ligeras de aceptores no necesitan forzosamente ser derivadas del mismo anticuerpo y pueden, si se desea, comprender cadenas compuestas que tengan regiones de marco conservado derivadas de diferentes cadenas.

Asimismo, en un anticuerpo injertado con CDR descrito en la presente, las regiones de marco conservado no necesitan tener exactamente la misma
10 secuencia que aquellas del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los restos inusuales pueden cambiarse a restos que ocurran con mayor frecuencia para dicha clase o tipo de cadena aceptora. De manera alternativa, los restos seleccionados en las regiones de marco conservado de aceptor pueden cambiarse de manera de que correspondan al resto encontrado en la misma posición en el anticuerpo
15 donante (ver Reichmann *et al.*, 1998, Nature, 332, 323-324). Dichos cambios deben mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Un protocolo para seleccionar restos en las regiones de marco conservado de aceptor que puede ser necesario cambiar se establece en el documento WO 91/09967.

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

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

Las moléculas biológicas, tal como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales básicos y/o ácidos, dando a la molécula de este modo una
35 carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga general "observada"

dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, el entorno local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al cual una molécula particular o superficie no lleva carga eléctrica neta. En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento de conformidad con la presente divulgación tiene un punto isoeléctrico (pI) de al menos 7. En una forma de 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 forma de realización el pI del anticuerpo es 8. Pueden usarse 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.

Con la finalidad de caracterizar epítomos Gremlin-1 preferidos, los inventores tienen Gremlin-1 humano cristalizado solo, y en conjunto con un anticuerpo llamado Ab 7326 (fragmentos Fab). La cristalización de Gremlin-1 ha permitido la determinación de presuntos residuos en el sitio de unión BMP. Asimismo la cristalización con Ab 7326, que es un anticuerpo inhibidor alostérico, ha permitido la determinación de residuos en el epítomo de anticuerpo. Los anticuerpos que unen este epítomo tienen un potencial particular como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades asociadas con Gremlin-1.

El anticuerpo Ab 7326 preferido descrito en la presente ha sido identificado para unir los siguientes restos de Gremlin-1: Ile110 (131), Lys126 (147), Lys127 (148), Phe128 (149), Thr129 (150), Thr130 (151), Arg148 (169), Lys153 (174) y Gln154 (175), en donde Lys126 (147), Lys127 (148), Phe128 (149), Thr129 (150), Thr130 (151), Arg148 (169), Lys153 (174) y Gln154 (175) están presentes en un monómero Gremlin-1 e Ile110 (131) está presente en el segundo monómero Gremlin-1. La numeración que no se encuentra entre paréntesis se basa en el archivo estructural y (que coincide con la numeración de Gremlin-2 de ratón basado en alineación estructural). Los números entre paréntesis representan los restos basados en la entrada UniProt O60565 de SEQ ID NO: 1. Como se analiza en la sección Ejemplos, estos restos de epítomos fueron identificados usando análisis NCOT a 4 Å desde el complejo Gremlin-1Ab 7326 Fab.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden entonces unirse a un epítomo que comprende al menos un resto seleccionado de Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 y Gln175 (con numeración de

restos basada en SEQ ID NO: 1). Los anticuerpos descritos en la presente pueden unirse a un epítopo que comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o los 9 de estos restos (preferiblemente al menos 5 restos).

5 Los anticuerpos descritos en la presente pueden también reconocer un epítopo en donde Ile131 se encuentra presente en un monómero Gremlin-1 diferente a los otros restos.

10 Aunque estos restos se proporcionan para una secuencia particular de Gremlin-1 humano, la persona experta puede fácilmente extrapolar las posiciones de estos restos a otras secuencias Gremlin correspondientes (por ejemplo, ratón) utilizando técnicas de rutina. Los anticuerpos que se unen epítopos que comprenden los restos correspondientes dentro de estas otras secuencias Gremlin están por lo tanto proporcionados por la invención.

15 Para investigar para anticuerpos que se unan a un epítopo particular, puede llevarse a cabo un ensayo de rutina de bloqueo cruzado tal como se describe en Antibodies, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb, NY). Otros métodos incluyen mutantes de exploración de alanina, transferencia de péptidos (Reineke (2004) Methods Mol Biol 248: 443-63), o análisis de escisión de péptidos. Además pueden utilizarse métodos tales como extirpación de epítopos, extracción de epítopos y modificación química de antígenos (Tomer
20 (2000) Protein Science 9: 487-496). Dichos métodos son bien conocidos en la técnica.

25 Los epítopos de anticuerpos pueden también estar determinados por análisis de cristalografía de rayos x. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden entonces ser evaluados a través de análisis de cristalografía de rayos x del anticuerpo que se une al Gremlin-1. Los epítopos pueden, en particular, ser identificados de esta forma determinando restos en Gremlin-1 a una distancia de 4 Å de un resto parátopo de anticuerpo.

30 Un anticuerpo, como se describe en la presente, puede de este modo unirse a un epítopo en Gremlin-1 que comprende al menos un resto seleccionado de Trp93, Phe117, Tyr119, Phe125, Tyr126 y Phe138, en donde la numeración de restos es conforme a SEQ ID NO: 1. También se describe en la presente un anticuerpo que se une a un epítopo que comprende todos los Trp93, Phe117, Tyr119, Phe125, Tyr126 and Phe138. Adicionalmente, se describe un anticuerpo que se une a un epítopo que comprende los siguientes restos: Ile131, Lys147,
35 Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 y Gln175. Preferiblemente,

Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 y Gln175 se ubican en un monómero de Gremlin-1 e Ile131 está ubicado en el otro monómero de Gremlin-1 (los dímeros Gremlin-1 se unen a dímeros BMP).

5 Un anticuerpo puede unirse a un resto Gremlin-1 anterior si el parátipo de anticuerpo se encuentra a una distancia de 4 Å del resto Gremlin-1 como se determina por cristalografía de rayos x.

Los anticuerpos que unen a un epítipo divulgado en la presente pueden comprender al menos una, al menos dos o las tres secuencias CDR de cadena pesadas de SEQ ID NO: 4 a 6 (HCDR1/HCDR2/HCDR3 respectivamente). Estas son las secuencias HCDR1/HCDR2/HCDR3 del anticuerpo Ab 7236 de los Ejemplos según se determina usando metodología Kabat.

Los métodos Kabat y Chothia para determinar las secuencias CDR son bien conocidos en la técnica (así como otras técnicas). Las secuencias CDR pueden ser determinadas usando cualquier método apropiado y en la presente invención, mientras que típicamente se utiliza Kabat, pueden también usarse otras técnicas. En la presente instancia, SEQ ID NO: 3 presenta la secuencia Ab 7326 HCDR1 como se determina usando una definición combinada Chothia y Kabat.

Los anticuerpos usados de conformidad con la invención pueden comprender al menos una, al menos dos o las tres secuencias CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 a 9 (LCDR1/LCDR2/LCDR3 respectivamente). Estas son las secuencias LCDR1/LCDR2/LCDR3 de Ab 7326 usando metodología Kabat.

El anticuerpo preferiblemente comprende al menos una secuencia HCDR3 de SEQ ID NO: 6.

25 Típicamente, el anticuerpo comprende al menos una secuencia CDR de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 4 a 6 y al menos una secuencia CDR de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO 7 a 9. El anticuerpo puede comprender al menos dos secuencias CDR de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 4 a 6 y al menos dos secuencias CDR de cadena ligera seleccionadas de SEQ ID NO: 7 a 9. El anticuerpo típicamente comprende las tres secuencias CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 4 a 6 (HCDR1/HCDR2/HCDR3 respectivamente) y las tres secuencias CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 7 A 9 (LCDR1/LCDR2/LCDR3 respectivamente). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos híbridos, humanos o humanizados.

35 El anticuerpo puede comprender una secuencia de región variable de

cadena pesada (HCVR) de SEQ ID NO: 10 o 12 (la HCVR de Ab 7326 variantes 1 y 2). El anticuerpo puede comprender una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) de SEQ ID NO: 11 o 13 (la LCVR de Ab 7326 variantes 1 y 2). El anticuerpo preferiblemente comprende la secuencia de región variable de

5 de cadena pesada de SEQ ID NO: 10 o 12 y la secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 11 o 13 (especialmente pares HCVR/LVCR de SEQ ID NO: 10/11 o 12/13).

El anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena pesada (cadena-H) de:

- 10 SEQ ID NO: 14 cadena pesada IgG1 de extensión completa de ratón variante 1, o
 SEQ ID NO: 28 cadena pesada IgG1 de extensión completa de ratón variante 2, o
 SEQ ID NO: 30 cadena pesada IgG1 de extensión completa humana variante 1,
 15 o
 SEQ ID NO: 16 cadena pesada IgG1 de extensión completa humana variante 2, o
 SEQ ID NO: 22 cadena pesada IgG4P de extensión completa humana variante 1, o
 20 SEQ ID NO: 34 cadena pesada IgG4P de extensión completa humana variante 2, o
 SEQ ID NO: 18 cadena pesada Fab variante 1, o
 SEQ ID NO: 32 cadena pesada Fab variante 2.

- El anticuerpo puede comprender una secuencia de cadena ligera (cadena-L) de
- 25 SEQ ID NO: 15 cadena ligera IgG1 de extensión completa de ratón variante 1, o
 SEQ ID NO: 29 cadena ligera IgG1 de extensión completa de ratón variante 2, o
 SEQ ID NO: 31 cadena ligera IgG1 de extensión completa humana variante 1, o
 SEQ ID NO: 17 cadena ligera IgG1 de extensión completa humana variante 2, o
 30 SEQ ID NO: 23 cadena ligera IgG4P de extensión completa humana variante 1, o
 SEQ ID NO: 35 cadena ligera IgG4P de extensión completa humana variante 2, o
 SEQ ID NO: 19 cadena ligera Fab variante 1, o
 35 SEQ ID NO: 33 cadena ligera Fab variante 2.

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

SEQ ID NO: 14/15 IgG1 de extensión completa de ratón variante 1, o

SEQ ID NO: 28/29 IgG1 de extensión completa de ratón variante 2, o

5 SEQ ID NO: 30/31 IgG1 de extensión completa humana variante 1, o

SEQ ID NO: 16/17 IgG1 de extensión completa humana variante 2, o

SEQ ID NO: 22/23 IgG4P de extensión completa humana variante 1, o

SEQ ID NO: 34/35 IgG4P de extensión completa humana variante 2, o

SEQ ID NO: 18/19 cadena ligera Fab variante 1, o

10 SEQ ID NO: 32/33 cadena ligera Fab variante 2.

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

SEQ ID NO: 14/29 IgG1 de extensión completa de ratón cadena pesada variante

15 1/cadena ligera variante 2, o

SEQ ID NO: 28/15 IgG1 de extensión completa de ratón cadena pesada variante 2/cadena ligera variante 1, o

SEQ ID NO: 30/17 IgG1 de extensión completa humana cadena pesada variante 1/cadena ligera variante 2, o

20 SEQ ID NO: 16/31 IgG1 de extensión completa humana cadena pesada variante 2/cadena ligera variante 1, o

SEQ ID NO: 22/35 IgG4P de extensión completa humana cadena pesada variante 1/cadena ligera variante 2, o

25 SEQ ID NO: 34/23 IgG4P de extensión completa humana cadena pesada variante 2/cadena ligera variante 1, o

SEQ ID NO: 18/33 Fab cadena pesada variante 1/cadena ligera variante 2, o

SEQ ID NO: 32/19 Fab cadena pesada variante 2/cadena ligera variante 1.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos híbridos, humanos o humanizados.

30 El anticuerpo puede alternativamente ser o comprender una variante de una de las secuencias específicas mencionadas con anterioridad. La siguiente descripción de variantes de anticuerpos es también aplicable a la selección de variantes de polipéptido GREM1 como se describió con anterioridad.

35 Por ejemplo, una variante puede ser una variante de sustitución, eliminación o agregado de cualquiera de las secuencias de aminoácidos

anteriores.

- Una variante de anticuerpo puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20 o más (típicamente hasta un máximo de 50) sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos de las secuencias específicas analizadas con anterioridad. Las variantes de "eliminación" pueden comprender la eliminación de aminoácidos individuales, eliminación de pequeños grupos de aminoácidos tales como 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o la eliminación de regiones de aminoácidos más grandes, tales como la eliminación de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Las variantes de "sustitución" típicamente incluyen el reemplazo de uno o más aminoácidos con la misma cantidad de aminoácidos y hacer sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, un aminoácido puede ser sustituido con un aminoácido alternativo que tenga propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que pueden usarse para seleccionar sustituyentes apropiados son los siguientes:

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilo, neutro
Asp	polar, hidrófilo, cargado (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilo, cargado (-)	Gln	polar, hidrófilo, neutro
Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilo, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilo, neutro
His	aromático, polar, hidrófilo, cargado (+)	Thr	polar, hidrófilo, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilo, cargado(+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

- Los "derivados" o "variantes" generalmente incluyen aquellos en los que en vez de los aminoácidos que ocurren de manera natural el aminoácido que aparece en la secuencia es un análogo estructural del mismo. Los aminoácidos

usados en las secuencias pueden también ser derivatizados o modificados, por ejemplo, marcados, siempre que la función del anticuerpo no sea significativamente afectada de manera adversa.

Los derivados y variantes como se describen con anterioridad pueden ser
5 preparados durante la síntesis del anticuerpo o por modificaciones posteriores a la producción, o cuando el anticuerpo se encuentra en forma recombinante utilizando técnicas conocidas de mutagénesis dirigida, mutagénesis aleatoria, o escisión enzimática y/o ligación de ácidos nucleicos.

Las variantes de anticuerpos pueden tener una secuencia de aminoácidos
10 que tiene más de aproximadamente 60 % o más de aproximadamente 70 %, por ejemplo, 75 u 80 %, típicamente más de aproximadamente 85 %, por ejemplo, más de aproximadamente 90 o 95 % de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos divulgadas en la presente (en particular las secuencias HCVR/LCVR y las secuencias de cadenas H y L). Asimismo, el
15 anticuerpo puede ser una variante que tiene más de aproximadamente 60 % o más de aproximadamente 70 % u 80 %, típicamente más de aproximadamente 85 %, por ejemplo, más de aproximadamente 90 o 95 % de identidad de aminoácido con las secuencias HCVR/LCVR y las secuencias de cadenas H y L divulgadas en la presente, mientras que conservan las CDR exactas divulgadas
20 para estas secuencias. Las variantes pueden conservar al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las secuencias HCVR/LCVR y con las secuencias de cadenas H y L divulgadas en la presente (en algunas circunstancias mientras conservan las CDR exactas).

Las variantes típicamente conservan aproximadamente 60 % -
25 aproximadamente 99 % de identidad, aproximadamente 80 % -
aproximadamente 99 % de identidad, aproximadamente 90 % -
aproximadamente 99 % de identidad o aproximadamente 95 % -
aproximadamente 99 % de identidad. Este nivel de identidad de aminoácido
30 puede verse a lo largo de la extensión completa de la secuencia SED ID NO pertinente o sobre parte de la secuencia, tal como a lo largo de aproximadamente 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 o más aminoácidos, dependiendo del tamaño del polipéptido de extensión completa.

En relación con las secuencias de aminoácidos, la "identidad de
35 secuencia" se refiere a secuencias que tienen un valor nominal cuando es

evaluado utilizando ClustalW (Thompson *et al.*, 1994, mencionado anteriormente) con los siguientes parámetros:

Parámetros de alineación en pares – Método: exacto, Matriz: PAM, Penalización de apertura de hueco: 10,00, Penalización de extensión de hueco: 0,10;

Parámetros de alineación múltiple – Matriz: PAM, Penalización de apertura de hueco: 10,00, % de identidad por demora: 30, Penalización de huecos terminales: activada, Distancia de separación de hueco: 0, Matriz negativa: no, Penalización de extensión de hueco; 0,20, Penalizaciones de huecos de restos específicos: activadas, Penalizaciones de hueco hidrófilo: activadas, Restos hidrófilos: GPSNDQEKR. La identidad de secuencia en un resto particular está dirigida a incluir restos idénticos que han sido simplemente derivatizados.

Los anticuerpos que tienen secuencias y variantes específicas que mantienen la función o actividad de estas cadenas están por lo tanto proporcionados.

Los anticuerpos pueden competir para unirse a Gremlin-1 con, o unirse al mismo epítipo que, aquellos definidos con anterioridad en términos de cadena-H/cadena-L, HCVR/LCVR o secuencias CDR. En particular, un anticuerpo puede competir para unirse a Gremlin-1 con, o unirse al mismo epítipo que, un anticuerpo que comprende una combinación de secuencia HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de SEQ ID NO: 4/5/6/7/8/9. Un anticuerpo puede competir para unirse a Gremlin-1 con, o unirse al mismo epítipo que, un anticuerpo que comprende un par de secuencia HCVR y LCVR de SEQ ID NO: 10/11 o 12/13 o cadenas de extensión completa de SEQ ID NO: 14/15 o 16/17.

El término "epítipo" es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Los epítipos pueden ser definidos como estructurales o funcionales. Los epítipos funcionales son generalmente un subtipo de los epítipos estructurales y tienen aquellos residuos que contribuyen de manera directa a la afinidad de la interacción. Los epítipos también pueden ser conformacionales, esto es, compuestos de aminoácidos no lineales. En ciertas formas de realización, los epítipos pueden incluir determinantes que son grupos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y, en ciertas

formas de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas.

Uno puede fácilmente determinar si un anticuerpo se une al mismo epítipo que, o compite para unirse con, un anticuerpo de referencia utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia de la invención, el anticuerpo de referencia tiene permitido unirse a una proteína o péptido bajo condiciones de saturación. Luego, la capacidad de un anticuerpo de prueba de unirse a la proteína o péptido es evaluada. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a la proteína o péptido después de la unión por saturación con el anticuerpo de referencia, puede concluirse que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo diferente que el anticuerpo de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la proteína o péptido después de la unión por saturación con el anticuerpo de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo que epítipo con el que se une el anticuerpo de referencia de la invención.

Para determinar si un anticuerpo compite para unión con un anticuerpo de referencia, la metodología de unión antes descrita se lleva a cabo en dos orientaciones. En una primera orientación, el anticuerpo de referencia tiene permitido unirse a una proteína/péptido bajo condiciones de saturación seguido de evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula de proteína/péptido. En una segunda orientación, el anticuerpo de prueba tiene permitido unirse a la proteína/péptido bajo condiciones de saturación seguido por la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la proteína/péptido. Si, en ambas orientaciones, 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 para unirse a la proteína/péptido. Como será apreciado por un experto en la materia, un anticuerpo que compite para unión con un anticuerpo de referencia puede no necesariamente unirse al epítipo idéntico como el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia uniéndose a un epítipo superpuesto o adyacente.

Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a uno superpuesto si cada uno inhibe (bloquea) de manera competitiva la unión del otro al antígeno. Esto es, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del

otro por al menos 50 %, 75 %, 90 % o incluso 99 % tal como se midió en un ensayo de unión competitiva (ver, por ejemplo, Junghans *et al.*, Cancer Res, 1990:50:1495-1502). De manera alternativa, dos anticuerpos tienen el mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno

5 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.

Puede llevarse a cabo entonces experimentación de rutina adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la falta de

10 unión del anticuerpo de prueba observada es de hecho debida 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 pueden llevarse a cabo utilizando ELISA, RIA, resonancia plasmónica de superficie, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión de anticuerpo

15 cuantitativa o cualitativa disponible en la técnica.

Los anticuerpos pueden ser evaluados para unión a Gremlin-1 por, por ejemplo, ELISA o transferencia de Western convencional. Un ensayo ELISA también puede utilizarse para buscar hibridomas que muestren reactividad

20 positiva con la proteína diana. La selectividad de unión de un anticuerpo puede también estar determinada por la supervisión de la unión del anticuerpo a células que expresen la proteína diana, por ejemplo, por citometría de flujo. De este modo, un método de cribado puede comprender el paso de identificar un anticuerpo que sea capaz de unirse a Gremlin-1 llevando a cabo un ELISA o

25 transferencia de Western o por citometría de flujo.

Los anticuerpos pueden reconocer de manera selectiva (o específica) Gremlin-1. Un anticuerpo, u otro compuesto, "se une de manera selectiva" o "reconoce de manera selectiva" una proteína cuando se une con afinidad preferente o alta a la proteína para la cual es selectiva pero no se une de manera

30 sustancial, o se une con baja afinidad, a otras proteínas. La selectividad de un anticuerpo puede además ser estudiada determinando si el anticuerpo se une o no a otras proteínas relacionadas según se analizó con anterioridad o si discrimina entre ellas. Los anticuerpos utilizados de conformidad con la invención típicamente reconocen el Gremlin-1 humano.

35 Los anticuerpos también pueden tener reactividad cruzada para proteínas

relacionadas, o para Gremlin-1 humano y Gremlin-1 de otras especies.

Por específico (o selectivo), se entenderá que el anticuerpo se une a la proteína de interés sin reactividad cruzada significativa a cualquier otra molécula. La reactividad cruzada puede ser evaluada por cualquier método apropiado descrito en la presente. La reactividad cruzada de un anticuerpo puede ser considerada significativa si el anticuerpo se une a la otra molécula 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) puede unirse a otra molécula a menos de aproximadamente 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 % o 20 % de la fuerza con que se une a la proteína de interés. El anticuerpo puede unirse a la otra molécula a 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 que se une a la proteína de interés.

Los anticuerpos anti-gremlin han sido previamente descritos, por ejemplo, el documento WO2014/159010A1 (Regeneron) describe anticuerpos anti-gremlin que inhiben la actividad Gremlin-1, con valores de K_D de afinidad de unión que oscilan desde 625 pM a 270 nM a 25 °C. Ciuculan *et al* (2013) describen un anticuerpo monoclonal anti-Gremlin-1 con una K_D de afinidad de unión $5,6 \times 10^{-10}$ M.

Los anticuerpos anti-Gremlin-1 descritos recientemente en la presente (y también en el documento PCT/BG2017/083650 presentada el 19 de diciembre de 2017, incorporada a la presente por referencia en su totalidad) son inhibidores alostéricos de la actividad Gremlin-1, y se unen a un epítipo nuevo como se describió con anterioridad, distal del sitio de unión de BMP. Los anticuerpos se unen a Gremlin-1 con afinidad excepcionalmente alta con valores $K_d < 100$ pM. Los anticuerpos por lo tanto representan una mejora significativa sobre los anticuerpos disponibles en la actualidad y se espera que sean particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por Gremlin-1.

De este modo, los anticuerpos apropiados para uso con la presente invención pueden tener gran afinidad de unión por Gremlin-1 (humano). 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. Pueden usarse una variedad de métodos para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo por su antígeno diana tales como ensayos de resonancia plasmónica de superficie, ensayos de saturación o inmunoensayos, tales como ELISA o RIA, como son bien conocidos por expertos en la técnica. Un método de ejemplo para determinar la afinidad de unión es por análisis de resonancia plasmónica de superficie en un instrumento BIAcore™ 2000 (Biacore AB, Friburgo, Alemania) usando chips sensores CM5, como se describe por Krinner *et al.*, (2007) Mol, Immunol. Febrero; 44 (5): 916-25. (Epub 11 de mayo de 2006).

Los anticuerpos utilizados de conformidad con la invención son típicamente anticuerpos inhibidores. Gremlin-1 regula de manera negativa BMP-2, 4 y 7, de manera que la inhibición de Gremlin-1 tiene como resultado la señalización aumentada a través de BMP.

Como se mencionó con anterioridad, los Ejemplos de la presente solicitud describen dos ensayos funcionales para examinar si un anticuerpo es capaz de inhibir Gremlin 1, a saber, ensayo de fosforilación de SMAD y ensayo de gen indicador Hek Id1. Típicamente, un anticuerpo inhibidor restaura la fosforilación de SMAD y/o restaura la señalización de BMP en el ensayo de gen indicador Hek Id1. La fosforilación de SMAD puede ser restaurada a al menos 80 %, 90 % o 100 % cuando se la compara con un control de BMP. En el ensayo de gen indicador Hek Id1, un anticuerpo inhibidor puede tener una CI_{50} de menos de 10 nM, preferiblemente menos de 5 nM.

Una vez que un anticuerpo apropiado ha sido identificado y seleccionado, la secuencia de aminoácido del anticuerpo puede ser identificada por métodos conocidos en la técnica. Los genes que codifican el anticuerpo pueden ser clonados utilizando cebadores redundantes. El anticuerpo puede ser producido de manera recombinante por métodos de rutina.

La presente divulgación también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica las regiones variables de cadena pesada y/o ligera (o las cadenas H y L de extensión completa) de una molécula de anticuerpo recientemente descrita en la presente.

Una variante de polinucleótido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40, hasta 50, hasta 75 o más sustituciones y/o eliminaciones de ácido nucleico de cualquiera de las secuencias de ácido

nucleico (incluyendo secuencias de ácido nucleico de anticuerpo GREM1 o anti-GREM1) dadas en el listado de secuencias. Por lo general, una variante tiene 1-20, 1-50, 1-75 o 1-100 sustituciones y/o eliminaciones.

Las variantes apropiadas pueden ser al menos aproximadamente 70 %
 5 homólogas de un polinucleótido de una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico divulgadas en la presente, típicamente al menos aproximadamente 80 o 90 % y más apropiadamente al menos aproximadamente 95 %, 97 % o 99 % homólogas del mismo. Las variantes pueden retener al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad.
 10 Las variantes típicamente retienen aproximadamente 60 % - aproximadamente 99 % de identidad, aproximadamente 80 % - aproximadamente 99 % de identidad, aproximadamente 90 % - aproximadamente 99 % de identidad o aproximadamente 95 % - aproximadamente 99 % de identidad. La homología y la identidad a estos niveles están generalmente presentes al menos con respecto
 15 a las regiones de codificación de los polinucleótidos. Los métodos de medición de homología son bien conocidos en la técnica y los expertos en la técnica entenderán que en el presente contexto, la homología se calcula sobre la base de la identidad de ácido nucleico. Dicha homología puede existir sobre una región de al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 30, por
 20 ejemplo, al menos aproximadamente 40, 60, 100, 200 o más nucleótidos contiguos (dependiendo de la longitud). Dicha homología puede existir sobre la totalidad de la longitud de una secuencia de polinucleótidos no modificada.

Los métodos para medir la homología o identidad de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el Paquete UWGCG proporciona el
 25 programa BESTFIT que puede usarse para calcular homología (por ejemplo, usado en su configuración predeterminada) (Devereux *et al* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, págs. 387-395).

Los algoritmos PILEUP y BLAST también pueden usarse para calcular homología o secuencias alineadas (típicamente en sus configuraciones
 30 predeterminadas), por ejemplo, como se describe en Altschul S.F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F *et al* (1990) *J Mol Biol* 215:403-10.

El software para llevar a cabo el análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo incluye en primer lugar identificar
 35 pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de

longitud W en la secuencia problema que se empareje o satisfaga alguna puntuación T de umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de vecindad de palabras (Altschul *et al*, mencionado anteriormente).

- 5 Estos resultados de la vecindad de palabras inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que las contengan. Los resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulada. Las extensiones para los resultados de palabras en cada dirección se detienen
- 10 cuando: la puntuación de alineación acumulada llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como predefinida una longitud de palabra (W) de 11, las
- 15 alineaciones (B) de la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas hebras.

- El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias, ver, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- 20 90:5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma menor (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que un emparejamiento entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos pueda ocurrir por casualidad. Por ejemplo, una secuencia es considerada similar a otra secuencia si la probabilidad de suma menor
- 25 comparando la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, típicamente menor de aproximadamente 0,1, convenientemente menor de aproximadamente 0,01 y más convenientemente menor de aproximadamente 0,001. Por ejemplo, la probabilidad de suma menor puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 – aproximadamente 0,001,
- 30 con frecuencia aproximadamente 0,01 – aproximadamente 0,001.

- El homólogo puede diferir de una secuencia en el polinucleótido relevante por menos de 3, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (cada una puede ser una sustitución, eliminación o inserción). Por ejemplo, el homólogo puede diferir por 3-50 mutaciones, con frecuencia 3-20 mutaciones. Estas mutaciones pueden ser
- 35 medidas sobre una región de al menos 30, por ejemplo, al menos

aproximadamente 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos del homólogo.

En una forma de realización, una variante de secuencia puede variar desde las secuencias específicas dadas en el listado de secuencias como consecuencia de la redundancia en el código genético. El código de ADN tiene 4 restos de ácido nucleico principales (A, T, C y G) y usa estos para "deletrear" codones de tres letras que representan los aminoácidos de las proteínas codificadas en los genes de un organismo. La secuencia lineal de los codones a lo largo de la molécula de ADN se traduce a la secuencia lineal de los aminoácidos en las proteínas codificadas por dichos genes. El código es altamente degenerado, codificando 61 codones los 20 aminoácidos naturales y representando 3 codones señales de "detención". De este modo, la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón, de hecho varios son codificados por cuatro o más codones diferentes. Una variante de polinucleótido de la invención puede entonces codificar la misma secuencia de polipéptidos que otro polinucleótido de la invención, pero puede tener una secuencia de ácido nucleico diferente debido al uso de los diferentes codones para codificar los mismos aminoácidos.

La secuencia de ADN puede comprender ADN sintético, por ejemplo, producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo descrita en la presente pueden ser obtenidas por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligeras o pesadas del anticuerpo pueden ser sintetizadas según se desee desde las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

Los métodos generales por los cuales pueden construirse los vectores, métodos de transfección y métodos de cultivos son bien conocidos por los expertos en la técnica. En este sentido, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Maniatis Manual producidos por Cold Spring Harbor Publishing.

Antagonistas de ácido nucleico

Un polinucleótido, tal como un ácido nucleico, es un polímero que comprende dos o más nucleótidos. Los nucleótidos pueden ocurrir de manera natural o artificial. Un nucleótido típicamente comprende una nucleobase, un

azúcar y al menos un grupo de unión, tal como un grupo fosfato, 2'O-metilo, 2'metoxi-etilo, fosforamidatos, metilfosfonato o fosforotioato. La nucleobase es típicamente heterocíclica. Las nucleobases incluyen, pero no se limitan a, purinas y pirimidinas y más específicamente adenina (A), guanina (G), timina (T), uracilo (U) y citosina (C). El azúcar es típicamente azúcar pentosa. Los azúcares de los nucleótidos incluyen, pero no se limitan a, ribosa y desoxirribosa. El nucleótido es típicamente un ribonucleótido o desoxirribonucleótido. El nucleótido típicamente contiene un monofosfato, difosfato o trifosfato. Los fosfatos pueden estar adjuntos en el lateral 5' o 3' de un nucleótido.

Los nucleótidos incluyen, pero no se limitan a, adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), guanosina monofosfato (GMP), guanosina difosfato (GDP), guanosina trifosfato (GTP), timidina monofosfato (TMP), timidina difosfato (TDP), timidina trifosfato (TTP), uridina monofosfato (UMP), uridina difosfato (UDP), uridina trifosfato (UTP), citidina monofosfato (CMP), citidina difosfato (CDP), citidina trifosfato (CTP), monofosfato de 5-metilcitidina, difosfato de 5-metilcitidina, trifosfato de 5-metilcitidina, monofosfato de 5-hidroximetilcitidina, difosfato de 5-hidroximetilcitidina, trifosfato de 5-hidroximetilcitidina, monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), monofosfato de desoxiadenosina (dAMP), difosfato de desoxiadenosina (dADP), trifosfato de desoxiadenosina (dATP), monofosfato de desoxiguanosina (dGMP), difosfato de desoxiguanosina (dGDP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), monofosfato de desoxitimidina (dTMP), difosfato de desoxitimidina (dTDP), trifosfato de desoxitimidina (dTTP), monofosfato de desoxiuridina (dUMP), difosfato de desoxiuridina (dUDP), trifosfato de desoxiuridina (dUTP), monofosfato de desoxicitidina (dCMP), difosfato de desoxicitidina (dCDP) y trifosfato de desoxicitidina (dCTP), monofosfato de 5-metil-2'-desoxicitidina, difosfato de 5-metil-2'-desoxicitidina, trifosfato de 5-metil-2'-desoxicitidina, monofosfato de 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina, difosfato de 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina y trifosfato de 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina. Los nucleótidos son preferiblemente seleccionados de AMP, TMP, GMP, UMP, dAMP, dTMP, dGMP o dCMP.

Los nucleótidos pueden contener modificaciones adicionales. En particular, los nucleótidos modificados apropiados incluyen, pero no se limitan a, 2'amino pirimidinas (tales como 2'-amino citidina y 2'-amino uridina), 2'-hidróxilo purinas (tales como, 2'-fluoro pirimidinas (tales como 2'-fluorocitidina y 2'-fluoro

uridina), hidroxilo pirimidinas (tales como 5'- α -P-borano uridina), 2'-O-metil nucleótidos (tales como 2'-O-metil adenosina, 2'-O-metil guanosina, 2'-O-metil citidina y 2'-O-metil uridina), 4'-tio pirimidinas (tales como 4'-tio uridina y 4'-tio citidina) y nucleótidos que tienen modificaciones de la nucleobase (tales como
 5 5-pentiril-2'-desoxi uridina, 5-(3-aminopropilo)-uridina y 1,6-diaminohexilo-N-5-carbamoilmetil uridina).

Los nucleótidos en el polinucleótido pueden estar unidos entre sí de cualquier manera. Los nucleótidos pueden estar unidos por vínculos fosfato, 2'-O-metilo, 2'-metoxi-etilo, fosforoamidato, metilfosfonato o fosforotioatos. Los
 10 nucleótidos están típicamente adjuntos por su azúcar y grupos fosfato como en los ácidos nucleicos. Los nucleótidos pueden estar conectados a través de sus nucleobases como en dímeros de pirimidina.

El antagonista de GREM1 puede ser un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente.

15 El polinucleótido puede ser un ácido nucleico, tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN). El polinucleótido puede ser cualquier ácido nucleico sintético conocido en la técnica, tal como un ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico glicólico (GNA), ácido nucleico de treosa (TNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico morfolino u otros
 20 polímeros sintéticos con cadenas laterales de nucleótidos. El polinucleótido puede ser de hebra simple o de hebra doble.

La secuencia de polinucleótido puede ser clonada en cualquier vector de expresión apropiado. En un vector de expresión, la secuencia de polinucleótido que codifica una construcción está típicamente operativamente vinculada a una
 25 secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificadora por la célula huésped. Dichos vectores de expresión pueden ser usados para expresar una construcción.

En una forma de realización, el antagonista anti-GREM1 es un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente. El
 30 polinucleótido puede ser provisto para uso en la terapia de genes. El polinucleótido puede ser provisto en cualquier vector apropiado apto para proporcionar la expresión del anticuerpo anti-GREM1 *in vivo*.

El polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-GREM1 puede ser una secuencia de ADN. La secuencia de ADN puede ser provista en cualquier vector
 35 apropiado, por ejemplo, un vector de expresión, para administración a un sujeto

que lo necesite. Por ejemplo, la secuencia de ADN puede ser administrada al sujeto en un vector de expresión capaz de proporcionar una expresión del anticuerpo anti-GREM1 *in vivo*. El vector de expresión puede ser un vector de expresión viral, tal como un vector de virus adeno-asociado (AAV). En una forma de realización, el antagonista anti-GREM1 es una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente. En una forma de realización, el antagonista anti-GREM1 es una secuencia de ADN para uso en una terapia de genes, en donde la secuencia de ADN codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente. En una forma de realización, el antagonista anti-GREM1 es un AAV que comprende una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente. En una forma de realización, el antagonista anti-GREM1 es un AAV para uso en terapia de genes, en donde el AAV comprende una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente.

El polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-GREM1 puede ser una secuencia de ARN. La secuencia de ARN puede ser administrada a un sujeto que lo necesite en cualquier vector apropiado. La secuencia de ARN puede ser una secuencia de ARN mensajero (ARNm). La secuencia de ARNm puede ser administrada a un sujeto que lo necesite en una forma estabilizada. Por ejemplo, la secuencia de ARNm puede ser proporcionada en una composición de nanopartícula lipídica (LNP). La composición LNP puede comprender cualquier LNP apropiada capaz de encapsular la secuencia de ARNm para proporcionar una estabilidad incrementada de dicha secuencia de ARNm. De este modo, en una forma de realización, el antagonista anti-GREM1 es una secuencia de ARNm estabilizada que codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente. En una forma de realización, el antagonista anti-ARNm es una secuencia de ARNm estabilizada para uso en una terapia de genes, en donde la secuencia de ARNm codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente. En una forma de realización, el antagonista anti-GREM1 es una composición LNP que comprende un ARNm que codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente. En una forma de realización, el antagonista anti-GREM1 es una composición LNP para uso en una terapia de genes, en donde la composición LNP comprende un ARNm que codifica un anticuerpo anti-GREM1 descrito en la presente.

La expresión "operativamente vinculado" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les

permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de control "operativamente vinculada" a una secuencia de codificación está ligada de forma tal que la expresión de la secuencia de codificación se alcanza bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Pueden introducirse múltiples copias del mismo o diferente polinucleótido en el vector.

El vector de expresión pueden estar entonces introducido en una célula huésped apropiada. De este modo, una construcción puede ser producida insertando una secuencia de polinucleótido que codifica una construcción en un vector de expresión, introduciendo el vector en una célula huésped bacteriana compatible, y haciendo crecer la célula huésped bajo condiciones que provocan la expresión de la secuencia de polinucleótido.

Un antagonista de GREM1 que está basado en un ácido nucleico puede reducir la expresión de GREM1. Las tecnologías de antisentido e interferencia de ARN (ARNi) para atenuar la expresión de proteína son conocidas en la técnica y pueden emplearse métodos convencionales para atenuar la expresión de una molécula de interés. Ambas tecnologías antisentido y ARNi interfieren con el ARNm. Los oligonucleótidos antisentido interfieren con el ARNm uniéndose a (hibridación con) una sección del ARNm. El oligonucleótido antisentido está entonces diseñado para ser complementario al ARNm (a pesar de que el oligonucleótido no tiene que ser 100 % complementario como se analiza a continuación). En otras palabras, el oligonucleótido antisentido puede ser una sección del ADNc. Nuevamente, la secuencia de oligonucleótidos puede no ser 100 % idéntica a la secuencia de ADNc. Esto también se analiza a continuación. ARNi incluye el uso de ARN de doble cadena, tal como ARN interferente pequeño (ARNip) o ARN horquillado corto (ARNhc), que puede unirse al ARNm e inhibir la expresión de proteína.

De conformidad, el antagonista puede ser un oligonucleótido que específicamente hibrida con un ARNm que codifica GREM1, tal como la secuencia codificadora de SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 37 o una variante de las mismas. Un oligonucleótido "específicamente hibrida" con una secuencia diana cuando hibrida con afinidad preferente o alta con la secuencia diana pero no hibrida sustancialmente, no hibrida o hibrida con solo baja afinidad con otras secuencias. Más preferiblemente, el oligonucleótido hibrida con la secuencia diana con una T_m que es al menos 5 °C, al menos 10 °C, al menos 20 °C, al menos 30 °C o al menos 40 °C, mayor que su T_m para otros ácidos nucleicos.

Las condiciones que permiten la hibridación son conocidas en la técnica (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press; y Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 2, Ausubel *et al.*, Eds., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1995)). Las condiciones de hibridación pueden ser condiciones estrictas como se describe en la técnica.

Los oligonucleótidos son polímeros de nucleótidos cortos que típicamente tienen 50 o menos nucleótidos, tales como 40 o menos, 30 o menos, 22 o menos, 21 o menos, 20 o menos, 10 o menos o 5 o menos nucleótidos. El oligonucleótido utilizado puede tener 20 a 25 nucleótidos de extensión, más preferiblemente 21 o 22 nucleótidos de extensión. Los nucleótidos pueden ocurrir de manera natural o artificial. Los nucleótidos pueden ser cualquiera de los descritos con anterioridad.

El antagonista de GREM1 puede ser un anticuerpo que se une a GREM1, por lo general específicamente se une a GREM1. Un anticuerpo "específicamente se une" a una proteína cuando se une con una afinidad preferente o alta a una proteína pero no se une sustancialmente, no se une o se une solamente con baja afinidad a otras proteínas. Por ejemplo, un anticuerpo "específicamente se une" a una molécula diana cuando se une con afinidad preferente o alta a dicha diana pero no se une sustancialmente, no se uno o se une solo con baja afinidad a otras proteínas humanas.

Un anticuerpo se une con afinidad preferente o alta si se une con un Kd de 1×10^{-7} M o menos, más preferiblemente 5×10^{-8} M o menos, más preferiblemente 1×10^{-8} M o menos o más preferiblemente 5×10^{-9} M o menos. Un anticuerpo se une con baja afinidad si se une con un Kd de 1×10^{-6} M o más, más preferiblemente 1×10^{-5} M o más, más preferiblemente 1×10^{-4} M o más, más preferiblemente 1×10^{-3} M o más, incluso más preferiblemente 1×10^{-2} M o más.

El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo híbrido, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo con injerto de CDR o un anticuerpo humanizado. El anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina intacta o un fragmento de la misma tal como un Fab, $F(ab')_2$ o fragmento Fv.

Paciente

Cualquier paciente puede ser tratado de conformidad con la invención. El

paciente es por lo general humano. Sin embargo, el paciente puede ser otro animal mamífero, tal como un animal criado de forma comercial, como un caballo, una vaca, una oveja, un pez, un pollo o un cerdo, un animal de laboratorio, como un ratón o una rata, o una mascota, como una cobaya, un hámster, un conejo, un gato o un perro.

Composiciones Farmacéuticas, Dosificaciones y Regímenes de Dosificación

Un antagonista de GREM1 de la invención puede estar provisto en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica será normalmente estéril y típicamente incluirá un portador y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede adicionalmente incluir un adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente, un "*portador farmacéuticamente aceptable*" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. El portador puede ser apropiado para administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión. De maneta alternativa, el portador puede ser apropiado para administración no parenteral tal como una vía de administración tópica, epidérmica o a través de la mucosa. El portador puede ser apropiado para administración oral. Dependiendo de la vía de administración, el modulador puede estar recubierto en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas de 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 del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado. Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales alcalinas.

Portadores farmacéuticamente aceptables comprenden portadores acuosos o diluyentes. Ejemplos de portadores acuosos apropiados que puedan ser empleados en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, agua tamponada y solución salina. Ejemplos de otros portadores incluyen etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva,

y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato. En varios casos, será conveniente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

5 Las composiciones terapéuticas deben ser típicamente estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada apropiada para alta concentración de fármacos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender principios activos adicionales.

10 También dentro del ámbito de la presente divulgación, se encuentran los kits que comprenden antagonistas descritos en la presente e instrucciones para su uso. El kit puede además contener uno o más reactivos adicionales, tales como un agente terapéutico o profiláctico adicional como se analiza en la presente.

15 Los antagonistas descritos en la presente o formulaciones o composiciones de las mismas pueden ser administrados para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

En aplicaciones terapéuticas, los compuestos se administran a un sujeto que ya padece un trastorno o condición según se describió con anterioridad, en
20 una cantidad suficiente para curar, aliviar o parcialmente detener la condición o uno o más de sus síntomas. Dicho tratamiento terapéutico puede resultar en una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, o un aumento en la frecuencia o duración de los períodos libres de síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "*cantidad terapéuticamente*
25 *efectiva*".

En aplicaciones profilácticas, las formulaciones se administran a un sujeto en riesgo de un trastorno o condición como se describió con anterioridad, en una cantidad suficiente para evitar o reducir los efectos posteriores de la condición o uno o más de sus síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define
30 como una "*cantidad efectiva profilácticamente*". Las cantidades efectivas para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión así como del peso y estado general del sujeto.

Un sujeto para administración puede ser un ser humano o un animal no humano. La expresión "*animal no humano*" incluye todos los vertebrados, por
35 ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas,

perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. La administración a seres humanos es típica.

Una composición farmacéutica o antagonista de la invención puede ser administrada a través de una o más vías de administración utilizando una o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como podrá apreciar un experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Ejemplos de vías de administración de compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea, espinal y otras vías de administración parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "*administración parenteral*" como se usa en la presente significa modos de administración que no sean administración enteral o tópica, usualmente por inyección. De manera alternativa, un anticuerpo/agente modulador o composición farmacéutica de la invención puede ser administrada a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o de la mucosa. El anticuerpo/agente modulador o composición farmacéutica de la invención puede ser para administración oral.

Una dosificación apropiada de un anticuerpo/agente modulador o composición farmacéutica de la invención puede ser determinada por un médico experto. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse de manera que se obtenga una cantidad de principio activo que sea efectiva para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente que está siendo tratado, y factores similares conocidos en las artes médicas.

Una dosis apropiada puede ser, por ejemplo, en el intervalo de desde aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal, típicamente desde aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg

de peso corporal, del paciente que va a ser tratado. Por ejemplo, una dosificación apropiada puede ser desde aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día o desde aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día.

5 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una dosis única, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede ser proporcionalmente reducida o aumentada según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La forma
10 de unidad de dosificación como se usa en la presente se refiere a las unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de un compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

15 La administración puede ser en dosis únicas o múltiples. Las dosis múltiples pueden administrarse a través de las mismas o diferentes vías y a las mismas o diferentes locaciones. De manera alternativa, las dosis pueden ser a través de una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere menos frecuencia de administración. La dosificación y frecuencia puede variar
20 dependiendo de la semivida del antagonista en el paciente y la duración deseada del tratamiento.

Como se mencionó con anterioridad, las composiciones farmacéuticas o moduladores/anticuerpos de la invención pueden ser co-administradas con uno o más de los agentes terapéuticos adicionales.

25 La administración combinada de dos o más agentes puede lograrse en una cantidad de formas diferentes. Ambos pueden administrarse de manera conjunta en una composición única o pueden administrarse en composiciones separadas como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, una puede administrarse con anterioridad o de manera separada, con posterioridad o de
30 manera consecutiva, o de manera conjunta o simultánea con la otra.

Composiciones farmacéuticas y modos de administración

Los antagonistas para uso en los métodos de tratamiento descritos en la presente pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de los ingredientes
35 terapéuticamente activos, un excipiente, portador, diluyente, tampón,

estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para aquellos expertos en la materia. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. El portador o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica.

- 5 La naturaleza precisa del portador u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vías orales, intravenosas, cutáneas o subcutáneas, nasales, intramusculares e intraperitoneales. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con la sustancia activa, diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón
- 10 de patata; lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, estearato de calcio o magnesio, y/o polietilenglicol; agentes aglutinantes; por ejemplo, almidones, goma arábica, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato sódico de almidón; mezclas efervescentes; colorantes;
- 15 endulzantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas utilizadas en formulaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones farmacéuticas pueden ser fabricadas de manera conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, granulación, compresión, recubrimiento
- 20 azucarado o recubrimiento de película.

Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes usualmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones,

25 suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 % a 95 % de principio activo, preferiblemente de 25 % a 70 %. Donde la composición farmacéutica está liofilizada, el material liofilizado puede ser reconstituido antes de la administración, por ejemplo, una suspensión. La reconstitución se lleva a cabo preferiblemente en un tampón.

30 Las cápsulas, comprimidos y píldoras para administración oral a un individuo pueden estar proporcionadas con un revestimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa o hidroxipropilmetilcelulosa.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes,

35 emulsiones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como portadores, por

ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

Las suspensiones y emulsiones pueden contener como portador, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con la sustancia activa, un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo, propilenglicol y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

Las soluciones para administración intravenosa o infusión pueden contener, como portadores, por ejemplo, agua estéril o preferiblemente pueden estar en la forma de soluciones salinas isotónicas, acuosas o estériles.

Para supositorios, los aglutinantes tradicionales y portadores pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden estar formados de mezclas que contengan el principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferiblemente de 1 % a 2 %.

Los inhibidores de polinucleótidos u oligonucleótidos pueden ser secuencias de nucleótidos desnudos o estar en combinación con lípidos catiónicos, polímeros o sistemas diana. Pueden ser entregados por cualquier técnica disponible. Por ejemplo, el polinucleótido u oligonucleótido puede ser introducido por aguja de inyección, preferiblemente de manera intradérmica, subcutánea o intramuscular. De manera alternativa, el polinucleótido u oligonucleótido puede ser entregado directamente a través de la piel utilizando un dispositivo de entrega tal como una entrega de gen mediada por partículas. El polinucleótido u oligonucleótido puede ser administrado tópicamente a la piel, o a las superficies mucosas, por ejemplo, por administración intranasal, oral o intrarrectal.

La captación de construcciones de polinucleótidos u oligonucleótidos puede ser mejorada por varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato de calcio y DEAE-Dextrano y lipofectantes, por ejemplo, lipofectamine y transfectamina. La dosificación del polinucleótido u oligonucleótido para administrar puede ser alterada.

La administración es típicamente en una "cantidad profilácticamente efectiva" o una "cantidad terapéuticamente efectiva" (según sea el caso, a pesar

de que la profilaxis pueda ser considerada terapia), siendo esto suficiente para demostrar el beneficio al individuo, por ejemplo, una cantidad efectiva para evitar o demorar el comienzo de la enfermedad o condición, para mejorar uno o más síntomas, para inducir o prolongar la remisión, o para demorar la recaída o

5 recurrencia.

La dosis puede estar determinada de conformidad con varios parámetros, especialmente de conformidad con la sustancia usada; la edad, peso y condición del individuo para tratar; la vía de administración; y el régimen requerido. Un médico será capaz de determinar la vía de administración requerida y la

10 dosificación para cualquier individuo particular. Una dosis diaria típica es desde aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg de peso corporal dependiendo de las condiciones mencionadas con anterioridad. La dosis puede ser proporcionada como una dosis única o puede ser proporcionada como dosis múltiples, por ejemplo, tomadas en intervalos regulares, por ejemplo, 2, 3 o 4 dosis

15 administradas cada hora. Típicamente los inhibidores de polinucleótidos u oligonucleótidos se administran en el intervalo de 1 pg a 1 mg, preferiblemente a 1 pg a 10 µg ácido nucleico para entrega mediada por partículas y 10 µg a 1 mg para otras vías.

Ejemplos de técnicas y protocolos mencionados con anterioridad pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20^a edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

20

Combinaciones terapéuticas

Una composición de la invención, como se describió con anterioridad, puede utilizarse/administrarse sola o en combinación con otras composiciones o

25 tratamientos terapéuticos, por ejemplo, como terapia complementaria. Las otras composiciones o tratamientos terapéuticos pueden, por ejemplo, ser uno o más de aquellos analizados en la presente, y pueden ser administrados ya sea de manera simultánea o consecutiva con la composición de la invención.

Como se analizó con anterioridad, los antagonistas GREM1 tienen utilidad particular en tratamientos de combinación, ya que pueden ser usados para sensibilizar un cáncer o tumor a otro agente anti-canceroso, tal como un agente quimioterapéutico, u otra terapia para cáncer, tal como radioterapia o cirugía. El

30 cáncer puede ser resistente al otro agente anti-canceroso o terapia para cáncer en ausencia del antagonista de GREM1.

De este modo, un antagonista anti-GREM1 puede ser usado en

35

combinación con otra terapia para cáncer o cualquier otro agente terapéutico para un cáncer, tal como un agente quimioterapéutico. La otra terapia para cáncer puede ser seleccionada de cualquier terapia conocida para el cáncer pertinente, tal como cualquier terapia conocida para cáncer colorrectal. La otra
5 terapia para cáncer puede ser una radioterapia. Los tratamientos apropiados de radioterapia se describen en Van Cutsem (y otros) *Annals of Oncology*, 2014, Vol. 25, número 3. La radioterapia puede ser llevada a cabo antes de la cirugía en un cáncer o después de la cirugía en un cáncer. La radioterapia puede ser radioterapia adyuvante. La radioterapia puede llevarse a cabo en combinación
10 con una quimioterapia, por ejemplo, administración de un agente quimioterapéutico como se describe a continuación.

El otro agente terapéutico para un cáncer, tal como un agente quimioterapéutico puede ser seleccionado de cualquier agente terapéutico conocido para el cáncer pertinente, incluyendo cualquier agente
15 quimioterapéutico conocido o combinación de agentes quimioterapéuticos para el cáncer pertinente. Por ejemplo, un antagonista de GREM1 puede ser usado en combinación con uno o más de 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecán y ácido folínico, particularmente en tratamientos de cáncer colorrectal. Otros ejemplos de tratamientos de combinación que combinan los antagonistas de GREM1 con
20 otros agentes anti-cancerosos para tratamiento de cáncer colorrectal y mieloma múltiple se describen a continuación en el contexto de composiciones y kits para tratamiento. El cáncer puede ser resistente a uno o más agentes quimioterapéuticos (tal como uno de los agentes quimioterapéuticos antes mencionados) cuando no se administran en combinación con un antagonista de
25 GREM1. Un antagonista de GREM1 puede utilizarse en combinación con cetuximab, nivolumab o bevacizumab. Puede administrarse un anticuerpo biespecífico que combina una especificidad anti-GREM1 y una especificidad de nivolumab o bevacizumab.

Como parte de los aspectos antes mencionados, la invención proporciona
30 un antagonista anti-GREM1 para uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer de conformidad con la invención, en donde el método comprende administración separada, de manera consecutiva o simultánea de un agente quimioterapéutico. La invención también proporciona un antagonista anti-GREM1 para uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer de
35 conformidad con la invención, en donde el método comprende radioterapia

separada, de manera consecutiva o simultánea. La invención además proporciona un agente quimioterapéutico para uso en un método para el tratamiento de un cáncer que tenga sobreexpresión estromal de GREM1 en donde el método comprende administración separada, de manera consecutiva o

5 simultánea de un antagonista anti-GREM1. La invención también proporciona un agente quimioterapéutico para uso en un método para la prevención o tratamiento de un cáncer que tenga sobreexpresión epitelial de GREM1 en donde el método comprende administración separada, de manera consecutiva o simultánea, de un antagonista anti-GREM1.

10 Adicionalmente se proporciona una composición o kit que comprende un antagonista anti-GREM1 y un agente anti-canceroso adicional. El agente anti-canceroso adicional puede ser un agente quimioterapéutico o terapéutico diana. El agente anti-canceroso adicional puede ser cualquier agente anti-canceroso descrito con anterioridad. Pueden incorporarse más de uno de dichos agentes

15 anti-cancerosos adicionales en la composición o kit. La composición o kit puede comprender un antagonista anti-GREM1 y uno o más agentes anti-cancerosos seleccionados de: 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecán y ácido folínico, cetuximab, nivolumab y bevacizumab, particularmente como parte de una composición o kit para el tratamiento de cáncer colorrectal. Una composición o

20 kit para el tratamiento de mieloma múltiple puede comprender un antagonista anti-GREM1 y uno o más de un anticuerpo anti-CD38 (tal como un daratumumab), un anticuerpo anti-SLAMF7 (tal como elotuzumab) y/o un anticuerpo anti-IL-6 (tal como siltuximab). Puede proporcionarse un anticuerpo biespecífico que combine una especificidad anti-GREM1 y una de las otras

25 especificidades anteriores en una composición o kit. Una combinación preferida comprende un antagonista anti-GREM1 y un anticuerpo anti IL-6 (preferiblemente siltuximab). Una composición o kit para tratamiento de mieloma múltiple puede comprender un antagonista anti-GREM1 y bortezumib y/o iMID (lenalidomida/pomalidomida) o un análogo de cualquiera de ellos. El antagonista

30 anti-GREM1 en cualquiera de las composiciones anteriores y kits puede ser preferiblemente un anticuerpo anti-GREM1.

Indicaciones terapéuticas

Los antagonistas de la presente invención se utilizan en el tratamiento o prevención del cáncer.

35 La prevención del cáncer puede incluir prevenir que el sujeto sea

diagnosticado con cáncer o postergar la aparición del cáncer. La prevención del cáncer puede también incluir la prevención de la recaída o recurrencia del cáncer un sujeto que ha sido previamente diagnosticado con cáncer. La prevención del cáncer puede adicionalmente incluir aumentar la supervivencia de un sujeto que

5 no ha sido diagnosticado con cáncer o que ha sido previamente diagnosticado con cáncer.

El tratamiento del cáncer puede paliar uno o más síntomas, inducir o prolongar la remisión, o demorar la recaída o recurrencia del cáncer. El tratamiento puede curar, paliar o parcialmente detener el cáncer. Puede resultar

10 en una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, o un aumento en la frecuencia o duración de los períodos libres de síntomas. El tratamiento del cáncer puede también incluir prevenir que un cáncer (por ejemplo, un cáncer establecido) se propague desde su sitio inicial dentro del cuerpo del paciente a uno o más sitios secundarios dentro del cuerpo del

15 paciente. De este modo, el tratamiento del cáncer puede incluir la prevención de la diseminación o metástasis de un cáncer existente. El tratamiento del cáncer colorrectal puede resultar en una reducción en la carga de pólipos (cantidad de pólipos) como se evaluó, por ejemplo, por endoscopia. El tratamiento de mieloma múltiple puede resultar en una reducción en la carga tumoral en la médula ósea,

20 por ejemplo, como se evaluó con exploración MRI/CT, y/o una reducción en la carga de células plasmáticas, que puede ser determinado con posterioridad a la biopsia de la médula ósea, y/o reducción de uno o más marcadores de suero tales como la producción de anticuerpo monoclonal (paraproteína) y proporción de cadenas ligeras libres de suero (FCL), y/o reducción en lesiones líticas

25 asociadas del esqueleto, que pueden ser detectadas por radiografía.

Detección y Diagnóstico

Basada en la correlación entre el GREM1 estromal y el cáncer, la presente invención también proporciona medios adicionales para la detección y diagnóstico del cáncer, y para pronóstico de cáncer y predicción de capacidad

30 de respuesta de un cáncer a un tratamiento.

La invención además proporciona un método para detectar el cáncer en un paciente, en donde el método comprende medir la expresión estromal del GREM1 en el paciente, en donde la sobreexpresión estromal de GREM1 indica que el paciente tiene un cáncer. La invención también proporciona un método

35 para pronosticar un cáncer en un paciente, en donde el método comprende

determinar si el cáncer comprende sobreexpresión estromal de GREM1 o no, en donde la sobreexpresión estromal de GREM1 en el cáncer indica que el paciente tiene un peor pronóstico que en la situación de expresión estromal normal de GREM1. El cáncer puede ser cualquier cáncer descrito en la presente. El cáncer es preferiblemente un cáncer colorrectal, que típicamente comprende un estroma desmoplásico, mieloma múltiple o cáncer de mama.

El diagnóstico incluye determinar si un individuo tiene un cáncer o tumor o no y/o determinar la intensidad del cáncer o tumor.

El pronóstico incluye pronosticar si un individuo va a desarrollar un cáncer o tumor o no, si necesitará tratamiento o no, el tipo de tratamiento que el individuo necesitará, si responderá al tratamiento o no, si sufrirá un episodio, recurrencia o recaída de cáncer o no, y la intensidad o duración de un síntoma o episodio, recurrencia o recaída de un cáncer. El método de pronóstico puede pronosticar si un individuo en remisión de un cáncer tendrá una recurrencia o no. Pronosticar si un individuo tendrá una recurrencia o no incluye determinar la probabilidad de que el individuo tenga una recurrencia, y/o pronosticar cuándo tendrá la recurrencia. La invención además proporciona un método para determinar si un paciente que tiene o se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer es potencialmente capaz de responder a tratamiento con un agente quimioterapéutico o no, cuyo método comprende medir la expresión estromal del GREM1 en el paciente, y de ese modo, pronosticar si el paciente es potencialmente capaz de responder a un tratamiento con el agente quimioterapéutico o no.

La invención adicionalmente proporciona un método para determinar si un paciente que tiene o se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer es potencialmente capaz de responder a un tratamiento con un antagonista de GREM1 o no, en donde el método comprende medir la expresión estromal de GREM1 en el paciente, y de ese modo pronosticar si el paciente es potencialmente capaz de responder al tratamiento con el antagonista de GREM1 o no. Los métodos antes mencionados puede además pronosticar la capacidad de respuesta a un tratamiento combinado con un antagonista de GREM1 y un agente quimioterapéutico, o un tratamiento combinado que comprenda la administración de un antagonista de GREM1 y radioterapia.

La capacidad de respuesta pronosticada en un individuo a una terapia dada significa que se espera que el individuo obtenga beneficio, o un grado

suficiente de beneficio, de recibir la terapia. La falta de respuesta pronosticada en un individuo a una terapia significa que no se espera que el individuo obtenga beneficio, o un grado suficiente de beneficio, de recibir la terapia. El método para pronosticar la respuesta puede llevarse a cabo antes de la administración del antagonista de GREM1 o agente quimioterapéutico. El pronóstico puede tenerse en cuenta cuando se selecciona o recomienda un tratamiento apropiado para el individuo. De manera alternativa, el método puede llevarse a cabo después del tratamiento con la terapia y usado para supervisar y pronosticar la respuesta del individuo al tratamiento. Típicamente, el método es para pronosticar si el individuo tendrá una respuesta primaria al tratamiento con la terapia o no, esto es si el individuo responderá o no cuando reciba por primera vez el tratamiento. En algunos casos el método es para pronosticar faltas de respuesta secundarias, esto es, si un individuo que inicialmente responde al tratamiento posteriormente dejará de responder al tratamiento o no, o si responderá de manera menos favorable al tratamiento.

De conformidad con la presente invención, el nivel estromal y/o epitelial de GREM1 aumentado en un individuo, en comparación con una muestra de referencia o nivel de referencia, indica un diagnóstico positivo referente a la presencia de cáncer, por ejemplo, que el individuo tiene cáncer o una forma particular de cáncer o tiene un cáncer de mayor intensidad. Un nivel estromal y/o epitelial de GREM1 aumentado también indica un pronóstico negativo, esto es un resultado pronosticado malo para el individuo, por ejemplo, que el individuo no responderá a una terapia particular, que un individuo en remisión de cáncer tendrá una recurrencia o que el individuo se encuentra en mayor riesgo de desarrollar el cáncer.

A la inversa, un nivel de GREM1 disminuido o normal indican un diagnóstico negativo, por ejemplo, que el individuo no tiene el cáncer o tiene un cáncer de poca intensidad. Un nivel disminuido de GREM1 puede indicar un pronóstico positivo, que es un buen resultado para el paciente, por ejemplo, que el individuo responderá a una terapia particular o que un individuo en remisión del cáncer no tendrá una recurrencia o no se encuentra en mayor riesgo de desarrollar la enfermedad o condición. Para diagnosticar si un individuo tiene o no cáncer, la muestra o nivel de referencia típicamente representa un nivel de base de GREM1 en un individuo que no tiene el cáncer pertinente, o que se sospecha que tiene el cáncer pero posteriormente se confirma que no tiene el

cáncer.

El método para diagnosticar o pronosticar puede incluir seleccionar o recomendar un tratamiento adecuado para el individuo, esto es, basado en el diagnóstico o pronóstico. El tratamiento seleccionado o recomendado puede entonces ser administrado al individuo. De este modo, los métodos de detección, diagnóstico, pronóstico y predicción de capacidad de respuesta antes mencionados pueden además comprender un paso de administrar uno o más agentes anti-cancerosos profilácticos o terapéuticos al individuo, o administrar una terapia para cáncer, tal como radioterapia. El o los agentes típicamente comprenden un antagonista de GREM1, cualquiera puede además comprender un agente anti-canceroso adicional como se describe con anterioridad.

En algunos casos, una sobreexpresión de GREM1, en comparación con una muestra de referencia o nivel de referencia, indica que el individuo responderá a la terapia con un antagonista de GREM1. Una terapia que incluya el uso de un antagonista de GREM1 puede entonces ser seleccionada o recomendada, y puede entonces ser además administrada al individuo. De manera similar, una terapia que comprende el uso de un antagonista de GREM1 y un agente anti-canceroso adicional puede ser seleccionada basada en la sobreexpresión de GREM1.

En otros casos, un nivel disminuido o normal de GREM1, en comparación con una muestra de referencia o nivel de referencia, indica que el individuo no responderá a la terapia con un antagonista de GREM1. Entonces no se administra un antagonista de GREM1 al individuo. Asimismo, puede seleccionarse o recomendarse para el tratamiento del individuo un tratamiento terapéutico que no sea antagonista de GREM1, y puede además ser administrado después al individuo.

En todos los aspectos de la invención, un individuo que tiene cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal o mieloma múltiple o cáncer de mama) o un individuo que se sospecha que tiene la enfermedad o condición y/o un individuo en riesgo de desarrollar la enfermedad o condición puede ser seleccionado para el tratamiento o identificado. Por ejemplo, el individuo puede no haber sido formalmente diagnosticado pero puede estar bajo sospecha de tener la enfermedad o condición debido a la presencia de uno o más síntomas. El individuo puede ser considerado en riesgo de desarrollar cáncer si tiene uno o más de los factores de riesgo asociados con el cáncer y/o una o más

predisposiciones que aumentan la susceptibilidad al cáncer. Los factores de riesgo en relación al cáncer colorrectal incluyen SNP como se describió con anterioridad y, por ejemplo, en Tomlinson *et al*, PLoS Genet, 2011, analizado con anterioridad, y mutaciones genéticas heredadas tales como mutación o

5 mutaciones en el gen codificador de GREM1, o cualquier otra mutación que afecte a la expresión del gen de GREM1, incluyendo la mutación causante del HMPS.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Expresión, purificación, replegamiento y determinación de estructura de la proteína.

Preparación de cuerpo de inclusión y expresión de proteína

Una secuencia de codificación de Gremlin-1 humana truncada (SEQ ID NO: 20), optimizada para expresión en *E. coli*, fue clonada en un vector modificado pET32a (Merck Millipore) utilizando BamHI/XhoI, generando un

15 vector que codifica la secuencia Gremlin con un marcador 6His-TEV N-terminal (pET-hGremlin1).

Secuencia expresada:

MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKT

20 *QPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFT*
TMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD; SEQ ID NO: 2 (con restos no-Gremlin de la etiqueta 6His-TEV ilustrada en cursiva). Numeración de secuencia basada en UniProt O60565 y SEQ ID NO: 1.

Se utilizó el ADN plasmídico pET-hGremlin1 para transformar las células

25 BL21(DE3). Se seleccionó una única colonia resistente a ampicilina de una placa de agar LB/Amp y se usó para inocular un cultivo de inicio de 100 ml de LB/Amp. Después de agitarlo (200 rpm) durante 16 h a 37 °C, se utilizaron 25 ml del cultivo de inicio para inocular 500 ml de medio 2xTY/Amp. El cultivo fue agitado (250 rpm) a 37 °C hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 3. Posteriormente, el cultivo fue

30 suplementado con 20 ml de una mezcla de alimentación de MOPS + glicerol (MOPS 1 M pH 7,4, glicerol 40 %, MgSO₄ 0,5 %, MgCl₂ 0,42 %), inducido con IPTG 300 µM y adicionalmente incubado a 17 °C, 180 rpm durante 16 horas. Las células fueron recolectadas en una centrifugadora (4.000 g durante 20 minutos a 4 °C).

35 Los sedimentos celulares fueron resuspendidos en un tampón de lisis

(PBS pH 7,4, lisozima 0,35 mg/ml, DNasa 10 µg/ml y MgCl₂ 3 mM) a 4 °C y la fracción insoluble fue recolectada por centrifugación a 3.500 g durante 30 minutos a 4 °C. Los cuerpos de inclusión granulados fueron lavados tres veces por resuspensión en tampón de lavado (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,5 %, pH 8,0), seguido por centrifugación a 21.000 g durante 15 minutos. Se llevaron a cabo dos lavados adicionales utilizando tampón de lavado sin Triton X-100.

Solubilización

Los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos en un tampón desnaturalizante (Urea 8 M, Tris 100 mM, EDTA 1 mM, Na₂S₄O₆ 10 mM y Na₂SO₃ 100 mM, pH 8,5), agitados durante 16 horas a temperatura ambiente y clarificados por centrifugación a 21.000 g durante 15 minutos.

Purificación pre-replegamiento

Los cuerpos de inclusión solubilizados fueron cargados a una columna Sephacryl S-200 26/60 (120 ml) equilibrada en urea 8 M, MES 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, pH 6,0. Las fracciones que contienen proteína Gremlin-1 fueron diluidas con urea 6 M, MES 20 mM, pH 6,0 y cargadas a columnas de intercambio de cationes HiTrap SP HP y eluidas con un gradiente de NaCl 1 M sobre 10 volúmenes de columnas (10 VC). Las fracciones que contienen proteína hGremlin-1 desnaturalizada y purificada fueron agrupadas.

Replegamiento

Se agregó proteína Gremlin-1 purificada desnaturalizada por goteo al tampón de repliegue (Tris 50 mM, pH 8,5, NaCl 150 mM, GSH 5 mM y GSSG 5 mM, cisteína 0,5 mM, EDTA 5 mM, arginina 0,5 M) a una concentración final de 0,1 mg/ml y se incubó a 4 °C con agitación constante durante 5 días. Después de 5 días la proteína Gremlin-1 fue dializada contra HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5.

Después de la diálisis, la proteína se aplicó a la columna de heparina HiTrap y fue eluida utilizando un gradiente de 0-100 % de tampón de elución de heparina (HEPES 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5) sobre 20 VC. Las proteínas correctamente replegadas eluyeron a NaCl 1 M mientras que la proteína replegada de manera incorrecta eluyó a menores concentraciones de sal.

La proteína que eluye a NaCl 1 M fue concentrada y purificada con posterioridad en una columna S75 26/60 equilibrada con Hepes 20 mM pH 7,5, NaCl 1 M.

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

5 Determinación de estructura de Gremlin 1

Los cristales de proteína Gremlin 1 se hicieron crecer utilizando el método de gota suspendida mezclando una solución de Gremlin 1 a 6,6 mg/ml y ácido cítrico 0,1 M a pH 4, cloruro de litio 1 M y 27 % de polietilenglicol (PEG) 6000 en una proporción 1:1. Antes de la recolección de datos, los cristales fueron crio-
 10 protegidos agregando 20 % de glicerol al tampón de cristalización. Los datos de difracción fueron recolectados en la Diamond Light Source y fueron procesados utilizando XDS (Kabsch Wolfgang (2010) Acta Crystallographica Section D 66, 125-132). Las estadísticas de datos de difracción fueron resumidas en la tabla que sigue:

15 Tabla 2: Estadísticas de datos de difracción

Estadísticas de difracción	
Longitud de Onda (Å)	0,97949
Grupo Espacial	C2
Dimensiones celulares	a= 84,55 Å, b=107,22 Å, c=77,09 Å; $\alpha=90,00^\circ$, $\beta=120,43^\circ$, $\gamma=90,00^\circ$
Alcance de Resolución* (Å)	26,19-2,72 (2,79-2,72)
Integridad (%)	98,5 (99,0)
Multiplicidad	3,4 (3,4)
I/sigma	9,6 (2,0)
Rmerge	0,095 (0,622)
Estadísticas de Procesamiento	
Alcance de Resolución (Å)	26,19-2,72
R _{cryst}	0,24
R _{free}	0,29
Enlaces R.m.s.d. (Å)**	0,013
Ángulos R.m.s.d. (°)	1,782

* Los valores entre paréntesis corresponden a la carcasa de máxima resolución.

** r.m.s.d. desviación de la raíz cuadrática media.

La estructura de Gremlin-1 se solucionó con remplazo molecular utilizando Phaser (McCoy *et al*, J Appl. Cryst (2007), 40, 658-674) y un modelo de Gremlin-1 disponible de coordenadas del complejo Gremlin-1/Fab patentadas. El modelo de Gremlin-1 resultante contiene cuatro copias de monómero Gremlin-1 organizado como dos dímeros. Se realizaron correcciones a los modelos con Coot (Emsley *et al* Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66 (4), 486-501) y las coordenadas fueron refinadas 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 fueron validadas con Molprobity (Chen *et al*. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica D66:12-21). Un resumen de las estadísticas del refinamiento del modelo se ilustra en la Tabla 2 que antecede. Los datos estructurales completos para cristalografía de Gremlin-1 se proporcionan en la Tabla 1 (Figura 1) del documento PCT/EP2017/083650 presentada el 19 de diciembre de 2017, incorporada a la presente por referencia.

Ejemplo 2 – Residuos vinculantes de BMP en Gremlin-1

Como se analizó con anterioridad, Gremlin-1 pertenece a la familia de proteína antagonista de proteína morfogénica ósea (BMP) dentro del subgrupo conocido como familia DAN. Dentro de la familia DAN, Gremlin-1 comparte la mayor homogeneidad con Gremlin-2 (PRDC).

La estructura de Gremlin-1 humano de 2,7 Å resuelta en el Ejemplo 1, comparte varias características en común con la estructura de Gremlin-2 de ratón publicada (Nolan *et al* (2013), Structure, 21, 1417-1429). El pliegue general es muy similar, con dos copias de Gremlin-1 formando un dímero no covalente antiparalelo, dispuesto en un arco. Cada monómero adopta la disposición característica dedo-muñeca-dedo con un motivo de nódulos de cistina hacia el extremo de la muñeca, opuesto a los dedos. La identidad de secuencia entre las proteínas es 52 % en aumento hasta 67 % dentro de la secuencia visible en las dos estructuras. La región de mayor conservación se sitúa en la extensa interfaz de dímero en donde todos los restos de contacto claves son 100 % conservados.

Los restos involucrados en BMP 2, 4 y 7 que se unen al Gremlin-2 (PRDC) y DAN (NBL1) de ratón han sido identificados 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 pronosticado abarca un tramo hidrófobo que

se extiende a lo largo de ambos monómeros en la superficie convexa del dímero. Se identificaron seis restos por mutagénesis; Trp72, Phe96, Tyr98, Phe104, Tyr105 y Phe117 y son 100 % conservados en Gremlin-1 humano (numeración basada en la secuencia de Gremlin-2 de ratón). El grado de homología se
 5 extiende al posicionamiento de las cadenas laterales que adoptan una conformación idéntica en ambas proteínas.

La numeración de aminoácidos utilizada en el archivo PDB Gremlin se empareja con la numeración en la estructura de Gremlin-2 de ratón publicada basada en una alineación estructural. Esto permite comparaciones en períodos
 10 iguales para aminoácidos cuando describen las estructuras. Sin embargo, para mayor claridad, los restos clave identificados como participantes en la unión a BMP se ilustran a continuación con la numeración basada en el archivo PDB y archivo UniProt de SEQ ID NO: 1 entre paréntesis:

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

15 En ambos Gremlin-2 de ratón y Gremlin-1 humano, el epítipo de unión a BMP hidrófobo está parcialmente enterrado por una hélice alfa formada por los restos N-terminales de cada proteína. Se ha propuesto un modelo de unión a BMP en donde el extremo N terminal puede flexionarse, exponiendo la interfaz de unión a BMP completa (Nolan *et al* (2013), Structure, 21, 1417-1429). En el
 20 presente análisis, los restos N-terminales fueron eliminados de las estructuras Gremlin-1 humano y Gremlin-2 de ratón antes de representar una superficie para revelar la similitud de las faces de unión en cada proteína.

La literatura sólo describe mutagénesis de seis restos que tienen un efecto en la unión a BMP. Es posible que el epítipo de BMP real cubra un área de
 25 superficie mayor, abarcando aminoácidos cercanos. Al resaltar todos los restos, a una distancia de 6 Å de aquellos mutados, en la superficie de Gremlin-1, se revela una mayor región de Gremlin-1 que puede ser potencialmente diana de un producto terapéutico. Esta región más extensa abarca los siguientes aminoácidos de Gremlin-1 humano:

30 Asp92-Leu99

Arg116-His130

Ser137-Ser142

Cys176-Cys178

(Numeración basada en SEQ ID NO: 1)

35 Al combinar la información publicada con la información de estructura de

cristal de Gremlin-1 humano, se han identificado las regiones de Gremlin-1 humano que se ofrecen como una potencial ruta para intervención terapéutica bloqueando su interacción con BMP.

Ejemplo 3 – Ensayo de gen indicador Hek Id1

5 **Antecedentes**

El ensayo de gen indicador Hek Id1 utiliza células indicadoras Clon 12 Hek293-Id1. Esta línea celular fue establemente transferida con factor de transcripción Id1. Id1 es un factor de transcripción en la vía de señalización de BMP. Gremlin es conocido por unirse a BMP, lo que evita su unión a sus
10 receptores reduciendo la señal luciferasa del gen indicador. Por lo tanto, utilizando este ensayo indicador, es posible examinar los anticuerpos anti-Gremlin y ver si hay alguno que bloquee la interacción de Gremlin con BMP. Si hay un bloqueo de esta interacción, se ve una restauración de la señal luciferasa.

Método

15 Las células Clon 12 fueron cultivadas en DMEM que contiene FCS 10 %, 1x L-glutamina y 1x NEAA. Las células fueron también desarrolladas en presencia de Higromicina B (200 µg/ml) para asegurar que las células no pierdan la expresión del gen Id1. Las células fueron evaluadas en DMEM que contiene FCS 0,5 %, 1x L-glutamina y 1x NEAA. La higromicina B no es necesaria para el
20 corto plazo que las células se encuentran en el ensayo.

Las células fueron lavadas en PBS, despegadas usando un tampón de disociación celular, centrifugadas y contadas antes de ser dispersadas a 5×10^4 /pocillo en 70 µl (Densidad de $7,14 \times 10^5$ /ml). Las placas utilizadas eran de 96 pocillos blancos, opacos recubiertas con Poli-D-Lisina estériles. Las células
25 van a incubadora durante aproximadamente 3-4 horas para asentarse. Los heterodímeros de BMP fueron reconstituidos a 200 µg/ml en HCL 4 mM. BMP fue diluido a 10 µg/ml en medio de ensayo utilizando un vial de vidrio para proporcionar nuevas soluciones madre.

En una placa de polipropileno, se diluyó Gremlin-1 1:2 para una curva de
30 la dosis-respuesta de 8 puntos con una dosis final máxima de 1 µg/ml.

Se agregó un volumen adicional de medios de 20 µl por pocillo y las placas fueron incubadas a 37 °C durante 45 minutos.

El BMP preparado a 100x fue agregado a todos los pocillos excepto los pocillos que contienen sólo células. Todos los pocillos son compensados hasta
35 60 µl con un medio de ensayo e incubados durante otros 45 minutos a 37 °C.

Después de la incubación, 30 µl de la muestra fueron transferidos por pocillo de placa de ensayo e incubados durante 20 – 24 horas antes de medir la señal de luminiscencia.

5 Steady Glo celular fue descongelado con anterioridad a temperatura ambiente. Las placas de ensayo fueron enfriadas a temperatura ambiente durante aproximadamente 10-15 minutos antes de agregar el reactivo. La señal luciferasa fue detectada por adición del reactivo steady glo celular (100 µl) durante 20 minutos en un agitador a temperatura ambiente y se midió la luminiscencia usando el protocolo Cell Titer Glo en Synergy 2

10 La señal máxima fue generada desde pocillos que contienen BMP y la señal mínima fue generada de los pocillos que contienen solo células.

Resultados

15 Las formas de extensión completa y truncada de Grem-1 fueron evaluadas en el ensayo de gen indicador Hek-Id1 para confirmar la actividad de bloqueo contra BMP4/7.

El porcentaje de inhibición de los ensayos de respuesta a la dosis se calculó basado en las señales máximas y mínimas en el ensayo y los datos se adaptaron utilizando un ajuste logístico de 4 parámetros. La CI_{50} se calculó basada en el punto de inflexión de la curva.

20 Tabla 3: Resultados de potencia para Gremlin-1 de extensión completa y Gremlin-1 truncado en el ensayo de gen indicador Hek-Id1.

Ensayo de gen indicador Hek-Id1	N	Promedio Geométrico (nM)	IC 95 % (o intervalo donde N=<4)
Gremlin 1 Extensión completa	2	1,6	1,3-1,9
Gremlin 1 truncado	2	1,7	1,1-2,5

Conclusión

25 Gremlin 1 fue capaz de inhibir la señalización de BMP 4/7 en el ensayo de gen indicador Hek-Id1.

Ejemplo 4 – Producción de anticuerpos anti-Gremlin-1

Los anticuerpos anti-Gremlin-1 fueron obtenidos por inmunización

utilizando Gremlin-1 como se describe en el Ejemplo 1, y por selección de genoteca. La genoteca fue generada internamente como una genoteca humana sin tratamiento previo con las regiones V amplificadas de donaciones de sangre.

La inmunización produjo 26 anticuerpos diferentes que se unen a Gremlin-1 de la primera ronda de inmunización. Estos anticuerpos fueron ampliados y purificados para evaluación en pruebas de cribado.

Se seleccionaron 25 anticuerpos de reacción cruzada humanos y de ratones utilizando Gremlin humano recombinante de R&D Systems. Se seleccionaron 10 anticuerpos para ampliar y purificar como scFvs para evaluación en pruebas de cribado.

Ejemplo 5 – Cribado de anticuerpos anti-Gremlin-1

Los anticuerpos fueron cribados utilizando el ensayo de gen indicador Hek-Id1 descrito en el Ejemplo 3 y por mediciones de fosforilación de SMAD. SMAD1, 5 y 8 son fosforilados tras señalización de BMP. Por lo tanto los inhibidores de Gremlin-1 aumentan la fosforilación de SMAD.

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

Resultados

En el ensayo de gen indicador Hek-Id1, no hay aciertos aparentes con los anticuerpos derivados de inmunización (con un exceso de 10 veces de anticuerpo examinado contra un heterodímero BMP4/7). Los resultados se muestran en la Figura 1.

En contraste, un número de anticuerpos derivados de genoteca fueron capaces de restaurar la señal en el ensayo de gen indicador Hek-Id1 (50 veces en exceso de anticuerpos con un 50 % de dosis de gremlin) (Figura 2). De ellos, Ab2416 y Ab2417 contienen altos niveles de endotoxina. Ab7326 mantiene la capacidad de bloqueo a un exceso de 10 veces y 80 % de concentración de Gremlin-1 de inhibición.

Se presentan resultados adicionales en las Figuras 3A (gremlin humano) y 3B (Gremlin de ratón). Estas Figuras muestran titulaciones de Ab7326 (marcadas como PB376) hasta 15 nM. Se mostró que Ab7326 restaura la señal de BMP cuando es bloqueada por ya sea humano (CI₅₀ de 1,3 nM) o de ratón (CI₅₀ de Gremlin 0,2 nM). El anticuerpo funciona como IgG1 tanto humano como de ratón.

Las secuencias del IgG1 de extensión completa de ratón y humano se presentan a continuación. Para sintetizar las proteínas IgG1 de extensión completa humana y de ratón, las regiones variables de Ab7326 derivadas de la genoteca fueron re-clonadas en vectores que comprenden los dominios
5 constantes de anticuerpos apropiados.

Como Ab7326 viene de una genoteca humana sin tratamiento previo, en donde los Abs son clonados como scFvs, para re-clonar las regiones variables de 7326 como Abs o Fabs de extensión completa, resultó necesario amplificar por PCR los VH y VK utilizando grupos de cebadores/cebadores redundantes.
10 Los productos de PCR amplificados fueron entonces asimilados y clonados de manera simultánea en vectores humanos y de ratón. Como los VH y VK fueron amplificados por grupos de cebadores/cebadores redundantes, se obtuvieron dos formas variantes de los productos, difiriendo por un único resto de aminoácido derivado de cebadores sutilmente diferentes reconocidos durante el
15 proceso de PCR.

Las dos formas variantes de regiones variables de cadena pesada difieren por un único aminoácido en la posición 6, y las dos formas variantes de la región variable de cadena ligera difieren por un único aminoácido en la posición 7, como se ilustra a continuación:

- 20 • La región variable de cadena pesada variante 1 tiene ácido glutámico (E) en la posición 6.
- La región variable de la cadena pesada variante 2 tiene glutamina (Q) en la posición 6.
- La región variable de cadena ligera variante 1 tiene serina (S) en la posición
25 7.
- La región variable de cadena ligera variante 2 tiene treonina (T) en la posición 7.

IgG1 de extensión completa de ratón - cadena pesada variante 1 (SEQ ID NO: 14)

30	QVQLVESGAE	VKKPGATVKI	SCKVSGYTFT	DYYMH WVQQA	PGKGLEWMGL
	VDPEDGETIY	AEKFQ GRVTI	TADTSTD TAY	MELSSLRSED	TAVYYCAT DA
	RGSGSYYPNH	FDY WGQGLV	TVSSAKTTPP	SVYPLAPGSA	AQTNSMVTLG
	<u>CLVKGYFPEP</u>	<u>VTVTWNSGSL</u>	<u>SSGVHTFPAV</u>	<u>LQSDLYTLSS</u>	<u>SVTVPSSTWP</u>
	<u>SETVTCNVAH</u>	<u>PASSTKVDKK</u>	<u>IVPRDCGCKP</u>	<u>CICTVPEVSS</u>	<u>VFIFFPKPKD</u>
35	<u>VLTIITLTPKV</u>	<u>TCVVVDISKD</u>	<u>DPEVQFSWFV</u>	<u>DDDEVHTAQT</u>	<u>QPREEQFNST</u>

FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISK T KGRPKAPQVY
 TIPPPEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQP AE NYKNTQPIMD
 TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHT EK SLSHSPGK

IgG1 de extensión completa de ratón – cadena ligera variante 1 (SEQ ID

5 NO: 15)

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCK**KSSQSVL** **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP
 KLLIY**WASTR** **ES**GVDPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**
PTFGQGTRLE IKRTDAAPT V SIFPPSSEQL TSGGASV VCF LNNFY PKDIN
 VKWKIDG SER QNGVLNSWTD QDSK DSTYS M SSTLT LTKDE YERHNSYTCE

10 ATHKTSTSPI VKSFNRNEC

IgG1 de extensión completa de ratón – cadena pesada variante 2 (SEQ ID NO: 28)

QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VPEDGETIY **AEKFQ**GRVTI TADTSTD TAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**
 15 **RGSGSYYPNH** **FDY**WGQGT LV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVT LG
 CLVKGYFPEP VTVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP
 SETVTCNVAH PASSTKVDKK IVP RDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD
 VLTITLTPKV TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFNST
 FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISK T KGRPKAPQVY
 20 TIPPPEQMA KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQP AE NYKNTQPIMD
TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHT EK SLSHSPGK

IgG1 de extensión completa de ratón – cadena ligera variante 2 (SEQ ID NO: 29)

DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCK**KSSQSVL** **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP
 25 KLLIY**WASTR** **ES**GVDPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**
PTFGQGTRLE IKRTDAAPT V SIFPPSSEQL TSGGASV VCF LNNFY PKDIN
 VKWKIDG SER QNGVLNSWTD QDSK DSTYS M SSTLT LTKDE YERHNSYTCE
ATHKTSTSPI VKSFNRNEC

IgG1 de extensión completa humano – cadena pesada variante 1 (SEQ ID NO: 30)

QVQLVESGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VPEDGETIY **AEKFQ**GRVTI TADTSTD TAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**
RGSGSYYPNH **FDY**WGQGT LV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAA LG
 CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSL S SVTVPSSSL
 35 GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF

PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL

5 SPGK

IgG1 de extensión completa humano – cadena ligera variante 1 (SEQ ID NO: 31)

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR **ES**GVDPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**
10 **PT**FGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

IgG1 de extensión completa humano – cadena pesada variante 2 (SEQ ID NO: 16)

15 QVQLVQSGAE VKKPGATVKI SCKVSGYTFT **DYYMH**WVQQA PGKGLEWMGL
VPEDGETIY **AEKFQ**GRVTI TADTSTDYAY MELSSLRSED TAVYYCAT**DA**
RGSGSYYPNH **FDY**WGQGLV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF
20 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SPGK

25 IgG1 de extensión completa humano – cadena ligera variante 2 (SEQ ID NO: 17)

DIVMTQTPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL **YSSNNKNYLA** WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR **ES**GVDPDRFSG SGSGTDFTLT INSLQAEDVA VYFC**QQYYDT**
PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
30 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

Las CDR de anticuerpos fueron determinadas utilizando el método Kabat (resaltado en negrita en las secuencias anteriores). Los restos adicionales de HCDR1 usando la definición Chothia están en negrita. Las secuencias de región constante están subrayadas.

35

La restauración de la señalización de p-SMAD con anticuerpos anti-Gremlin 1 se muestra en la Tabla 4 que sigue.

Tabla 4: Restauración de señalización de p-SMAD

	2417	2418	2419	2481	2482	2483	2484	7326	8427
BMP 2 50 ng/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 %

5 Los resultados se muestran como un porcentaje de fosforilación de SMAD por BMP solo (BMP control). Los experimentos se llevaron a cabo usando fibroblastos de pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. rhGremlin-1 y los anticuerpos anti-Gremlin-1 fueron preincubados durante 45 minutos a temperatura ambiente. rhGremlin-1 y los anticuerpos anti-Gremlin-1 fueron
10 entonces agregados con BMP a las células durante 30 minutos.

La Tabla 5 muestra entonces más resultados en el ensayo de fosforilación de SMAD, en donde el desplazamiento de BMP-2 o BMP4/7 de los complejos Gremlin 1-BMP por anticuerpos anti-Gremlin-1 fue investigado. Los experimentos fueron nuevamente realizados utilizando fibroblastos pulmonares
15 de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. rhBMP-2 o rhBMP 4/7 fueron preincubados con rhGremlin-1 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos BMP-2 o BMP4/7-Gremlin-1 fueron incubados con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-Gremlin-1 durante toda la noche a 4 °C. Las concentraciones de anticuerpos representan la concentración final en la placa.

20 **Tabla 5:** Desplazamiento de BMP-2 o BMP4/7 de los complejos Gremlin 1-BMP

por anticuerpos anti-Gremlin-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 50 ng/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 50 ng/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 Ab7326 puede desplazar BMP-2 o BMP4/7 ya en complejo de complejos Gremlin 1-BMP.

- 5 Ab7326 puede lograr este desplazamiento a concentraciones mucho menores que el anticuerpo comparativo 2484. Esto da testimonio de que Ab7326 es un inhibidor alostérico, consistente con nuestros descubrimientos de que el sitio de unión para Ab7326 es distal de las regiones de unión a BMP conocidas en Gremlin-1. De este modo, Ab7326 es capaz de acceder al sitio de unión
- 10 alostérica incluso cuando BMP forma un complejo con gremlin-1, resultando en una inhibición mejorada significativamente de la actividad gremlin.

Ejemplo 6 – Obtención de la estructura de cristal de Gremlin-1 en complejo con el Fab 7326

- 15 La estructura de cristal de Gremlin-1 humano en complejo con Fab Ab7326 fue solucionada en una resolución de 2,1 Å. Las secuencias Fab se ilustran a continuación.

Cadena pesada: SEQ ID NO: 18

20 QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETI
YAEKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Cadena ligera: SEQ ID NO: 19

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRTRLEIKRTVAAP

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Se usó entonces el software CCP4 NCONT para identificar todos los contactos a 4 Å entre Gremlin-1 y el Fab. Se identificaron los siguientes restos:

5 Ile131, Lys147, Lys148, Phe149, Thr150, Thr151, Arg169, Lys174 y Gln175 (numeración basada en la Secuencia UniProt de SEQ ID NO: 1 (enumerada como Ile110, Lys126, Lys127, Phe128, Thr129, Thr130, Arg148, Lys153 y Gln154 en el archivo de estructura que se empareja con la numeración del Gremlin-2 de ratón).

10 La Figura 4 muestra modelos estructurales del complejo Gremlin-Fab, con los restos de epítipo Fab ilustrados de manera relativa a las regiones de unión a BMP.

Ab7326 es un anticuerpo inhibidor que actúa de manera alostérica, esto es, se une fuera de las regiones de unión a BMP.

15 **Ejemplo 7 – Mediciones de afinidad para unión de anticuerpo anti-Gremlin-1 AB7326 a Gremlin-1**

Método

La afinidad de mIgG anti-Gremlin para Gremlin 1 humano fue determinada por análisis de interacción biomolecular utilizando tecnología de resonancia

20 plasmónica de superficie (SPR) en un sistema de Biacore T200, GE Healthcare Bio-Sciences AB. mIgG anti-Gremlin fue capturado por una superficie anti- Fc de ratón inmovilizada y Gremlin 1 fue titulado sobre el mIgG capturado. El ligando de captura (fragmento AffiniPure F(ab')₂ de IgG de cabra anti-ratón, fragmento específico Fc, 115-006-071, Jackson ImmunoResearch Inc.) fue inmovilizado a

25 50 µg/ml en NaAc 10 mM, pH 5,0 en celda de flujo 2 de un Chip Sensor CM4 a través de química de acoplamiento de amina, utilizando inyecciones de activación y desactivación de 600 s, a un nivel de ~1600 unidades de respuesta (UR). HBS-EP+ tampón (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 0,05 %) se utilizó como tampón de ejecución con una velocidad

30 de flujo de 10 µl/min. Se preparó una superficie de referencia en celda de flujo 1 por activación y desactivación de la superficie en cuanto a la celda de flujo 2 pero omitiendo el ligando de captura.

El tampón de ensayo era HBS-EP+ más un extra NaCl 150 mM para dar una concentración de NaCl final de 300 mM más CMD40 1 %. Una inyección de

35 mIgG anti-Gremlin de 60 s (a 5 µg/ml en tampón de ejecución) se pasó sobre las

celdas de flujo 1 y 2 para dar un nivel de captura de aproximadamente 100 UR en la superficie Fc, anti- IgG de ratón inmovilizada. El Gremlin 1 humano recombinante fue titulado en tampón de ejecución de 5 nM (utilizando diluciones dobles) e inyectado sobre las celdas de flujo 1 y 2 a una velocidad de flujo de 30 μ l/min durante 3 minutos seguido de una fase de disociación de 5 min. También se incluyó un tampón solo para control. La superficie fue regenerada a una velocidad de flujo de 10 μ l/min por inyección de 60 s de HCl 50 mM, una inyección de 30 s de NaOH 5 mM y una inyección de 30 s de HCl 50 mM.

Los datos cinéticos fueron determinados utilizando un software de evaluación Biacore T200. Las mediciones de afinidad se llevaron a cabo a 25 °C.

Resultados

Se encontró que la afinidad de unión, tomada como el valor promedio K_D para 5 determinaciones, era por debajo de 100 pM.

Ejemplo 8 – Cultivo de organoide de ratón inhibido por anticuerpo anti-

Grem 1

Materiales y Métodos

Procedimientos en ratón. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de conformidad con las regulaciones del Ministerio del Interior del Reino Unido y la Animals (Specific Procedures) Act 1986 (Ley de Procedimientos Específicos en Animales 1986). Todos los ratones fueron alojados en la unidad animal en Functional Genomics Facility, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Universidad de Oxford. Todas las cepas utilizadas en este estudio fueron mantenidas en fondo de C57B1/6J durante ≥ 6 generaciones. Los protocolos de genotipado para los ratones *Apc^{Min}* (1) y *Vil1-Grem1* (2), *Apc^{fl/fl}* (3) y VillinCreERT2 (4) han sido previamente indicados. Para generar los datos Kaplan-Meier, los ratones fueron sacrificados cuando alcanzaron parámetros incruentos (exhibieron anemia, encorvadura e inactividad). El anticuerpo anti-Grem1 (IgG1 de ratón UCB Ab7326, como también se usó en todos los experimentos con ratones posteriores) o anticuerpo Ab101.4 de control IgG1 de ratón (UCB) fueron administrados a una dosis de 10 mg/kg o 30 mg/kg de inyecciones subcutáneas semanal o quincenalmente. Para cohortes de tratamiento a largo plazo, se entregó una dosis de 30 mg/kg semanalmente en ratones Vil1-Grem1 y *Apc^{Min}* desde las 6 semanas de edad y el tratamiento de cohorte Vil-Grem1/ *Apc^{Min}* comenzó a las 3 semanas de edad, dos veces por semana durante 6 semanas, y luego una vez por semana.

Histología y preparación de tejido. Los ratones fueron sacrificados en intervalos de tiempo predeterminados o cuando mostraron síntomas de pólipos intestinales (anemia, encorvadura) por luxación cervical. El tracto intestinal fue extraído de manera inmediata y dividido en intestino delgado (proximal/SB1, medio/SB2 y distal/SB3) e intestino grueso. Los intestinos fueron abiertos de manera longitudinal, utilizando un aparato de preparación del intestino (5), lavados en PBS, fijados durante toda la noche en 10 % de formol neutro (NBF). Para visualizar los pólipos, las preparaciones de intestinos fueron teñidas con 0,2 % de azul de metileno durante 10 s y visualizadas con la ayuda de una caja de luz. Las muestras de tejido fijado en formol 10 % fueron embebidos en parafina y luego seccionados a 4 μ m. Las muestras fijadas fueron embebidas y teñidas con H&E siguiendo los protocolos convencionales.

Inmunohistoquímica. Las secciones de tejido embebidas en parafina y fijadas en formol (4 μ m) fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas a través de alcoholes graduados a agua. La peroxidasa endógena fue bloqueada utilizando H_2O_2 1,6 % durante 20 min. Para la recuperación del antígeno, las secciones fueron cocidas a presión en 10 mmol/l de tampón de citrato (pH 6,0) durante 5 min. Las secciones fueron bloqueadas con 10 % de suero durante 30 min. Los portaobjetos fueron incubados con anticuerpo primario durante 2 h. Los siguientes anticuerpos han sido utilizados en este estudio; citoqueratina 20 (Abcam, ab118574, 1:200), EphB2 (R and D, AF467, 1:125), Ki67 (CST, 122025, 1:500), lisozima (DAKO, EC 3.2.1.17, 1:500) y Sox9 (Millipore, ab5535, 1:1000). Se aplicaron los anticuerpos secundarios apropiados durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones fueron entonces incubadas en ABC (Vector labs) durante 30 min. La solución DAB fue aplicada durante 2-5 min y el desarrollo de la reacción de color fue supervisada microscópicamente. Los portaobjetos fueron contrateñidos con hematoxilina, deshidratados, limpiados y después montados.

Hibridación *in situ* (ISH). Se prepararon secciones de 4 μ m utilizando H_2O tratado con DEPC (Sigma). La hibridación *in situ* se llevó a cabo utilizando sonda Grem1 (314741) (Advanced Cell Diagnostics) y el kit de detección HD RNAscope 2.5 (Advanced Cell Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cultivo de criptas intestinales de ratón. Las criptas intestinales de ratón fueron aisladas y cultivadas como se describe en Sato *et al* (6). En resumen, las criptas fueron aisladas, resuspendidas en Matrigel (BD Biosciences) y colocadas

en placas de cultivo en placas de 24 pocillos. El medio basal para cultivo (medio Eagle modificado por Dulbecco avanzado/F12 complementado con penicilina/estreptomicina, HEPES 10 mmol/l, Glutamax, 1x N2, 1x B27 (todos de Invitrogen) y N-acetilcisteína 1 mmol/l (Sigma)) se superpuso comprendiendo los
 5 siguientes factores de crecimiento; Factor de Crecimiento Epidérmico a 50 ng/ml (Life Technologies), Gremlin1 a 100 ng/ml (R and D), R-spondin1 a 500 ng/ml (R and D) [medio EGR]. El anticuerpo anti-Grem1 (UCB) fue usado en una concentración de 1 mg/ml. El medio fue cambiado cada dos días.

Transferencia de Western: El aislamiento de células epiteliales del colon se llevó a cabo por incubación de una pieza de tejido de 2 cm de largo con EDTA 30 nM durante 2 h con agitación a 4 °C. Las células epiteliales granuladas fueron lisadas con tampón de lisis RIPA con el agregado de inhibidores de proteasa (Complete Mini, Roche) e inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP, Roche). Todos los lisados fueron cuantificados usando el ensayo BCA (Thermo Scientific), se
 10 diluyeron 35 mg en una cantidad apropiada de 4x de carga de colorante (Invitrogen) y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos. Se llevó a cabo transferencia de Western con el sistema NuPAGE Gel, (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, los lisados desnaturalizados fueron cargados en un gel 4-12 % y ejecutados a 100 V durante al menos 2 horas. Los
 15 geles fueron transferidos a membrana PVDF (Immobilon P. Millipore) en un depósito semiseco (120 mA durante al menos 2 horas) y bloqueados por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en TBS que contiene 10 % de leche (Marvel). Las membranas fueron entonces incubadas durante toda la noche en el anticuerpo primario apropiado en TBS con 5 % de leche, pSmad1/5/8
 20 (Cell Signalling, 9516S, 1:500), Actina (Santa Cruz, sc-47778, 1:2500). Después del lavado, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios de conjugados con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de posteriores lavados, las membranas de transferencia fueron incubadas en reactivos ECL (GE healthcare) y se detectó quimioluminiscencia por películas de quimioluminiscencia (GE Healthcare).
 30

Descripción de los Resultados (ver también la Figura 5)

Un cultivo de organoide de ratón fue utilizado para evaluar las consecuencias de un anticuerpo anti-GREM1. El cultivo de organoide epitelial intestinal exitoso depende de los medios de suplementación de antagonistas de
 35 BMP exógenos. Pueden utilizarse Gremlin1 y nogina recombinante de forma

intercambiable para estos fines, y el cultivo de criptas intestinales en la ausencia de una de estas proteínas no procede pasado el día 4 del cultivo.

Aproximadamente el 60 % de las criptas formaron organoides en medios completamente suplementados con factor de crecimiento epidérmico recombinante (E), Grem1 (G) y R-Spondin1, (R) (medio EGR). La tasa de éxito del cultivo bajó a menos del 2 % a 7 días en medio que carece de Grem1 recombinante (medio ER).

El agregado de 1 mg/ml de anticuerpo anti-Grem1 a un medio completamente suplementado de otra manera (EGR+anticuerpo) evitó el cultivo de organoide intestinal exitoso, compatible con una derogación de los efectos antagónicos de BMP del Grem1 en medio completamente suplementado. Estos resultados fueron indistinguibles del medio sin Grem1 (ER).

Ejemplo 9 – El tratamiento con anticuerpo anti-Grem1 parcialmente restablece la señalización intestinal pSMAD1.5 en animales Vil1-Grem1 tratados (ver también la Figura 6)

La actividad epitelial de BMP puede ser medida por fosforilación de los transductores de señalización intracelular SMAD 1.5.8.

En animales Vil1-Grem1, la expresión epitelial anormal de Grem1 comienza la poliposis a través de la promoción de un fenotipo de células madre/progenitoras anormal en células situadas fuera de la base de cripta colónica. Los ratones Vil1-Grem1 desarrollan una poliposis pan intestinal profunda desde aproximadamente las 8 semanas de edad, caracterizada por la formación de cripta ectópica vellosa, proliferación celular anormal e iniciación de displasia vellosa.

La expresión de Grem1 epitelial anormal en ratones Vil1-Grem1 reprime la actividad de la vía BMP intestinal fisiológica con reducción en los niveles de proteína pSMAD1.5 detectada, detectada por transferencia de Western.

La administración de anticuerpo anti-Grem1 subcutánea semanal a una dosis de 30 mg/kg pero no a una dosis inferior de 10 mg/kg, fue capaz de restablecer la señalización pSMAD1.5 epitelial intestinal en el epitelio intestinal Vil1-Grem1. Lo que indica el antagonismo funcional de Grem1.

Ejemplo 10. El tratamiento con anticuerpo Anti-Grem1 detiene el fenotipo de poliposis pan-intestinal Vil1-Grem1 y restablece la determinación del destino celular normal (ver Figuras 7 y 30)

La administración subcutánea, dos veces por semana, del anticuerpo anti-

Grem1 (30 mg/kg) durante un período de 6 semanas a los ratones Vil1-Grem1 también resultó en una anulación dependiente de la dosis y altamente significativa de este fenotipo de poliposis pan-intestinal, junto a una casi normalización terapéutica de la arquitectura cripto-vellosa intestinal anormal que caracteriza este modelo de animal.

La tinción inmunohistoquímica de los animales tratados evidenció la revocación de la formación de cripta ectópica vellosa y trastornó la determinación del destino celular que caracteriza el tejido no tratado. (Figuras 7 y 30)

Ejemplo 11 – El tratamiento prolongado con un anticuerpo anti-Grem1 en modelos de animales con poliposis iniciada por Grem1 es seguro y prolonga de manera significativa la longevidad del animal (ver Figuras 8 y 31)

Los animales se trataron dos veces a la semana (*Vil1-Grem1; Apc^{Min}*) o semanalmente (*Vil1-Grem1*) con anticuerpo subcutáneo anti-Grem1 a una dosis de 30 mg/kg, iniciada a 3 (*Vil1-Grem1; Apc^{Min}*) o 6 semanas de edad (*Vil1-Grem1*).

La dosificación prolongada de anticuerpo anti-Grem1 en modelos de tumorigénesis iniciada por Grem1 ralentizó la formación de pólipos, reduce la carga tumoral y prolonga de manera significativa la longevidad animal en animales *Vil1-Grem1*. Este efecto de detención tumoral fue consistente a lo largo de las sesiones iniciadas por expresión de Grem1 epitelial anormal, incluso en la cepa *Vil1-Grem1; Apc^{Min}* agresivo, en donde el tratamiento con anticuerpo más que duplica la longevidad del animal (VG-min longevidad promedio 46 días contra VG-min tratada longevidad promedio 108 días, $p = 2,21 \times 10^{-6}$).

No se han observado efectos adversos consistentes hasta la fecha en animales tratados durante más de 400 días.

Ejemplo 12 - Regulación a la baja farmacológica de Grem1 atenúa la tumorigénesis impulsada por Apc mutante en ratones *Apc^{Min}* (ver Figuras 9 y 32)

El efecto del antagonismo de GREM1 también fue investigado en un modelo de ratón de cáncer esporádico, provocado por inactivación epitelial de Apc. Intercomunicación de señalización epitelial-mesenquimal significa que las células estromales reaccionan a la inactivación epitelial aguda de Apc, con rápida regulación al alza de Grem1 de la capa muscular de la mucosa intestinal y propia que ocurre solo 5 días después de la inactivación de células epiteliales de Apc

en ratones Villin-CreERT2;Apcfl/fl (figura 9A).

El tratamiento a largo plazo con anticuerpo anti-Grem1 iniciado a las 6 semanas de edad tiene un efecto consistente en el desarrollo de pólipo de ratón *Apc^{Min}*, permitiendo supervivencia prolongada de animales a través de la carga tumoral reducida. Este trabajo indica que la regulación al alza de Grem1 puede exacerbar la tumorigénesis impulsada por Apc mutante y que la terapia anti-Grem1 puede ser útil para el tratamiento de tumorigénesis no iniciada por Grem1.

Ejemplo 13 – Grem1 está sobreexpresado en el microentorno de médula ósea de mieloma y puede ser dirigido a reducir el crecimiento del mieloma.

Este estudio demuestra por primera vez que el Grem1 participa en la progresión de la enfermedad de mieloma múltiple (MM). El análisis de las células estromales derivadas de biopsia por trépano de médula ósea (MO) del paciente demuestra un incremento significativo en la expresión de Grem1 del microentorno de MO durante MM. Asimismo, los datos presentados en la presente muestran que los niveles incrementados de Grem1 estimulan la proliferación de CP de MM, y que Grem1 puede ser dirigido para reducir de manera significativa la carga tumoral MM en un modelo de ratón preclínico de MM. Esto representa la primera evidencia de que Grem1 participa en la progresión de la enfermedad MM, y como tal representa una diana terapéutica para el tratamiento de MM.

Métodos

Cultivo de Líneas Celulares de Mieloma: A menos que se establezca lo contrario, todos los medios de cultivo de tejidos contienen 10 % (v/v) de FCS y aditivos (L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 15 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 µg/ml; todos de Sigma-Aldrich, Sídney, Australia). Las células 5TGM1 MM fueron mantenidas en medio de Eagle modificado por Iscove suplementado con 20 % (v/v) de FCS y aditivos. Hemos modificado previamente las células 5TGM1 (Dallas *et al.*, 1999) con un constructo retroviral trimodal NES-TGL (Diamond *et al.*, 2009; Ponomarev *et al.* (2004) codificando timidina-cinasa, proteína verde fluorescente (GFP) y luciferina de luciérnaga (Noll *et al.*, 2014), y se estableció una nueva sublínea clonal que exhibe tropismo óseo consistente (Noll *et al.*, 2014; (Noll *et al.*, 2015). Las células estromales de médula ósea OP9 se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con 10 % (v/v) de FCS y aditivos. Los co-cultivos de células 5TGM1 y células OP9 se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Iscove suplementado con 20 % (v/v) de FCS

y aditivos. Las líneas celulares humanas MM RPMI-8226, U266, KMS-11 y H929 fueron todas cultivadas en medio RPMO-1640 (Cheong *et al.*, 2015). Todas las líneas celulares se mantuvieron en un ambiente humidificado a 37 °C con 5 % de dióxido de carbono.

5 **Aislación de ARN de estroma de MO murino:** Los ratones C57BL6/KaLwRij.Hsd fueron inyectados con 5×10^5 CP MM 5TGM1.Bmx1, y el crecimiento tumoral fue establecido durante 4 semanas (como se describió con anterioridad), (Noll *et al.*, 2014; Hewett *et al.*, 2017). En resumen, las células 5TGM1 fueron resuspendidas a 5×10^6 células por ml en solución salina
10 tamponada con fosfato (PBS), y luego 5×10^5 células fueron inyectadas en la vena caudal de ratones C57BL/KaLwRij de 6 a 8 semanas de edad. El crecimiento de tumores fue supervisado por diagnóstico por imágenes por bioluminiscencia (BLI) del animal completo utilizando un sistema de diagnóstico por imágenes Xenogen IVIS 100 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, EE.UU.))
15 después de inyección intraperitoneal (i.p.) de 150 mg/kg de D-Luciferina (Biosynth, Raad, Suiza). La carga tumoral fue cuantificada utilizando software Living Image. Los ratones con controles de carga tumoral y no tumorales del mismo grupo de edad fueron sacrificados de forma incruenta conforme a la ética SAHMRI SAM165. Los fémures y las tibias de cada ratón fueron aislados y
20 purgados de médula con PBS, 2 % de FCS, y EDTA 2 mM (PFE). Los huesos fueron triturados y asimilados en 3 ml de colagenasa I 3 mg/ml durante 2 horas a 37 °C en una incubadora de agitación. La suspensión se diluyó a 10 ml con PFE. Se centrifugó a 1400 g durante 5 min para recolectar células. Se lavó con 1xPFE y se repitió el centrifugado. El sedimento celular y las astillas de hueso
25 fueron resuspendidas en 1 ml de TRIzol (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EE.UU.) – mezcladas con un agitador vorticial e incubadas en hielo durante 15 minutos. El TRIzol fue recolectado y procesado para extracción de ARN por precipitación de cloroformo/isopropanol (como se describió con anterioridad).

30 **Evaluación de expresión de Grem1 en estroma humano y murino:** Se recolectaron los trépanos de la cresta ilíaca, con consentimiento informado, de pacientes seleccionados al azar con MM sintomático que se presentaron en el Royal Adelaide Hospital (Adelaide, Australia), y de controles de la misma edad hematológicamente normales. Todos los pacientes MM fueron diagnosticados
35 recientemente y no han tenido terapia previamente. La aprobación ética para

este estudio se obtuvo del comité de revisión de ética institucional del Royal Adelaide Hospital (número de aprobación ética #030206). Las células estromales adherentes fueron expandidas *ex vivo* de cada trépano y criopreservadas después de un pasaje adicional. Las muestras estromales fueron recuperadas del almacenamiento en nitrógeno líquido y cultivadas durante 24 horas antes de la recolección en TRIzol para extracción de ARN descendente como se describió con anterioridad. El ARN se sometió a un tratamiento con DNasa con DNasa RQ1 (Promega, Wisconsin, EE.UU.) antes del ADNc fabricado utilizando SuperScriptIII (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EE.UU.). Se llevó a cabo un análisis de PCR Cuantitativo de la expresión de Grem1 en muestras tanto humanas como murinas utilizando mezcla maestra RT2 SYBR-verde (Qiagen Hilden, Alemania) en un BioRad CFX Connect con normalización a B-actina como el control endógeno usando el método de curva patrón. Se utilizaron los siguientes cebadores: Grem1 de ratón; 5'-GCGCAAGTATCTGAAGCGAG-3' anterógrado (SEQ ID NO: 38); 5'-CGGTTGATGATAGTGCGGCT-3' inverso (SEQ ID NO: 39), Grem1 humano: 5'- AGGCCCAGCACAATGACTCAG-3' anterógrado (SEQ ID NO: 40); 5'- GTCTCGCTTCAGGTATTTGCG-3' inverso (SEQ ID NO: 41), B-actina: 5'- GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3' anterógrado (SEQ ID NO: 42); 5'-GTCATAGTCCGCCTAGAAGCAT-3' inverso (SEQ ID NO: 43).

Generación de una línea celular con sobreexpresión de Grem1 estromal murina: El ADNc murino para Grem1 fue aislado de un vector pCMV6-K^R amablemente proporcionado por el Gastrointestinal Cancer Biology Group, SAHMRI. La secuencia Grem1 murina fue extirpada por digestión con enzimas de restricción EcoR1 y Not1 y clonada al vector pLeGoIT2. Seguido a la infección lentiviral de las células OP9-GFP+, las células positivas para GFP y TdTomato fueron clasificadas por FACS. La expresión de transgén fue confirmada por PCR cuantitativa y transferencia de Western.

Co-cultivo de estroma de MO y CP MM: Las células estromales OP9 fueron plantadas en tanto en una cubeta TC de 6 cm como en una placa de 24 pocillos en (densidad celular), respectivamente y se les permitió adherirse durante 5 horas. Se suspendieron CP MM 5TGM1 a 1×10^5 células/ml y se agregaron a los cultivos celulares estromales. Las células estromales fueron recolectadas 24, 48 y 72 horas posteriores a la iniciación del co-cultivo. Para co-cultivos con contacto, las células GFP+OP9 fueron aisladas por FACS de las CP

MM GFP negativas 5TGM1 parentales para obtener una población estromal pura para análisis. Para co-cultivo sin contacto, se separaron CP 5TGM1.Bmx1 de las células OP9 utilizando un Transwell de 4 μm durante la duración del co-cultivo. Las líneas celulares MM humanas RPMI-8226, U266, KMS-11 y H929 fueron
 5 cada una cultivada con 3 muestras estromales de la MO humanas aisladas de individuos hematopoyéticamente sanos durante 72 horas. Las líneas celulares MM humanas fueron lavadas a fondo del estroma adherente dos veces con 1xPBS. Las células estromales fueron lisadas en TRIzol y procesadas con
 10 DNasa con DNasa RQ1 anterior al ADNc fabricado utilizando SuperScriptIII (Invitrogen). La expresión de Grem1 fue evaluada por PCR cuantitativa utilizando las secuencias de cebadores indicadas con anterioridad.

Ensayo de Proliferación de Luciferasa: Las células estromales con sobreexpresión de Grem1 y OP9 solo de vector fueron sembradas en una placa
 15 de 24 pocillos a 5×10^4 células por pocillo y se les permitió adherirse durante toda la noche. El día siguiente se sembraron CP MM 5TGM1.Bmx1 en ambas poblaciones de células estromales y se cultivaron durante 72 horas. Siguiendo a la incubación, los contenidos enteros de cada pocillo fueron transferidos al tubo de microcentrífuga correspondiente por pipeteo enérgico. Las células fueron
 20 recolectadas por rotación a 2000 g durante 5 minutos a 4 °C. Las células fueron lavadas una vez con PBS. El sedimento celular para cada pocillo fue lisado en 1x tampón de lisis celular (nombre del proveedor). Se transfirieron 20 μl de lisado celular a una placa de 96 pocillos. Inmediatamente antes de la lectura de la placa, se agregaron 100 μl de tampón de reacción luciferasa (MgCl₂ 5 mM, HEPES
 25 30 mM, ATP 150 μM , 250 μM de Coenzima A y D-luciferina 150 $\mu\text{g/ml}$) al lisado celular. La bioluminiscencia se midió usando un lector de microplacas Wallac 1420 Victor (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.), con la intensidad de luz utilizada como una correlación directa del número de CP MM.

Direccionamiento a Grem1 en un modelo murino inmunocompetente de MM sistémico:
 30

Los ratones C57BL/KaLwRij (6 a 8 semanas de edad) fueron inoculados con 5×10^5 células 5TGM1.Bmx1 a través de inyección en la vena caudal. Tres días posteriores a la inoculación con CP MM 5TGM1.Bmx1, se administró a los ratones KaLwRij 30 mg/kg de anticuerpo Ab7326 neutralizante de Grem1 o
 35 control IgG Ab1014.4 (UCB-Pharama, Reino Unido) por inyección subcutánea

(s.c.). Los ratones fueron tratados cada 3 días durante la duración del modelo de 4 semanas. La carga tumoral fue supervisada semanalmente por BLI como se describió con anterioridad. Al final del experimento, la sangre fue recolectada a través de sangrado de cola, centrifugado a 2100 g durante 10 min y el suero fue recolectado. Los niveles de paraproteína de suero fueron analizados utilizando el kit Hydragel 30 β 1 β 2 (Sebia Electrophoresis, Georgia, EE.UU.), seguido a las instrucciones del fabricante. La banda correspondiente a la paraproteína fue cuantificada en referencia a los niveles de albúmina sérica (ética animal SAHMRI SAM165)

Estadísticas: Los datos numéricos se presentan como promedio $\pm$ error típico de la media (E.T.M.). Los datos que representan dos condiciones de examen fueron analizados por prueba de T de Student. Los datos con más de dos condiciones de examen fueron analizados por un análisis unidireccional de varianza (ANOVA) seguido por una comparación múltiple post hoc de Tukey para determinar la significación estadística de las diferencias. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Descripción de los Resultados

La expresión de Grem1 está regulada al alza en estroma de médula ósea de MM

La expresión de Grem1 fue analizada en muestras de ARNm obtenidas de estroma de MO derivado de pacientes sanos y con MM. El estroma de MO de paciente con MM (n=15) tiene una expresión de Grem1 significativamente más alta en comparación con el estroma de MO de donantes de la misma edad hematopoyéticamente normales (n=17) ($p < 0,001$) (Fig 10). La expresión de Grem1 también fue investigada en el modelo de mieloma de ratón 5TGM1/KaLwRij.Hsd. El hueso compacto fue aislado de ratones C57BL/KaLwRij.Hsd sanos y portadores de tumores MM y se analizaron por diferencias en la expresión de Grem1. El estroma de MO de ratones portadores de tumores no demostró un incremento significativo en la expresión de Grem1 comparado con los controles sanos, sin embargo se observó una tendencia hacia la expresión de Grem1 aumentada (Fig 11A). De manera importante, los ratones con las mayores cargas tumorales, como se determinó por diagnóstico por imágenes bioluminiscentes, exhibieron la mayor expresión de Grem1 (Fig 11B). Este resultado demuestra que el aumento en Grem1 en respuesta al crecimiento

tumoral MM apoya el descubrimiento en el ámbito humano.

Las células MM promueven la expresión de Grem1 aumentada en estroma de MO

Los experimentos de co-cultivo utilizan la línea celular murina MM 5TGM1.Bmx1 con la línea celular estromal derivada de MO, OP9 se llevó a cabo para determinar el efecto de CP MM en la expresión de Grem1 dentro del microentorno de MO. Después de 72 horas de co-cultivo, la expresión de Grem1 fue significativamente mayor en las células estromales de MO cultivadas en la presencia de la CP MM que aquellas que no tuvieron contacto con la línea CP MM (p<0,05) (Fig 12a). Los intervalos de tiempo anteriores a 24 y 48 horas de co-cultivo no demuestran un cambio significativo en la expresión de Grem1 estromal (Fig 12a). El co-cultivo se llevó a cabo en condiciones tanto de Transwell como de contacto celular, sin embargo solo los co-cultivos de contacto celular expusieron cambios en la expresión de Grem1 estromal (Fig 12b). Las células estromales de médula ósea humanas primarias derivadas de individuos hematopoyéticamente normales, fueron también cultivadas con las líneas celulares MM humanas KMS-11, RPMI.8226, H929 y U266. Las líneas celulares KMS-11 y U266 demostraron una capacidad para inducir un aumento en la expresión de Grem1 de estroma de MO después de 72 horas de co-cultivo, mientras que los co-cultivos con líneas celulares RPMI.8226 y H929 no resultaron en cambios en la expresión de Grem1 en el estroma (Fig. 13).

La expresión de Grem1 incrementada promueve la proliferación de CP MM

Para adicionalmente investigar la importancia de Grem1 en la configuración de MM, las células estromales que sobreexpresan Grem1 fueron generadas y se usan en co-cultivos con CP MM 5TGM1. La CP MM demostraron un incremento significativo en la proliferación cuando son co-cultivados con las células estromales con sobreexpresión de Gremlin1, tanto en disposiciones de transwell como en cultivos con contacto celular (Fig. 14) (p<0,01 y p<0,001, respectivamente). Las CP MM co-cultivadas con el estroma de MO con sobreexpresión de Grem1, posteriormente exhibieron una reducción en la activación de la vía de señalización de BMP, como se demuestra por una reducción en la fosforilación de Smads-1/5/9 (Fig 16).

La vía BMP es conocida por inhibir la proliferación de CP MM y promocionar la apoptosis y representa un mecanismo potencial para la reducción en la proliferación de CP MM observada (Hjertner *et al.*, 2001; Holien *et al* 2012).

El direccionamiento a Grem1 reduce la carga tumoral MM *in vivo*

Para examinar la importancia de Gremlin1 en el establecimiento y crecimiento *in vivo* de tumores MM, utilizamos el modelo MM de ratón 5TGM1/KaLwRij. Después del comienzo de la enfermedad, los ratones fueron
 5 asignados aleatoriamente (n=13/grupo de tratamiento) para recibir tratamiento con anticuerpo neutralizante de Gremlin1 (Ab7326, UCB-CellTech, Reino Unido) o control IgG, y la carga de la enfermedad fue supervisada semanalmente durante cuatro semanas a través de diagnóstico por imágenes por bioluminiscencia. Estos estudios demostraron que el tratamiento con una terapia
 10 anti-Gremlin1 redujo significativamente la carga tumoral MM *in vivo* (Fig. 15) (ANOVA bidireccional, $p=0,0056$). El análisis SPEP de la carga de enfermedad demostró un resultado comparable, con ratones tratados con el anticuerpo anti-Grem1 que tiene una intensidad de adición de M significativamente menor en relación con la albúmina sérica, en comparación con los ratones de control
 15 tratados.

Análisis

Los descubrimientos de Grem1 incrementado en el estroma de MO de pacientes MM son consistentes con los estudios previos que han informado de Gremlin1 aumentado producido por poblaciones celulares microambientales.
 20 Asimismo, se observó una tendencia hacia la expresión de Grem1 aumentada en los huesos de ratones con tumores similares a MM. Cuando se llevan a cabo otros estudios utilizando la línea celular usada para el modelo *in vivo*, se demostró que cultivar la línea de CP MM de ratón directamente sobre una línea celular estromal derivada de la MO, que hay un aumento posterior en la
 25 expresión de Grem1 del estroma. Este descubrimiento no fue replicado cuando las CP MM fueron incapaces de tener contacto directo célula a célula con las células estromales, sin embargo se observó una tendencia hacia la expresión incrementada. Esto indica que los factores derivados de células MM responsables de la expresión de Grem1 incrementada desde el estroma
 30 dependen esencialmente del contacto celular. Esto también se observó en dos de las cuatro líneas celulares MM cultivadas con estroma humano normal. Las líneas celulares MM KMS-11 y U266 fueron capaces de inducir un aumento en la expresión de Grem1, pero las líneas celulares RPMI.8226 y H929 no lo fueron. La capacidad de algunas líneas celulares MM humanas de inducir un cambio en
 35 la expresión de Grem1, pero no otras, puede indicar que hay diferencias

fundamentales en la expresión de los factores clave responsables de la regulación de Grem1 entre estas líneas celulares, con estudios preliminares que sugieren un rol de interleucina-6 (IL-6) en la regulación de Grem1 en MM (Fig 17). También se requieren más estudios para determinar si la capacidad de la

5 línea celular para inducir la expresión de Grem1 estromal, se corresponde con su respuesta proliferativa a Grem1.

Para examinar el rol de Grem1 en MM, se generaron células estromales de MO que sobreexpresan Grem 1 y se co-cultivaron con CP MM para parcialmente replicar la intercomunicación entre el microambiente tumoral y las

10 células tumorales. Las CP MM demostraron un incremento significativo en la proliferación en co-cultivo con células estromales con sobreexpresión de Grem1. Se observó una disminución en la activación descendiente de la señalización de BMP, como se indica con la fosforilación disminuida de Smads 1, 5 y 9 en respuesta al Grem1 incrementado (Fig. 16).

15 Como Grem1 expone roles mitogénicos claros en MM, hemos investigado si focalizar terapéuticamente Grem1 representaba una opción de tratamiento. El uso del anticuerpo neutralizante de Grem1 Ab7326 en el modelo de ratón 5TGM1/KaLwRij de MM demostró casi un 50 % de reducción en la carga tumoral MM. Como las CP MM 5TGM1 no expresan Grem1, este efecto puede ser

20 atribuido como únicamente un resultado de focalizar el microambiente.

En resumen, este estudio muestra que Grem1 representa una diana terapéutica en MM.

Ejemplo 14 – Pre-tratamiento de Grem1 en un modelo de ratón de MM

Introducción

25 La aplicación del anticuerpo neutralizante de Grem1 3 días después de la inoculación de los ratones con un tumor de mieloma múltiple (MM) resultó en una reducción en la carga tumoral de aproximadamente el 50 %. Esto estableció un claro rol para Grem1 en la progresión de la enfermedad MM, sin embargo queda determinar si Grem1 participaba en la iniciación de la enfermedad MM. Para

30 abordar esta cuestión, se administró el anticuerpo neutralizante de Grem1 al modelo de ratón 5TGM1/KaLwRij antes de la inoculación del tumor.

Métodos

Direccionamiento a Grem1 antes de la inoculación de la célula tumoral en un modelo murino inmunocompetente del MM sistémico: Dos

35 dosis de 30 mg/kg de anticuerpo neutralizante de Grem1 Ab7326 o control IgG

Ab101.4 (UCB-Pharma, Reino Unido) fueron administradas a los ratones C57BL/KaLwRij (6 a 8 semanas de edad) por inyección subcutánea (s.c.) tres días y un día antes de la inoculación tumoral. En el día 0, los ratones fueron inoculados con 5×10^5 células 5TGM1.Bmxi a través de inyección en la vena caudal. Los ratones continuaron recibiendo ya sea 30 mg/kg de anticuerpo neutralizante de Grem1 Ab7326 o control IgG AB101.4 (UCB-Pharma, Reino Unido) por inyección s.c. cada 3 días durante la duración del modelo de 4 semanas. La carga tumoral fue supervisada semanalmente por BLI como se describió con anterioridad. Al final del experimento, la sangre fue recolectada por sangrado de cola, centrifugada a 2100 g durante 10 min y se recolectó el suero. Los niveles de paraproteína del suero fueron analizados usando kit Hydragel 30 $\beta 1\beta 2$ (Sebia Electrophoresis, Georgia, EE.UU.) de conformidad con las instrucciones del fabricante. La banda correspondiente a la paraproteína fue cuantificada en relación a los niveles de seroalbúmina. (ética animal SAHMRI SAM165)

Resultados/análisis

Nuestros datos previos demuestran que Grem1 puede ser diana para reducir la carga tumoral MM en el modelo de mieloma de ratón 5TGM1/KaLwRij. Esto establece que el Grem1 es un factor microambiental clave que contribuye a la progresión de la enfermedad y puede ser diana terapéutica. Sin embargo, aún resulta incierto si Grem1 también participa en la iniciación de la enfermedad MM. Para abordar esta pregunta, los ratones han recibido el tratamiento con anticuerpo neutralizante de Grem1, o control IgG1, antes de la inoculación de células tumorales MM. Como se ilustra en la Figura 18, se observó una reducción en la carga tumoral de aproximadamente 75 % a las 4 semanas posteriores a la inoculación de células tumorales.

Bloquear el Grem1 antes de la administración de las células tumorales MM, demostró una reducción adicional del 25 % en la carga tumoral general al final del estudio, cuando se lo comparó con el tratamiento después de la inoculación de la célula tumoral. La eficacia incrementada del anticuerpo neutralizante de Grem1 cuando se administra antes de la iniciación del modelo tumoral, sugiere una participación del Grem1 en la iniciación de la enfermedad MM.

Ejemplo 15 - Proliferación de células de cáncer de mama inducida por Grem1 y antagonismo de los efectos de Grem1 con un anticuerpo anti-

Grem1.**Materiales y Métodos****Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)**

Se sembraron células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231-TXSA y fibroblastos mamarios humanos MF9 en placas de 6 pocillos y se cultivaron en condiciones ya sea normóxicas o hipóxicas durante 48 horas. Las condiciones normóxicas fueron mantenidas a 37 °C con CO₂ al 5 %, O₂ al 20 %, mientras que las condiciones hipóxicas fueron mantenidas en una cámara *in vitro* a 5 % de O₂, 10 % de CO₂ (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, EE.UU.). Se extrajo la totalidad de ARN usando TRIzol (Life Technologies, Calsbad, CA, EE.UU.). Después de eliminar la contaminación de ADN genómico con DNasa I (Promega, Madison, WI, EE.UU.), se utilizó Superscript IV (Invitrogen, Carlsbad, CA) para sintetizar ADNc. 1 µg de cada muestra de ARN fue transcrita de manera inversa y la expresión del gen Grem1 fue cuantificada por RT-PCR utilizando mezcla maestra de SYBR Green Fluor qPCR (Qiagen) en un Biorad CFX Connect. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado con expresión de gen normalizada a β-actina, aplicando el método de 2^{-ΔCT}. Los datos son presentados como factor de cambio con relación al control de normoxia.

Pares de Cebadores:

Grem1 humano

5'-AGGCCCAGCACAATGACTCAG-3' (anterógrado) (SEQ ID NO: 40),

5'-GTCTCGCTTCAGGTATTTGCG-3' (inverso) (SEQ ID NO: 41);

β-actina:

5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3' (anterógrado) (SEQ ID NO: 42),

5'-GTCATAGTCCGCCTAGAAGCAT-3' (inverso) (SEQ ID NO: 43).

Ensayos de proliferación en hipoxia

Se sembraron células MDA-MB-231-TXSA que expresaban luciferasa en placas de microvaloración de 96 pocillos (1x10⁴ células/pocillo). Las células fueron cultivadas ya sea bajo condiciones normóxicas o hipóxicas y se les permitió adherirse durante toda la noche. Las células fueron entonces desnutridas de suero durante 6 horas antes del tratamiento con concentraciones aumentadas de proteína rhGrem1 (0-1000 ng/ml). En los intervalos de tiempo de 24 y 48 horas, la expresión luciferasa fue evaluada y utilizada como medida indirecta del número celular. En resumen, las células fueron lavadas en 1xPBS, y posteriormente lisadas en tampón de lisis de cultivo celular (Promega). Se

agregó un Reactivo de Ensayo de Luciferasa (MgCl_2 5 mM, HEPES 30 mM, ATP 150 μM , Coenzima A 50 mg/ml y D-luciferina 150 $\mu\text{g/ml}$ (Biosynth AG, Staad, Suiza)) a los lisados celulares, y se cuantificó de manera inmediata la luminiscencia utilizando un lector de placa luminómetro (Wallac 3000).

5 Ensayos de proliferación de co-cultivos Transwell

Las células de cáncer de mama 4T1 murina que expresan luciferasa (células 1×10^4) fueron sembradas en transwells de membrana de policarbonato de 3 μm (Costar, Washington, D.C., EE.UU.) en una placa de 24 pocillos. Siguiendo al cultivo durante toda la noche, las células 4T1 fueron desnutridas en un DNEM libre de suero durante 6 horas para sincronizar el crecimiento celular. Las células OP9 estromales murinas GFP+, previamente transducidas con un control o construcción pLEGOi2 que expresa Grem1, fueron sembradas en cámaras bajas (2×10^4 células) en FCS DMEM al 10 %. Las células fueron co-cultivadas durante 72 horas, antes del análisis de proliferación celular 4T1 a través de expresión luciferasa.

Análisis de transferencia de Western

Las células murina 4T1 BrCa fueron sembradas en placas de 6 pocillos y cultivadas hasta 80 % de confluencia. Las células fueron desnutridas en un medio libre de suero durante toda la noche, y luego estimuladas con los tratamientos indicados durante 2 horas. Los lisados celulares fueron preparados y cantidades equivalentes de proteína (50 μg) fueron separadas en electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico 10 % (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Se llevó a cabo inmunotransferencia con anticuerpos fosfo-Smad1/5/9 (cell signalling technologies, dilución 1:1000). Se confirmaron cargas iguales de muestras de proteína en membranas de transferencia por adsorción con anticuerpos contra β -actina (Sigma Aldrich, dilución 1:2500) Las proteínas se visualizaron utilizando el sistema de captura de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, EE.UU.).

Resultados y análisis

Hemos identificado que Grem1 induce la proliferación de células de cáncer de mama humano bajo condiciones hipóxicas. Mientras que el mecanismo por el cual Grem1 promueve la proliferación de cáncer de mama permanece desconocido, se ha demostrado que la expresión de BMP es elevada bajo hipoxia en varios otros tipos de células. Por lo tanto, Grem1 puede inducir proliferación bajo hipoxia por inhibición de los efectos anti-proliferativos de BMP.

Las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231-TXSA y los fibroblastos mamarios humanos MF9 fueron cultivados ya sea en condiciones normóxicas (O_2 al 20 %) o hipóxicas (O_2 al 5 %) durante 48 horas. La cuantificación de ARNm de Grem1 por RT-PCR reveló expresión de Grem1 elevada bajo hipoxia tanto en

5 células MDA-MB-231-TXSA ($p=0,0024$) como en células MF9 ($p=0,034$) comparadas con controles normóxicos (Fig 19).

Cuando es cultivado bajo condiciones hipóxicas, rhGrem1 estimuló un incremento dependiente de la dosis en la proliferación de MDA-MB-231-TXSA, con un máximo de 1,5 veces ($p<0,005$) y 1.7-veces ($p<0,0005$) en comparación

10 con las condiciones normóxicas, después de 24 horas y 48 horas respectivamente (Fig. 20).

Para mayor investigación acerca de si Grem1 induce la proliferación de las células de cáncer de mama en el contexto de otros factores estromales, las células de cáncer de mama 4T1 murinas fueron co-cultivadas con las células

15 OP9 estromales que expresan ya sea Grem1 o un vector de control. Grem1 derivado de células estromales incrementa de manera significativa la proliferación de células de cáncer de mama por 1,8-veces ($p<0,0005$) después de 72 horas de cultivo (Fig. 21). Esto además sugiere que Grem1 puede inducir la proliferación al antagonizar las BMP derivadas de estromas.

Como Grem1 es un antagonista de BMP-2/4/7 conocido, hemos evaluado la capacidad del anticuerpo UCB Ab7326 de inhibir la inhibición de fosforilación de SMAD1/5/9 inducida por Grem1 a través de análisis de transferencia de western. Células de cáncer de mama 4T1 murinas expuestas a BMP2 10 ng/ml que llevan a fosforilación de Smad1/5/9. La co-incubación con rhGrem1 100

25 ng/ml inhibió esta fosforilación de Smad1/5/9 mediada por BMP2. En particular, en comparación con las células 4T1 expuestas a rhGrem1 preincubadas con un control de isotipo, la preincubación de rhGrem1 con Ab7326, recuperó de manera parcial la fosforilación de SMAD1/5/6 en células 4T1 (Fig. 22). Estos resultados proporcionan confirmación de que Ab7326 puede efectivamente direccionar y

30 neutralizar los efectos de Grem1.

Ejemplo 16 - El efecto de la monoterapia y terapia de combinación en ratones VG/Min

Los ratones fueron tratados con anticuerpo anti-Grem1 30 mg/kg semanalmente y/o dos dosis diarias intraperitoneales de 5-fluorouracilo 40 mg/kg

35 (5FU, Sigma) a o desde la edad de 35 días en adelante, lo que es muy tarde en

el proceso de la enfermedad *Vil1-Grem1/ApcMin*. Para generar los datos Kaplan-Meier, los ratones fueron sacrificados cuando se alcanzaron parámetros incruentos (ratones que exhiben anemia, encorvadura e inactividad).

La monoterapia ya sea con 5FU o anti-Grem1 en esta etapa tardía de la enfermedad no tuvo efecto en la longevidad de los ratones, pero la terapia combinada prolongó de manera significativa la longevidad del ratón (mediana de la supervivencia: sin tratamiento 45 días (n=9), 5FU solo 47 días (n=4), anti-Grem1 solo 49,5 días (n=6), terapia combinada 76,5 días (n=6); prueba del orden logarítmico $p < 0,01$), ver Figura 23. Estos datos ilustran la eficacia de la terapia de combinación en una enfermedad establecida en etapa avanzada utilizando un anticuerpo anti-Grem1 junto con quimioterapia convencional dirigida contra el epitelio proliferante.

Ejemplo 17 – El efecto del anticuerpo anti-Grem1 en modelos de Xenoinjertos Derivados del Paciente (PDX) humano.

La eficacia del Ab7326 anti-gremlin-1 como IgG1 de ratón será evaluada en ocho modelos de Xenoinjerto Derivado de Pacientes (PDX). Los modelos PDX humanos fueron seleccionados basados en su expresión aumentada del producto de gen GREM1 sobre el tejido de control. Los modelos seleccionados incluyen xenoinjertos derivados de tipos de cáncer de páncreas, pulmones, de riñón, colorrectales, gástricos, de cabeza y cuello, y de hígado. Ab7326 se dosificará semanalmente de manera subcutánea. El tamaño del tumor será evaluado a lo largo de la duración del modelo y se recolectarán muestras de tumores y plasma y se analizarán al final de los experimentos.

Ejemplo 18 – El efecto del anticuerpo anti-Grem1 en la carga tumoral en ratones C57B16/KaLwRij (Figura 33)

Se observó que la carga tumoral en los ratones C57B16/KaLwRij era significativamente reducida en los huesos de las extremidades inferiores cuando los ratones eran tratados con anticuerpo neutralizante de Grem1, Ab7326 (ver Figura 33). Se vio una reducción significativa en la carga tumoral cuando el anticuerpo anti-Grem1 fue administrado después de la inoculación de la célula tumoral (Figura 33A), en comparación con control IgG (medido por BLI). También se observó una reducción significativa en la carga tumoral cuando se administró el anticuerpo anti-Grem1 antes de la inoculación de la célula tumoral (Figura 33B), nuevamente en comparación con el control IgG (medido por BLI). También se observó una tendencia a la baja en la carga tumoral esplénica en grupos

tratados con anticuerpo anti-Grem1, en los grupos con inoculación de células tumorales (Figura 33C) posterior o (Figura 33D) anterior.

Los ratones C57B16/KaLwRij son un modelo de mieloma múltiple (MM) en el cual las células MM crecen dentro de la médula ósea (MO) y el bazo. Los datos presentados en la Figura 33 demuestran que el tratamiento anti-Grem1 aborda tumores asociados a MO así como células MM en el bazo. En consecuencia, la terapia anti-Grem1 puede ser usada para tratar ambos tumores de los huesos, como osteosarcomas, así como tipos de cáncer diseminados, tales como cáncer de hígado, mama y/o próstata.

Ejemplo 19 – Tratamiento de etapa avanzada de poliposis *Vil1-Grem1* y *Apc^{Min}* establecida con anticuerpo anti-Grem1, ralentiza el progreso de la enfermedad y recupera el fenotipo intestinal de ratón *Vil1-Grem1* (Figura 34)

El anticuerpo Anti-Grem1 (UCB) o anticuerpo control (UCB) fueron administrados a una dosis de 30 mg/kg semanalmente por inyecciones subcutáneas, comenzando a la edad de 4 meses para ratones *Apc^{Min}* (Fig 34B) y 5 meses para ratones *Vil1-Grem1* (Fig 34A).

Los ratones fueron envejecidos para permitir el desarrollo de una poliposis intestinal anterior al comienzo del tratamiento con anticuerpo (a la edad de 4 meses para ratones *Apc^{Min}* y 5 meses para ratones *Vil1-Grem1*). Para generar los datos Kaplan-Meier, los ratones fueron sacrificados cuando se alcanzaron parámetros incruentos (ratones que exhiben anemia, encorvadura e inactividad). En ambos modelos *Vil1-Grem1* (A) y *Apc^{Min}* (B), el tratamiento con anticuerpo anti-Grem1 prolongó de manera significativa la longevidad de los ratones. El sacrificio programado mostró una reversión del fenotipo intestinal *Vil1-Grem1* después de 4 semanas de tratamiento.

Ejemplo 20 – El tratamiento con anticuerpo Anti-Grem1 protege a los ratones *Vil1-Grem1* de mutagénesis AOM (Figura 35)

La expresión de Grem1 epitelial anormal en ratones *Vil1-Grem1* promueve un fenotipo de células madre/progenitoras epitelial (Davis *et al.*, 2015) y hemos desarrollado la hipótesis de que estas células serán susceptibles de mutación somática. Utilizamos administración de azoximetano (AOM) para examinar el efecto de una agresión mutagénica sobre ratones *Vil1-Grem1* no tratados y ratones *Vil1-Grem1* tratados con anti-Grem1. El AOM es un mutágeno bien documentado ampliamente utilizado en modelos murinos para recapitular

carcinogénesis CRC espontánea (Neufert y Neurath, 2007). Para generar datos Kaplan-Meier, los ratones fueron sacrificados cuando se alcanzaron parámetros incruentos (ratones que exhiben anemia, encorvadura e inactividad).

Los ratones fueron tratados con tres dosis subcutáneas de 30 mg/kg 5 semanalmente con anticuerpo anti-Grem1 seguido de tres dosis intraperitoneales de 10 mg/kg semanalmente de azoximetano (AOM, Sigma) o vehículo (solución salina) antes de otras tres semanas de 30 mg/kg semanalmente de anticuerpo anti-Grem1. El tratamiento comenzó en o desde la edad de 90 días en adelante, que es lo suficientemente tarde en el proceso de 10 la enfermedad *Vil1-Grem1* para asegurar la expansión de la población de células progenitoras y posterior formación de focos de criptas ectópicas.

La administración de AOM mejoró notablemente la formación de pólipos en ratones *Vil1-Grem1* no tratados. La carga de pólipos colónicos fue significativamente incrementada en los animales tratados con AOM (Figura 35B). 15 Esto impactó de manera negativa en la supervivencia de los ratones (Figura 35A): comparación grupo VG + *sin tratamiento* y grupo VG + AOM + *sin tratamiento*. La carga tumoral incrementada y la supervivencia reducida de los animales tratados con AOM fue parcialmente suprimida por la administración del anticuerpo anti-Grem1 en el período que rodea a la agresión mutagénica: 20 comparación grupo VG + AOM + *sin tratamiento* con grupo VG + AOM + α Grem1. Estos datos sugieren que la normalización de la determinación del destino celular por el anticuerpo anti-Grem1 en los ratones *Vil1-Grem1* evita la promoción de células madre/progenitoras epiteliales y protegen al epitelio de la agresión mutagénica de AOM.

25 **Ejemplo 21 - La expresión de *Foxl1*, *Wnt5A* y *Wnt2B* es regulada al alza en estroma *Vil1-Grem1* y este fenotipo es suprimido por el tratamiento de anticuerpo anti-Grem1 (Figuras 36 -38)**

Para investigar el origen de la expresión de ligando Wnt en las criptas ectópicas vellosas en ratones *Vil1-Grem1* tratados con anticuerpos y no tratados 30 (n=4), utilizamos hibridación *in situ* de *Foxl1* (ISH) para identificar células de telocitos sub-epiteliales como se describe en Shoshkes-Carmel *et al.* (2018). Los niveles de expresión de *Foxl1* fueron cuantificados utilizando el software de análisis de imágenes HALO. La expresión de *Foxl1* estromal vellosa fue significativamente incrementada en ratones *Vil1-Grem1* no tratados (p=0,0037) 35 (Figura 36 y Figura 38C). El tratamiento con anticuerpo anti-grem1 restauró los

niveles de expresión de *Foxl1* (valor de p de ratones *Vil1-Grem1* TS vs. tratados con anticuerpo ($p=0,4864$), indicando que la remodelación estromal y el reclutamiento celular de *Foxl1* es dependiente del *Grem1* epitelial.

5 Para determinar qué mediadores eran producidos por las células *Foxl1*+, se utilizó ISH múltiple para demostrar la combinación de la expresión de *Foxl1* y *Wnt5A* en fibroblastos subepiteliales vellosos (ver Figura 37). Las estructuras delgadas marcadas con tinción con protuberancias largas que se asemejan a los telocitos descritos por Shoshkes-Carmel *et al.* (2018).

10 La expresión epitelial de *Grem1* en el modelo *Vil1-Grem1* provoca la activación de las poblaciones de células estromales vellosas que posteriormente expresan ligandos *Wnt 5A* y *2B*. El tratamiento con el anticuerpo anti-*Grem1* evitó la activación de células estromales y suprimió la expresión del ligando *Wnt* (Figura 38A y 38B) indicando que la remodelación estromal depende del *Grem1* epitelial.

15 Métodos

Hibridación in situ

Los bloques de parafina fueron cortados (espesor = 0,4 μm) utilizando H_2O tratado con DEPC (Sigma) y las secciones fueron cocidas durante 2 horas a 60 °C. El tejido fue desparafinado y tratado con Peróxido de Hidrógeno

20 RNAscope (ACD 322335) durante 10 min a temperatura ambiente (TA). La recepción del antígeno se llevó a cabo durante 15 minutos usando 1X Reactivos de Recuperación de Objetivo RNAscope (1:10 ACD 322000) a 100 °C. Las muestras fueron tratadas con Proteasa Plus RNAscope (ACD 322331) durante 30 minutos a 40 °C usando un Sistema de Hibridación HybEZ (ACD). Las sondas

25 fueron incubadas durante 2 horas a 40 °C. Las sondas usadas fueron las siguientes: LGR4 (ACD 318321), LGR5 (ACD 312171), FZD5 (ACD 404911), FZD7 (ACD 534101), WNT2B (ACD 405031), WNT5A (ACD 316791), WNT5A-C3 (ACD, 316791-C3) y FOXL1 (ACD 407401). Los portaobjetos fueron contra-

teñidos utilizando hematoxilina (marrón) o DAPI (fluorescente).

30 *Cuantificación ISH*

Los portaobjetos fueron escaneados a ampliación 20 x usando un Escáner de Patología Digital Aperio CS2 (Leica Biosystems). Se anotaron 100 vellosidades por ratón utilizando el Software de Visualización de portaobjetos de patología Aperio ImageScope (Leica Biosystems). Los niveles de expresión de

35 *Foxl1* se cuantificaron utilizando la plataforma de análisis de imagen HALO

(PerkinElmer) y se expresaron como un % de la tinción DAB por área. Se utilizaron ANOVA bidireccional y múltiples comparaciones aplicando la corrección de Bonferroni para comparar los niveles de DAB entre condiciones. Las diferencias fueron consideradas significativas a un valor de p de <0,05. Los análisis se llevaron a cabo usando el software estadístico R.

Ejemplo 22 – El anticuerpo anti-Gremlin1 muestra una relación de respuesta a la dosis en ratones tratados *Vil1-Grem1; Apc^{Min}* (Figura 39)

Se administró anticuerpo Anti-Grem1 (UCB) o anticuerpo control (UCB) a dosis variables de 15, 30 y 60 mg/kg semanalmente por medio de inyecciones subcutáneas quincenalmente durante 6 semanas, seguido a partir de entonces de manera semanal, comenzando a la edad de 21 días en ratones *Vil1-Grem1;Apc^{Min}*. Para generar datos Kaplan-Meier (presentados en la Figura 39), los ratones fueron sacrificados cuando se alcanzaron niveles incruentos (ratones que exhiben anemia, encorvadura o inactividad). El tratamiento con anti-Grem1 prolongó la longevidad de los ratones de forma dependiente de la dosis sin ningún otro beneficio de supervivencia adicional visto desde una dosis >30 mg/kg semanalmente.

Ejemplo 23 – Comparación de tratamiento de etapa temprana y etapa avanzada con anticuerpo anti-Grem1 en ratones *Vil1-Grem1* y ratones *Apc^{Min}* (Figura 40)

Se administró anticuerpo anti-Grem1 (UCB) o anticuerpo control (UCB) a ratones *Vil1-Grem1* (Figura 40A) y ratones *Apc^{Min}* (Figura 40B) a una dosis de 30 mg/kg semanalmente por medio de inyecciones subcutáneas, comenzando a la edad de 42 días (tratamiento de etapa temprana) o 120 días después del desarrollo de una poliposis intestinal (tratamiento de etapa avanzada).

Para generar los datos Kaplan-Meier, los ratones fueron sacrificados cuando se alcanzaron niveles incruentos (ratones que exhiben anemia, encorvadura e inactividad). El tratamiento con el anticuerpo anti-Grem1 iniciado en ambos momentos prolongó significativamente la vida útil de los ratones. Específicamente, para los ratones *Vil1-Grem1* (Figura 40A), la mediana de supervivencia del grupo de vehículo (242 días (n=13)) fue significativamente incrementada por el tratamiento con el anticuerpo anti-Grem1; tratamiento de etapa avanzada: 519 días; tratamiento de etapa temprana: 540 días. En los ratones *Apc^{Min}* (Figura 40B), la mediana de supervivencia del grupo de tratamiento con vehículo fue significativamente extendida de 192 días a 261 días

(tratamiento de etapa avanzada) y 424,5 días (tratamiento de etapa temprana) como resultado del tratamiento con anticuerpo anti-Grem1.

Ejemplo 24 – El uso de un anticuerpo neutralizante de Grem1 reduce significativamente el crecimiento del tumor de cáncer de mama dentro del hueso y pulmón en modelos pre-clínicos de cáncer de mama (Figuras 41 a 45)

Se investigó la contribución *in vivo* de Grem1 en el establecimiento y progresión del cáncer de mama utilizando dos modelos de ratón pre-clínicos de cáncer de mama clínicamente relevantes, usando anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-Grem1 novedosos.

Métodos

Cultivo Celular

Las células de cáncer de mama derivadas de ratón PyMT-B01 fueron amablemente donadas por la Profesora Sheila Steward (St. Louis, MO, EE.UU.) y la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 fue amablemente provista por el Dr. Toshiyuki Yoneda (antes en la Universidad de Texas Health Sciences Centre, San Antonio, TX). Ambas líneas celulares expresan luciferasa producida por expresión retroviral del vector SFG-NES-TGL (Ponomarev, V. *et al.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004. 31(5): p. 740-51). Las células cancerosas fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Life Technologies, Australia) complementadas con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Life Technologies, Australia), penicilina 100 UI/ml (Life Technologies, Australia), estreptomycin 100 µg/ml (Life Technologies, Australia) y HEPES 25 mM (Life Technologies, Australia) a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %.

Animales

Los estudios animales fueron realizados de conformidad con los procedimientos de protocolo animal aprobados por el Comité de Ética Animal del South Australian Health and Medical Research Institute (SAHMRI) bajo ética número SAM373, y se ajustan a las directrices establecidas por el "Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes".

Tratamiento con anticuerpo de Grem1 en modelos de cáncer de mama pre-clínicos

PyMT-B01: Se administraron de manera subcutánea (s.c.) dos dosis de 30 mg/kg de anticuerpo anti-Grem1 Ab7326 o control IgG, Ab101.4, a ratones inmunocompetentes C57BL6 de 5 semanas de edad, la semana anterior a la

inoculación de células tumorales. Se inyectaron de manera sistémica 1×10^5 células de cáncer de mama de ratón PyMT-B01 que expresan luciferasa a través de la arteria caudal (CA).

- 5 **MDA-MB-231:** Se administraron de manera subcutánea (s.c.) dos dosis de 30 mg/kg de anticuerpo anti-Grem1 UCB6114 o control IgG, AbA33, a ratones inmunocomprometidos NOD/SCiD/gamma (NSG) de 5 semanas de edad, la semana anterior a la inoculación de células tumorales. Se inyectaron de manera sistemática 1×10^5 células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 que expresan luciferasa a través de la CA.
- 10 El tratamiento continuó dos veces por semana durante la duración del estudio. A intervalos semanales, se les administró a los ratones 150 mg/kg de luciferina intraperitonealmente (i.p.) y se diagnosticaron por imágenes usando el sistema de captura de imágenes de bioluminiscencia Xenogen IVIS, y la carga tumoral fue cuantificada usando Living Image Software. El estudio finalizó en el
- 15 día 13 y el día 22 posterior a la inyección de células tumorales de los modelos PyMT-B01 y MDA-MB-231 respectivamente, de conformidad con los requisitos de las éticas animales. Los órganos fueron disecados entre los animales sacrificados y BLI se diagnosticó por imágenes *ex vivo* para análisis de metástasis tumoral.

20 **Resultados**

- Al final del estudio, el ratón portador del tumor PyMT-B01 tratado con anticuerpo neutralizante de Grem1, Ab7326, tuvo una reducción del 35 % en la carga tumoral general, en comparación con el ratón tratado con el control de isotipo, Ab101.4, cuando el tumor fue inyectado a través de la CA (Figura 41).
- 25 Esta señal BLI está principalmente concentrada en las extremidades inferiores, indicativo de la participación extensiva del tumor esquelético asociado con este modelo. También pudo observarse una reducción estadísticamente significativa en la carga de tumor metastásico de pulmón en el ratón tratado con anticuerpo neutralizante de Grem1 en comparación con controles isotipo (Figura 42A).
- 30 También pudo observarse una tendencia a la baja en la carga de tumor metastásico en el hígado en el ratón portador del tumor PyMT-B01 tratado con el anticuerpo neutralizante Grem1 (Figura 42B).

- Al final del segundo estudio (día 22), la carga tumoral promedio para un ratón NSG portador de tumor MDA-MB-231 fue inferior en el grupo de tratamiento
- 35 con anticuerpo neutralizante de Grem1 (UCB6114) en comparación con el grupo

de control tratado con AbA33 (Figura 43).

También se observó una reducción en la carga tumoral promedio para metástasis de pulmón en ratones tratados con el anticuerpo anti-Grem1 (UCB6114) (Figura 45). Estos resultados muestran que abordar Grem1 con un anticuerpo neutralizante de Grem1 reduce de manera significativa el crecimiento de tumores de cáncer de mama dentro del hueso y pulmón. Estos estudios sustentan la hipótesis que la terapia anti-Grem1 puede representar una opción de tratamiento apropiada en cáncer de mama metastásico. En conclusión, los presentes inventores proporcionan la primera evidencia de que abordar Grem1 con un anticuerpo neutralizante de Grem1 *in vivo* representa una estrategia terapéutica efectiva para reducir el crecimiento tumoral metastásico de pulmón, esquelético y de cáncer de mama.

Ejemplo 25 – El uso de un anticuerpo neutralizante de Grem1 reduce el crecimiento tumoral de cáncer de próstata en un modelo pre-clínico de cáncer de próstata (Figuras 46 y 47)

Se investigó la contribución *in vivo* de Grem1 en el establecimiento y progresión del cáncer de próstata en modelos murina pre-clínicos de cáncer de próstata, utilizando el anticuerpo monoclonal neutralizante anti-Grem1 novedoso (UCB6114).

Métodos

Cultivo Celular

La línea celular de cáncer de próstata humano PC-3 se obtuvo de ATCC (Manassas, VA, EE.UU.). La línea celular expresa luciferasa producida por expresión retroviral del vector SFG-NES-TGL (Ponomarev, V., *et al.* 2004). Las células cancerosas fueron cultivadas en RPMI1640 (Life Technologies, Australia) complementadas con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Life Technologies, Australia), penicilina 100 UI/ml (Life Technologies, Australia), estreptomycin 100 µg/ml (Life Technologies, Australia) y HEPES 25 mM (Life Technologies, Australia) a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %.

Animales

Los estudios con animales se llevaron a cabo de conformidad con los procedimientos de protocolo animal aprobados por el Comité de Ética Animal del South Australian Health and Medical Research Institute (SAHMRI) bajo éticas número SAM373 y se ajustan a las directrices establecidas por el "Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes".

Tratamiento de anticuerpo de Grem1 en modelos de cáncer de próstata pre-clínicos

Se administraron de manera subcutánea (s.c.) dos dosis de 30 mg/kg de anticuerpo anti-Grem1 (UCB6114) o control IgG, AbA33, a ratones
 5 inmunocomprometidos NOD.Cg-Prkdc^{scid}l12rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) de 5 semanas de edad, la semana anterior a la inoculación de células tumorales. Se inyectaron de manera sistémica 5×10^5 células de cáncer de próstata PC-3 que expresan luciferasa a través de la arteria caudal (CA).

El tratamiento con anticuerpo continuó dos veces por semana durante la
 10 duración del estudio. A intervalos semanales, los ratones fueron administrados 150 mg/kg de luciferina de manera intraperitoneal (i.p.) y se diagnosticó por imágenes usando el sistema de captura de imágenes de bioluminiscencia Xenogen IVIS, y la carga tumoral fue cuantificada usando Living Image Software (PerkinElmer, MA. EE.UU.). Al final de cada estudio, los órganos fueron
 15 disecados entre los animales sacrificados y BLI fue diagnosticada por imágenes ex vivo para análisis de metástasis tumoral.

Resultados

El modelo de cáncer de próstata PC-3 mostró carga tumoral de hígado significativa (otro sitio común de metástasis de cáncer de próstata) desde el día
 20 7, además de evidencia de carga tumoral esquelética por BLI. Se observó una reducción significativa en el animal completo (Figura 46A) y se observó carga tumoral del hígado (Figura 46B) en ratones tratados con anticuerpo neutralizante de Grem1 (UCB6114) en comparación con los ratones tratados con anticuerpo control de isotipo (AbA33). También se observó una tendencia a la baja en la
 25 carga tumoral de las extremidades inferiores (Figura 46C) y pulmón (Figura 46D) para los ratones tratados con anticuerpo neutralizante de Grem1.

LISTAS DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 (Gremlin-1 Humano; Uniprot ID: O60565)

MSRTAYTVGALLLLLTLLPAAEGKKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQ
 30 PGSRNRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTI
 HEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTL
 NCPQLQPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD

SEQ ID NO: 2 (Gremlin-1 truncado humano usado en cristalografía con marcador N-terminal)

35 MGSSHHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKT

QPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFT
TMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD

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

GYTFTDYMH

5 **SEQ ID NO: 4 (Ab7326 HCDR1 Kabat)**

DYYMH

SEQ ID NO: 5 (Ab7326 HCDR2 Kabat)

LVPEDGETIYAEKFQG

SEQ ID NO: 6 (Ab7326 HCDR3 Kabat)

10 DARGSGSYYPNHFDY

SEQ ID NO: 7 (Ab7326 LCDR1 Kabat)

KSSQSVLYSSNNKNYLA

SEQ ID NO: 8 (Ab7326 LCDR2 Kabat)

WASTRES

15 **SEQ ID NO: 9 (Ab7326 LCDR3 Kabat)**

QYYDTPT

SEQ ID NO: 10 (Ab7326 región variable de cadena pesada variante 1)

QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVQAPGKGLEWMGLV
DPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYMESSLRSEDTAVYYCATDARGSG

20 SYYPNHFDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 11 (Ab7326 región variable de cadena ligera variante 1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
GTRLEIK

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

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVQAPGKGLEWMGLV
DPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYMESSLRSEDTAVYYCATDARGSG
SYYPNHFDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 13 (Ab7326 región variable de cadena ligera variante 2)

30 DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
GTRLEIK

SEQ ID NO: 14 (Cadena pesada IgG1 de extensión completa de ratón variante 1)

35 QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVQAPGKGLEWMGLV

DPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSG
 SYYPNHFDYWGGTGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGY
 FPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV
 AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCV
 5 VVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWL
 NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTC
 MITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQVQSNWEA
 GNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

SEQ ID NO: 15 (Cadena ligera IgG1 de extensión completa de ratón variante 1)

10 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL
 LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
 GTRLEIKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE
 RQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV
 15 KSFNRNEC

SEQ ID NO: 16 (Cadena pesada IgG1 de extensión completa humana variante 2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHWWQQAPGKGLEWMGLV
 DPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSG
 20 SYYPNHFDYWGGTGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 25 NQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17 (Cadena ligera IgG1 de extensión completa humana variante 2)

30 DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLL
 IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
 GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 TKSFNRGEC

SEQ ID NO: 18 (cadena pesada Fab variante 1)

35 QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHWWQQAPGKGLEWMGLV

DPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSG
 SYYPNHFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSC

5 **SEQ ID NO: 19 (cadena ligera Fab variante 1)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL
 LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINS LQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
 GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 10 TKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 20 (Gremlin-1 truncado humano usado en cristalografía sin
 marcador N-terminal)**

AMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCY
 GQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTR
 15 VKQCRCISIDLD

**SEQ ID NO: 21 (secuencia de Gremlin-1 maduro de SEQ ID NO: 1 que carece
 de péptido de señal de aminoácidos 1-21)**

KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTAMPGEEVL
 ESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCY GQCNSFYI
 20 PRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCIS
 IDLD

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

QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVVQAPGKGLEWMGLV
 DPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSG
 25 SYYPNHFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNV
 DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
 30 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 23 (cadena ligera IgG4P humana variante 1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL
 LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINS LQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
 35 GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA

LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

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

caagtgcaactggtggaatccggggccgaagtgaaaaagcccggagccactgtgaagatctcttgcaaagt
5 gtccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcaggcacctgggaaggccttgagtggatg
ggtctggtcgatcccaggagcggcgaaactatctacgccgagaagtccagggctcgctcaccatcaccgcc
gacacttcaccgacaccggtacatggagctgtccagcttgaggccgaggacacagccgtgtactactgc
gccacggatgctcggggaagcggcagctactaccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgt
gactgtctcgagcgttctacaaagggccccctcgtgtcccgctcgtccatcatcgaagtctaccagcggag
10 gcactgcggctctcgggtgcctcgtgaaggactactcccggagccgggtgaccgtgctgtggaacagcggag
ccctgaccagcgggggtgcacacctttccggccgtcttgacgtcaagcggcctttactccctgcatcagtgggtga
ctgtcccgtccagctcattgggaacccaaacctacatctgcaatgtgaatcacaacctagcaacaccaaggt
tgacaagaaagtcgagcccaaactcgtgtgacaagactcacactgtccgccgtgccggcaccggaactgct
gggagggtcccagcgtcttctgttccctccaaagccgaaagacacgctgatgatctccgcacccccggaggctc
15 actgctggtgctgtggacgtgtcacatgaggaccagaggtgaagttcaattggtacgtggatggcgtcgaagt
ccacaatgcaaaaactaagcccagagaagaacagtacaattcgacctaccgctcgtgtccgtgctcacgggt
gttgcacatcaggattggtgaacgggaaggaatacaagtgaaggttccaacaaggcgtgccggcaccg
atcgagaaaactatctccaaagcgaaggacagcctaggggaacctcaagtctacacgctgccaccatcac
gggatgaactgactaagaatcaagtctcactgactgtgtggaaggggtttaccctagcgacattgccgtgg
20 agtgggaatccaacggccagccagagaacaactacaagactaccctccagtgtcgcactcggatggatc
gttcttctttactcgaagctcaccgtggataagtcccggtggcagcagggaaacgtgttctcctgctcgggtgatg
catgaagccctccataaccactatacccaaaagtcgctgtccctgtcgccgggaaag

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

gacattgtgatgaccagtcctcccgattcgttgcgggtgtccctgggagaacggggccaccattaactgcaaga
25 gctcacagtccgtcctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatggtatcagcagaagcctggacagcc
tcccaagtgtctcatctactgggctagcaccgcgaatccgggggtgccggatagattctccggatcgggttcgg
gcactgacttcacttgactatcaactcactgcaagccgaggatgtcgcggtgtacttctgacagcagtactacg
acaccccgaccttggacaaggcaccagactggagattaagcgtacggtggccgctccctccgtgttcatcttc
ccaccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtcgtgtgctgctgaacaacttctacccccgc
30 gaggccaagggtgcagtgggaaggtggacaacgccttcagtcgggcaactcccaggaatccgtcaccgag
caggactccaaggacagcacctactccctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagca
caaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcg
agtgc

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

35 caagtgcaactggtggaatccggggccgaagtgaaaaagcccggagccactgtgaagatctcttgcaaagt

gtccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcagggcacctgggaagggccttgagtggatg
 ggtctggatcccgaggacggcgaaactatctacgccgagaagttccagggtcgctcaccatcaccgcc
 gacactccaccgacaccggtacatggagctgtccagcttgaggtccgaggacacagccgtgtactactgc
 gccacggatgctcggggaagcggcagctactacccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgt
 5 gactgtctcgagcgcttctacaaagggccccctcgtgttccctctggcccccttgctcccggtccacctccgagtct
 accgccgctctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgagcccgtgacagtgtcctggaactctggcgccct
 gacctccggcgtgcacaccttccctgccgtgtgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaccgtg
 ccctctccagcctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtgga
 caagcgggtggaatctaagtacggccctccctgccccccctgccctgccctgaatttctgggcggaccttccg
 10 tgttctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgacccccgaagtgacctgcgtgggtgt
 ggacgtgtcccaggaagatcccgaggtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgcca
 agaccaagcccagagaggaacagttcaactccacctaccgggtgggtgtcctgtgacctgtgtcaccag
 gactggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaagggcctgccctccagcatcgaagaaga
 ccactccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtgtacaccctgccccctagccaggaagagat
 15 gaccaagaaccaggtgtccctgacctgtcgtgtaagggcttctaccctccgacattgccgtggaatgggag
 tccaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgtgacagcgacggctccttcttctg
 tactctcggtgacctgtgacaagtccgggtggcaggaaggcaacgttctcctgctccgtgatgcacgagg
 ccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagcctgggcaag

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

20 gacattgtgatgacctcagtccttcgcttgcggtgtccctgggagaacggggccaccattaactgcaaga
 gctcacagtcctgtctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatggtatcagcagaagcctggacagcc
 tccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaatccgggggtgccgtagattctccggatcgggttcgg
 gcactgacttactctgactatcaactcactgcaagccgaggatgtcgcggtgtacttctgtcagcagtactacg
 acaccccgaccttggacaaggcaccagactggagattaagcgtacgggtggcgcctccctccgtgttcatcttc
 25 ccacccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtcgtgtgcctgtgaacaacttctacccccgc
 gaggccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgcctgcagtcgggaactcccaggaatccgtcaccgag
 caggactccaaggacagcacctactccctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagca
 caaggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcg
 agtgc

30 SEQ ID NO: 28 (cadena pesada IgG1 de extensión completa de ratón variante 2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHWWVQQAPGKGLEWMGLV
 DPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATDARGSG
 SYYPNHFQYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGY
 35 FPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV

AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCV
 VVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWL
 NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTC
 MITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEA
 5 GNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

SEQ ID NO: 29 (cadena ligera IgG1 de extensión completa de ratón variante 2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLL
 IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
 10 GTRLEIKRTDAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE
 RQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV
 KSFNRNEC

SEQ ID NO: 30 (cadena pesada IgG1 de extensión completa humana variante 1)

15 QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQQAPGKGLEWMGLV
 DPEDGETIYAEKFGQGRVTITADTSTDYMEYSSLRSEDTAVYYCATDARGSG
 SYYPNHFYDWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 20 TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 31 (cadena ligera IgG1 de extensión completa humana variante 1)

25 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLL
 LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
 GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 30 TKSFNRGEC

SEQ ID NO: 32 (cadena pesada Fab variante 2)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWVQQAPGKGLEWMGLV
 DPEDGETIYAEKFGQGRVTITADTSTDYMEYSSLRSEDTAVYYCATDARGSG
 SYYPNHFYDWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 35 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV

NHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO: 33 (cadena ligera Fab variante 2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
5 GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

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

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDYYMHVVQAPGKGLEWMGLV
10 DPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYMESSLRSEDVAVYYCATDARGSG
SYYPNHFQYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTCTYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
15 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 35 (cadena ligera IgG4P humana variante 2)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLL
20 IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLSQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQ
GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

SEQ ID NO: 36 (Gremlin-1 humano; secuencia completa)

25 actcggtagcgcttccgcggaaccggggcgacccagtgacggcgccgctcactctcgggtcccgtgacccc
gcgccgagccccggcggtctgcccgcggccgactcagcgccacgctcgaaagcgagggccccgag
gacccgcccgcactgacaggtgagcgcggaaccggcgagggatgtgagtgggcgagggaagagg
gccgcaaaccaaccaggacccgctcagttccacgcgcggcagccctccgtgcgcgcaggctcgggtgcg
ttgttcgcgggggtgaattgtgaagaaccatcgcggggtcctcctgctgaggccgaggacaccgtgacctcg
30 ctgctctgggtctgcagggaacgtaggaaaaaaagttgtcaggagcgggcaggatgacccccacatcccg
ttccacctcccggaggccccgaacacgctcctggtgctggtggcagcagcgctggcagacgcgcccgt
tagcgagggcgcgaaagtccaggccgagagcgcaggagcatccggacctgctagtcggccgctgactgc
gcggcgaggttccttgagaggggtcccatgtgcttggggcgccgcgctgggtctggggcgcttggggcgccc
attggagtccgcggttgagcatccggagaatccatgatgtgtgcatttgcgatccccgaggtgagatgga
35 gactggcaagggcagagccgctgtgttcagccacagcggaaccgaacgggtgggtaatccgacagctgc

ggtgcggggcgcgccctggccgcgggtccagcgaacccgcagtgctcacaaggcagacaccacacg
cgctcgcgacccggccacgcactcgcgggcgctcgcttctactccagcctcttccccgccccgcgcacgcc
cgagctgaatggtagacgttctggcgccgggcagcggccaccggctggttcccacttccgcgcgacccctt
aaactgtgttctagaggccccagcctcgcttgcagcgccctactagctcctgaggactagggaactggcggt
5 gaggcgggttggcggctgcaacgagctgggcgtcttctgttctctcgtgcctggctggctccgctggccct
ccacagcttgcggagcaaggccatagcaggggagtgaggatattggggctgtcacctccttgcctggccg
gagttattgtagactacagactccggaagaacagacgcgccaccgctctcgcttggcattgccttcggatcgc
agctcctcctgggggtgccccagcttggcgcttatttgcctgcgccaggctctggcgacggtcaccggggccag
gcggggaggggacggacggcaggtgaccagcctctgctgtgaagaaattcctgcgcgcccggagctgtccct
10 aatgcattcccgggtcgaatccgtctactgccttccccctcctcgaccgactccgaatctcggtcttatagacaga
aatacagcctcagcgttaggggttaaaatccccctcttaaacgggtccgagggcagagaggtgaccaccgata
ggtaattggatctcctgctggaagagcaaattcgagcgggtgtgcgcgtctgtttatgttccccctcagatgggtg
ccaggacacgaactgattaaaacaatctattgtgttaagtgggtcactagggtttaagctgtcccagggaacc
cagagtagtggttcttctggtgtacacacaagttaaataaatagcgtagaagaggtaagataacccatt
15 ctagggtgaggagtcctctttcatccctagggcttccccctcccccttttctcttttttgaaggagggggagcatga
gagcttgagggggggagtgacttttcaaagcaaggaggggaaagatcttaagaaaactatatattctactgcc
cccaagccaagtctataacagtaggtgatttgattactatctctggataaatggcactgtcaaattgttaatatta
actatttcagggaatttttagcagggtagtggcagtatgtgtgcgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgttaacctc
caggtcattgtaggaattagagcttttgtaaactttgtaatccacaggttccctattttctaaaagttcatttttagtga
20 aatgttttgtaaccacgcctctgtaggaaatccaggttggtcaatgcggtctttatgtgagtagttacacagggga
aggataaaaaccttttatgtcctacatctctgaatgagggctgcctaccctgtctttgaaactaagccgaagatgc
cttcagctcgaatgggtcaagtattaaaagtataaaatgcaaagaaatttcattgcgcgacacctccccc
gaactgcttgttgacagcaaagctgtggaacatgttccacaacagagagtaaaggacagccaggaaatata
aaccttttatgtaaaggaaaggcaggtgggggacagtggttaggggaggtgactgcagcctctaaccacaaa
25 ggcaaccatcaggcaagtgtaccagcccgctgtcttcgatctgcaaggaattttcttagtttaacatatgtcttta
gaaattcaaagtacaacaggaattcctgggacaagagaaatcttttattccatgtgaacatgaagatacaa
aatagataattattttatagcactcttcaaattgtattgcattagaaaacatatccattgaccactgttaagga
cagcactgggtgtcaataggacagtggttaaggacctgtgtttggggctagatagaattgggtttaaactgtctgg
ctgggctgggcacagtggctcacaccggtaatccagcactttgggaggccaaggaggacggatcacctga
30 ggtcgggagttcgacaccagcctgaccaacatggaaaaatcccgctctactaaaaacacaaaattagcca
ggcatggtggtgcatgcctgcaatccagctacttgggaggctgaggcaggagaattgcttgaaccggggag
gcggagggttggtgagcccagatagcgccattgcattccagcctgggcaacacgagtgaaaactccgtcaa
aaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaacaaaac
attccaacttttctgagtgtagattccctgattggtaaaaggaagatgatattatctacctcatattttgtatgaaaa
35 ataaatgataaaattgggtcagaaatcagcataatgcctggcacagtaagggcttcaaaaataaaaggtagct

cttattattagtaatgggtgtaggaaaagtagcaatgttatacagaaccaggatatatcacagggcagttctgaa
 attaaatcctgaatcctggccgggtgaggtggctcacgcttgtaatcctaagcactttcggagactgaggcagg
 cggatcacgaggtcaggagtttgagaccagcctggccaacacactgaaatcccgtctctactaaaaatacaa
 aaattagctgggtgtggtggcagggcgctataatctcagctacttgggaggctgaggcaggagaatcactga
 5 gcccaggaggcgagggtgcagtgagctgatatcgtgccagtgactccagcctgggtgacatctcttaaaaa
 aaaaaatcctgaataccacactacgcagtgactaacacatctttcactacagaaacagaacctgtaactggcc
 gtctctcagcagtgctgctcagtgaaacatttaataatttattactttctaactcgtttctgttgacctcaagaattgtac
 atagtcattaactttcctaagaaaatcttgacaaacatagagctcctgagatattcacaaccagggtggtctcctc
 cctgtcctatgcaatgttgggccccagcctgatttagccgacctggtcttcagacttgagaggctgttaggggtctt
 10 acaacacaaaggggatgagactttatcctctacctgtgtgccaacaagggtattcttctatctccttgggtgcaact
 gtctgaaaaaagaaagtcaacacaattatcttctaaaagttaaagatcaaattaaaaataagctatagtttccc
 aaagatttagacctgagaaaaaggaatagatctttctaaaacctggcctgcacttagagcatttgtagtcacttc
 cactatttctatgctgagagaataatttgatgtcatgcctattgaatgtctttctaaagcttgattcatcaggaggaa
 ctgaccagaagtccatgcacagacatttggctttcactgtaattcctactcaaaactcccttctactgattatgagc
 15 aggttgcttagctaaaaatgagaaatacagcaagaagagggatggaaagagctggcttaaactttcccaaag
 acatcatgaacactgggaacaggtcatacatataaccattttatttctcagtcctcagtattagaatattgtgttcta
 gaggtttgtgaaaattggaatacattgccatgacctgcacaggatagagggtggttaatatggcttaccttgcttg
 tagatgtttactcttgatccctaagggaaactggaaggaaagcatgctgttagagaggacctgcttgagagtat
 gtgtcctctgggacaagtggaatgaaagagaggatagaggcaaagagaaaaaaagggtggagatgggggtg
 20 agacttgctggtggacagttgcaaagaaaactcatgatgagaataacatcacatttctgaagaagctgaact
 gcattgatgggaagttgaggcagagtttgaaaagaagatatactgtctgcaaaaaagaatcaacggagatgt
 caggtatcttgatgcacctgagtgatgagatgcagcttaatttaatttaatatgagtagggcatttcataagt
 ggtggaaattaccataaagtgtttgcagctaatacgggcgcatgaatgatgtcataggaacctaaagtctggatg
 agctatggattgaattttactatgggacaccttctacatgttgctgtggaaaagaattgtcctcaagaaatgtac
 25 atcttctgcatttctctacatctctgatatttacaagtgacatttttggtgatactacaactgggatttcaagtgc
 acatcactactatttcttctactgaagaatcaagagcagctctgggggtggggagagcttgagtgattgacaagg
 atgtggcagagccctggtccactatgaattatagttcttaccctgcttactgtcactcatgtagagcagctagtg
 cctcagagcactgctgttctctgagaagctgagggtctcgattgacattctgaagtgggtgttacttctctgaata
 aacaaaggttggaactcagacatcttacaataagtactaaagattttgaagaatagggttttaaaaaaatgaaa
 30 aaacatttcactttccatagctaataaatcttattttgaggaaaatgtacttttcttaaaaaaaaaaaaaagcctgtc
 tgtcactctagacctttggcttagaaggtaggcacactcacatagaaacagaaagtctgtccaaattaaaact
 gaaaaccacagttgactaattttgaatttatagctctgctgttggtctctgcgatagtattaatttcaatggcttcaatt
 agaaaatgaaacctatgacattccatagagaacaggtaaaaagtcaggggacatttgagtttccaagaaa
 aagaaagacaagtcttaggaagctcttaggatggaagggaatttggcactgagagttagacatccaaag
 35 gatagcaattggctcttctgctcatgggcactggtgaaggcattttaaaatgcgaagaatggtacctctgtaaatc

aatgagggttcataataatcatgcatttaccaaatTTTTataagcacctgccttgccaggcactgagggtaaggt
 gatgaataagccctcatcaactgtcagactagatatttactcaataacagatgtgaaaatgccaagaaggaaa
 agttgagtataaagaaagccttaagttggttcagagaaataaaattgcattttcggatagatgtttatggaatcg
 gccttatgaggtaaactgtcctatgcagtgaacatacattcccagttagtctcagattggcctctgtgatgacaa
 5 actcagaggggtcctggtctaggaggggtgaatttctgagggccattttcaggaggtatggaggaagactgg
 ggcataggcctggggccatcccatgtactcctcctctgaaatggggagcaactgaattgtgtttatttttagatcttc
 gtccaactgaataccagaaattcgtgaaaccttctcaaattcacactatatttgagaccaggagaaggctcctt
 gagaaattgccacactgtcttatcctagtctctggaaaaattcagtcctgtattataactgggcgtttctcataagtg
 cttttttttttctttttttataatactttaagttctgggatacatgtgcagaatgtgcaggttgttacataggtataca
 10 cgtgccatggtggtttgctgcacccatcaacccatcatctacattaggtatttctcctaattgtaccccttccctagc
 cccccaccctcgacaggccccagtgttgatgttccctccctgtgtccatgtgttctcattgttcaactcccactt
 atgagtgagagcatgcggtgtttggtttctgttctgtttagttgtgagaatgatggttttggcttcatccacgtc
 cctgcaaaggacatgaactcatccttttatggctgcatagtattccatgggtgtatatgtgccacatttgctttatcca
 gtctatcatgtatgagcacttgggtggctccaagctttgtctattatgactagtactgcgataaacatgtgtatatgt
 15 gtctttatattagaatgattataatccttttaggtctataaccagtaataaggattcctgggtcaaattgggtatttctgggtc
 tagatccttgaggaaattgccacactgtcttccacaacggttgaactaattacactcccaccaacagtgtaaaag
 cattcctatttctccacatccttccaacatctgttgtttctgactctttaatgacggccattctaactggcgtgaaat
 ggtatctcattgtggttttgatttgcatttctctaataaccaccgatgatgagcttttctcatatgtttgctggccccata
 aatgtcttcttttgagaaatgtctgttcataatcctttgccactttttgatggggtgtttgtttttctgttaaattgtttga
 20 gttcctggtagatttctggaatattagccctttgtcagatggatagactgcaaaaatttctcccattctgtaggttgct
 gttcactctgatggtagtttcttttgccatgcagaagctgttttagtttaattagatccaattgtcagttttggctttgtgtc
 cattgttttggtgttttagtcatgaagtctttgccatgcctatgtcctgaattgtattgccctgggtttcttctaggattttt
 atggttttaggtcttacatttaagtctttaatccatcttgaattaattttgtataagggtgaaggaaagggtccagttt
 agtttctgcgtatggctagccagttttcccaacgttatttataaataagggaatcctttccccattgctgtttttgtcag
 25 gttgtcaaagatcagacggtgtgatgtgtggtgttatttctgaggcctctgttctgttccattggtctgtatatctgct
 ttgataccagtaccgtgctgttttggttactgtagcctttagtacagtttgaagtcaggtagcgtgatgctttgttcttt
 tgcttaggattgtcttggtatatgggctctttttggttctatatgaaatttaaagtagttttcatagacatctatagaa
 ctctccaccccaaataacagaatatacattcttctcagtatcgcatcacactatttctaaaatgaccacataatta
 gaagtaaaacactcctcagcaaatgcaaaaaacagaaatcctaacagctgtcagaccccgatgcaatcaa
 30 attagaactcaggattaagaaacttactgaaaaccacacaactgcatggaaactgaacaacctgctcctgaa
 tgactactgggtaataacaaaattaaggcagaaataaatagggtctttgaaagaaatgagaacaagacac
 aatataccagaatctctgggacacagctaaagcagtggttagagggaaattgatagcactaaatgccacag
 gagaaagcgggacagatctaaaatcgacaccctaatacacaattaaaagaactagagaaacaagagca
 aacaaattcaaaagctagcagaagacaagaaataactaagatcagagcagaactgaaggagatagaga
 35 cacaaaaaaccttcaaaaaatcaatgaatccaggagctgttttttttttgaaaagattaatgaaatagactg

ctagccaaactaataaaggagaaaaagagagaagaatcaaatagacaatagacacaataaaaagtgataa
 aggggatatcaccactgatcccacagaaatacaaaactaccatcagagaatactataaacacctctacgcaa
 ataaactagaaaattgggaagaaatggatacattcctgaacgcatacacccctccaagactaaaccaggaa
 gaagttgaatccctgaatagaccaatagcaagttctgaaattgaggcagtaattagtagcctaccaacaaaa
 5 aaagcccaggaccagacagattcacagccgaagtctaccagaggtacaaagaggagctagtaccattcctt
 ctgaaactattccaaacaatagaaaaagaaggactcctccctaactcattttatgaggccagcatcatcctgat
 accaaaacctggcagagacacaacataaaggaaattcaggccaatatccctgatgaacattgatgtgaaaa
 tcctcaataaaatactggcagcacatcaaaaagcttacctgccatgatcaagttggcttcatccctgggatgca
 aggtctggttcaacatacgcaaatacaataaacgtaataacacatacacagaaccaatgacaaaaaccaca
 10 tgattatctcaatagatgcagaaaaggccttcgataaaattcaacacccccttcaatgctaagaactctcaataa
 actaggtattgatgaacatatctcaaaataataagagttatttatgacaaaccacagccagtatcatactgaa
 tgggcaaaagctggaagcattccctttgaaaaccgccacaaggatgacttctcaccactcctattcaacata
 ctattggaagttctggccagggaagcaggcaagacaaataaataaaggggtattcaaataggaagagagg
 aagtcaaattgtctctgtttgcagatgacatgattgtatattagaaaaccccatcatctcagcccaaatctcctta
 15 agctgataagcaacttcagcaaaagctcaggatacaaaaatcaatgtgcaaaaatcacaagcattcctataca
 ccaataatagacaaacagccaaatcatgagtgaactcccattcacaagtgctacaaagaataaaataccta
 ggaatccaacttacaagggatgtgaaggacctctcaaggagaactacagaccactgtcaaggtaataag
 agaggacacaaacaaatggaaaaacattccatgctcatggataggaagaatcaatattatgaaaatggcca
 tactgccccaaaacaatttatagattcaatgccatccccatcaagctaccactgacttccttcacagaattagaaa
 20 aaaactactttaatttcatatggaactgaaaaaagagccggtatagccaagacgatcctaagcaaaaaga
 aaaaagctggaagcatcatgctacctgacttcaaactatactacaaggctacagtaacaaaaacagcatggt
 atagtataagtgttttttaaaagacaaagtaaagtaattttttgttgggttaaacaagctctgcataa
 agagcagggatgttgaacatacactgaccaaaggtgggaaacctacagttggagcagaagctgaatgtca
 cattatcagctccgaacttataatggctaaaagtactagggtaatgttggaagatggtgccattaaagatatct
 25 taaattcaatatttaatttttaatttgacattatcctagagttgaatgggtgttacttaccatgtgctgttcattagaaa
 atctagatcctacactgcctttgcgaaggtagttgctctaataataccaacctgtccagtttgggtgggagaaat
 aatgttactgttaagttgcacttagtggttattatgtgtaatactggtattccaaagagagaaggaaaatgtttgcta
 cacagctgtgttcttaggttcagaaaaccacaggagtgggacaggagaaccttcaggattcagggtccgattgtt
 gtgatggccgcaggaggagactgtgaattgaaactgcatccattgaaaagaaaatccctccacactttaat
 30 aattctctccgtgccccatggcagcaagtgcttataggccttgctactcaaagcttaataaaaaggcagacctg
 ctgaatcataatctgcatcttaacaatatcccagatattgtctgcactttcttttttttcttcttctttttttga
 gacagagtctcgctcagtcacccaggctggagtgagtgccgcatctcggtcactgcaagctctgactccc
 ggggtcacgccattctcctgccttagactcccagtagctggcactacaggcgcccgccactacgcccggcta
 attttttgatttttagtagagatggggttcaccgtgttagccaggatggtctcgatctcctgacctcgtgatccgcc
 35 gcccatctgggcctcccaaagtgtgggattacaggcgtagccactgcgcccggccaattgtctgcactttca

agtctaagaagcactgtcccaggaggaaaaatcttttagtctgaggcttctcttgcactctccttttaaaaatat
 gctgctccttctccacctttccctcttctccgccttttctgtctgaccttactacctccctgaacattcaactgtagaa
 gagttcccccttctctgaattgcattcttcacttcattcattcttttctctctgtctatggtttctatttttgtcggttttccct
 cacctcacctcctgttatttttgccattgttcacatatcactgcccttcagacccatatctagcttctgacccatcca
 5 ctaatccattgccactaatttattcagcatgcccatgccatttattaatgtaaatattgcacatacttgttctatcatgc
 ccatttttctaccttttaattgtatatacacagacacatgtgaatgacataattcactatttaaaggtagaaaaat
 gtatatcgtggtacaaaagtgatacattgagtatctgtgccagttcaagatgagaataagttagagggtagaagc
 ctcatgagtcacgtcacctacacgctactgtctttcattccatctgcagtactgccacacattgggttagttctcaat
 tgctgtcacattgacatcgagttggatctgaacagcgtacctggggagacgaagtattgggtatctttgcttaaatg
 10 gagtgaattactgagagacaaagtacatctttaagatcagatagcaagttactgcaccaggagcgcgacctt
 cctgttttgtgtttccctctgtcaaatgccttctgggtctccatgaatctctccttccacatatgataaaaatgcaaagt
 ctcataagcattcacagctcaggaagcctcaggctagttggggagaaaagactgggaggttccggagggaat
 gaagtcctctgagcagagagggttaattcatcttctgtgtaaaacaaaaatagaaaataagttccctcaataagtg
 aacgtaatacaaagacaaatgtggttggtgccagaggccaggaagaagtcttctgtgagaatagggtgcagag
 15 aagagctaggccctggctgagtttaaaccttgacttagtcactgtgggactctgggtgagttactccatggattga
 tggctgggtcatggagataatagtacctaattcatacaggtagtctgtgagaagtaaattggaatattcacgttaagt
 gtttaacgggtgcgtttaaatgctagggtgctattattattaatttttaaatcttggccatgttttgtcttccctctctgt
 gcttcttttcttagtatgagccgcacagcctacacggtgggagccctgcttctccttggggaccctgtgccc
 gctgctgaagggaaaaagaaaggggtcccaagggtgccatccccccgagacaaggccagcacaatga
 20 ctgagagcagactcagtcgccccagcagcctggctccaggaaccgggggaggggccaagggcggggca
 ctgccatgccccgggaggaggtgctggagtccagccaagaggccctgcatgtgacggagcgcaaatacct
 gaagcgagactggtgcaaaaccagccgcttaagcagaccatccacgaggaaggctgcaacagtcgcac
 catcatcaaccgcttctgttacggccagtgaactctttctacatcccaggcacatccggaaggaggaagggtt
 ctttcagtcctgctccttctgcaagcccaagaaattcactaccatgatggtcacactcaactgccctgaactac
 25 agccacctaccaagaagaagagagtcacacgtgtgaagcagtgctgtgcatatccatcgatttggattaagc
 caaatccaggtgcacccagcatgtcctaggaatgcagccccaggaagtcccagacctaaaacaaccagatt
 ctacttggcttaaacctagaggccagaagaacccccagctgcctcctggcaggagcctgctgtgctgtagttc
 gtgtgcatgagtggtggtgctgtgggtgttttagacaccagagaaaacacagtctctgctagagagca
 ctccctattttgtaaacatatctgctttaatggggatgtaccagaaaccacctcaccccggtcacatctaaagg
 30 ggcggggcccgtggtctggttctgactttgtgttttgtgccctcctggggaccagaatctccttcggaatgaatgttc
 atggaagaggctcctctgagggcaagagacctgttttagtctgcattcgacatggaaaagtccttttaacctgt
 gcttgcacctccttctcctcctcctcacaatccatctcttctaagttgatagtactatgtcagtctaactcttgttt
 gccaaagggtcctaaattaattcacttaaccatgatgcaaatgttttcattttgaagacctccagactctggga
 gaggtggtgtgggcaaggacaagcaggatagtggagtgagaaaggagggtggagggtgaggccaaa
 35 tcagggtccagcaaaagtcagtagggacattgcagaagcttgaaaggccaataccagaaacacaggctgatg

ctctgagaaagcttttcctagtatTTAACAGAACCCAAGTGAACAGAGGAGAAATGAGATTGCCAGAAAGT
 gattaactttggccgttgcaatctgctcaaactaacaccaaactgaaaacataaatactgaccactcctatgtt
 cggaccaagcaagttagctaaaccaaaccaactcctctgctttgtccctcaggtggaaaagagaggtagttt
 agaactctctgcataggggtgggaattaatcaaaaaccgcagaggctgaaattcctaatacctttcctttatcgt
 5 ggttatagtcagctcatttccattccactatttcccataatgcttctgagagccactaacttgattgataaagatcctg
 cctctgctgagtgacctgacagtagtctaagatgagagagtttagggactactctgttttagcaagagatattttg
 ggggtctttttgtttaactattgtcaggagattgggctaaagagaagacgacgagagtaaggaaataaaggg
 aattgcctctggctagagagtagttaggtgttaatacctggtagagatgtaagggatatgacctccctttctttatgt
 gctcactgaggatctgaggggaccctgttaggagagcatagcatcatgatgtattagctgttcatctgctactgg
 10 tggatggacataactattgtaactattcagtatttactggtaggcactgtcctctgattaaacttggcctactggcaa
 tggctacttaggattgatctaagggccaaagtgcaggggtgggtgaactttattgtactttggatttggtaacctgtt
 tcttcaagcctgaggttttatatacaaactccctgaataactcttttgccttgatcttctcagcctcctagccaagtcct
 atgtaatatggaaaacaaacactgcagacttgagattcagttgccgatcaaggctctggcattcagagaaccc
 ttgcaactcgagaagctgttttatttcgtttttgtttgatccagtgtctctccatctaacaactaaacaggagccatt
 15 caaggcgggagatattttaaacacccaaaatgttgggtctgattttcaaacttttaaactcactactgatgattctc
 acgctaggcgaatttgcacacacatagtggtgtgtttgtatacactgtatgacccccacccaaatctttgtatt
 gtccacatttccaacaataaagcacagagtggatttaattaagcacacaaatgctaaggcagaattttgagg
 gtgggagagaagaaaagggaaagaagctgaaaatgtaaaaccacaccagggaggaaaaatgacattca
 gaaccagcaaacactgaatttctctgtttgtttaactctgccacaagaatgaatttcgttaacggagatgactta
 20 agttggcagcagtaatcttcttttaggagctgtaccacagtcttgacacataagtgcagatttggctcaagtaaag
 agaatttcctcaacactaacttccactgggataatcagcagcgtaactaccctaaaagcatatcactagccaaa
 gagggaaatatctgttcttctactgtgcctatattaagactagtacaaatgtggtgtgttccaactttcattgaaa
 atgccatatctataccatattttattcgagtcactgatgatgtaatgatataattttcattattatagtagaatattttatg
 gcaagatatttgtggtctgatcatacctattaaaataatgccaaacaccaaataatgaattttatgatgtacactttg
 25 tgcttggcattaaaagaaaaaacacacatcctggaagtctgtaagttgtttttgttactgtaggctctcaaagtta
 agagtgtgaagtgaaaaatctggaggagaggataatttccactgtgtggaatgtgaatagttaaataaaaagtta
 tggttatttaagtgaattattacttcaaactccttggctactgtgatttcaagcatgttttctttctcttatatgactttctc
 tgagttgggcaaagaagaagctgacacaccgtatgttggtagagcttttatctggtcaggggaaacaaaatctt
 gaccagctgaacatgtcttctgagtcagtgacctgaatctttatttttaattgaatgttccttaaagggttaacattt
 30 cttaaagcaatattaagaaagactttaaatgttattttggaagacttacgatgcatgtatacaaacgaatagcaga
 taatgatgactagttcacacataaagtccttttaaggagaaaaatctaaaatgaaaagtggtataaacagaacatt
 tataagtgatcagttaatgcctaagagtgaagtagttctattgacattcctcaagatatttaatatcaactgcatta
 tgtattatgtctgttaaatcatttaaaaacggcaaagaattatatagactatgagggtacctgtgtgtaggagga
 tgaaaggggagttgatagctcataaaaactaatttggcttcaagttcatgaatctgtaactagaatttaattttcac
 35 cccaataatgttctatatagcctttgctaaagagcaactaataaattaaacctattcttctgtg

SEQ ID NO: 37 (Gremlin-1 humano; secuencia de codificación)

atgagccgcacagcctacacgggtgggagccctgcttctccttggggaccctgctgccggctgctgaagggga
 aaaagaaaggggtcccaaggtgccatccccccgccagacaaggcccagcacaatgactcagagcagactc
 agtcgccccagcagcctgggtccaggaaccggggggcggggccaagggcggggcactgccatgccccggg
 5 gaggaggtgctggagtccagccaagaggccctgcatgtgacggagcgcaaatacctgaagcgagactggt
 gcaaaacccagccgcttaagcagaccatccacgaggaaggctgcaacagtcgcaccatcatcaaccgctt
 ctgttacggccagtgaactctttctacatccccaggcacatccggaaggaggaagggttcctttcagtcctgctc
 cttctgcaagcccaagaaattcactaccatgatgggtcacactcaactgccctgaactacagccacctaaccaag
 aagaagagagtcacacgtgtgaagcagtgctgtgcatatccatcgatttgattaa

10 Referencias

- Attar-Schneider, O., *et al.*, Multiple myeloma and bone marrow mesenchymal stem cells' crosstalk: Effect on translation initiation. *Mol Carcinog*, 2015.
- Azab, A.K., *et al.*, Hypoxia promotes dissemination of multiple myeloma through acquisition of epithelial to mesenchymal transition-like features. *Blood*, 2012.
- 15 119(24): págs. 5782-94.
- Bostrom, M. P. y 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.
- 20 Buza, J. A., 3rd y 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.
- Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, *et al.* Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015;47(4):320-9.
- 25 Canalis, E., Parker, K. y Zanotti, S. (2012), *J.Cell Physiol* 227, 269-277. Gremlin1 is required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis.
- Chen, J., *et al.*, BAFF is involved in macrophage-induced bortezomib resistance in myeloma. *Cell Death Dis*, 2017. 8(11): p. e3161.
- 30 Chen, M.H., *et al.*, Expression of gremlin 1 correlates with increased angiogenesis and progression-free survival in patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *J Gastroenterol*, 2013. 48(1): págs. 101-8.
- Cheong, C.M., *et al.*, Tetraspanin 7 (TSPAN7) expression is upregulated in multiple myeloma patients and inhibits myeloma tumour development in vivo. *Exp*
- 35 *Cell Res*, 2015. 332(1): págs. 24-38.

- Chesi, M., *et al.*, Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood*, 2012. 120(2): págs. 376-85.
- Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C. y 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 factor beta superfamily during murine fracture healing.
- Ciuculan, L., *et al.*, Treatment with anti-gremlin 1 antibody ameliorates chronic hypoxia/SU5416-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *Am J Pathol*, 10 2013. 183(5): págs. 1461-73.
- Curran, S.P., *et al.*, Deletion of Gremlin1 increases cell proliferation and migration responses in mouse embryonic fibroblasts. *Cellular Signalling*, 2012. 24(4): págs. 889-98.
- Dallas, S.L., *et al.*, Ibandronate reduces osteolytic lesions but not tumour burden 15 in a murine model of myeloma bone disease. *Blood*, 1999. 93(5): págs. 1697-706.
- Das, D.S., *et al.*, A novel hypoxia-selective epigenetic agent RRx-001 triggers apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma cells. *Leukemia*, 2016. 30(11): págs. 2187-2197.
- Davis H, Irshad S, Bansal M, Rafferty H, Boitsova T, Bardella C, *et al.* Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside 20 the stem cell niche. *Nat Med*. 2015;21(1):62-70.
- Diamond, P., *et al.*, Targeted disruption of the CXCL12/CXCR4 axis inhibits osteolysis in a murine model of myeloma-associated bone loss. *J Bone Miner Res*, 2009. 24(7): págs. 1150-61.
- Einhorn, T. A. y Gerstenfeld, L. C. (2015), *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 45-54. Fracture healing: mechanisms and interventions.
- Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T. y Helms, J. A. (1999), *Mechanisms of development* 87, 57-66. Does adult fracture repair recapitulate embryonic 30 skeletal formation?
- Fowler, J.A., *et al.*, Bone marrow stromal cells create a permissive microenvironment for myeloma development: a new stromal role for Wnt inhibitor Dkk1. *Cancer Research*, 2012. 72(9): págs. 2183-9.
- Gazzerro, E. *et al.* (2005), *Endocrinology* 146, 655-665. Skeletal overexpression 35 of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia.

- 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.
- Ghobrial, I.M., Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. Blood, 2012. 120(1): págs. 20-30.
- 5 Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L. y Greenfield, M. L. (1997), Clinical Orthopaedics and Related Research, 76-81. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment.
- Guan *et al.* (2017). Gremlin1 promotes carcinogenesis of glioma in vitro. Exp Pharmacol Physiol, 44 (2): 244-256
- 10 Hewett, D.R., *et al.*, DNA Barcoding Reveals Habitual Clonal Dominance of Myeloma Plasma Cells in the Bone Marrow Microenvironment. Neoplasia (New York, N.Y.), 2017. 19(12): págs. 972-981.
- Hideshima, T., *et al.*, Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. Nature Reviews Cancer, 2007. 7(8):
- 15 págs. 585-98.
- Hjertner, O., *et al.*, Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. Blood, 2001. 97(2): págs. 516-22.
- Holien, T., *et al.*, Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in multiple myeloma cells by Smad-dependent repression of MYC. Leukemia, 2012. 26(5):
- 20 págs. 1073-80.
- Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, *et al.* Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. Nat Genet. 2001;28(2):184-7.
- Howe J, Roth S, Ringold J, Summers R, Jarvinen H, Sistonen P, *et al.* Mutations
- 25 in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. Science. 1998;280(5366):1086-8.
- Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M. y Harland, R. M. (1998), Mol. Cell 1, 673-683. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities.
- 30 Isella C, Terrasi A, Bellomo SE; Petti C, Galatola G, Muratore A, *et al.* Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. Nat Genet. 2015;47(4):312-9.
- Irshad S, Bansal M, Guarnieri P, Davis H, Al Haj Zen A, Baran B, *et al.* Bone morphogenetic protein and Notch signalling crosstalk in poor-prognosis,
- 35 mesenchymal-subtype colorectal cancer. J Pathol. 2017.

- Jaeger E, Leedham S, Lewis A, Segditsas S, Becker M, Cuadrado PR, *et al.* Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet.* 2012; enero; 45(1):2-3.
- 5 Karagiannis, G.S., *et al.*, Bone morphogenetic protein antagonist gremlin-1 regulates colon cancer progression. *Biol Chem*, 2015. 396(2): págs. 163-83.
- Karagiannis, G.S., *et al.*, Enrichment map profiling of the cancer invasion front suggests regulation of colorectal cancer progression by the bone morphogenetic protein antagonist, gremlin-1. *Mol Oncol*, 2013. 7(4): págs. 826-39.
- 10 Kim, M., *et al.*, Gremlin-1 induces BMP-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion. *Plos One*, 2012. 7(4): págs. e35100.
- Kim, H.S., *et al.*, GREM1 is expressed in the cancer-associated myofibroblasts of basal cell carcinomas. *Plos One*, 2017. 12(3): págs. e0174565.
- Koketsu, K., *et al.*, Gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, is a crucial angiogenic factor in pituitary adenoma. *Int J Endocrinol*, 2015. 2015: págs. 834137.
- 15 Kyle, R.A. y S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(18): págs. 1860-73.
- Laurila, R., *et al.*, The expression patterns of gremlin 1 and noggin in normal adult and tumor tissues. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013. 6(7): págs. 1400-8.
- 20 Lavozy, C., *et al.*, Gremlin regulates renal inflammation via vascular endothelial growth factor receptor 2 pathway. *J Pathol*, 2015.
- Lawson, M.A., *et al.*, Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat Commun*, 2015. 6: págs. 8983.
- 25 Lewis A, Freeman-Mills L, de la Calle-Mustienes E, Giraldez-Perez RM, Davis H, Jaeger E, *et al.* A polymorphic enhancer near GREM1 influences bowel cancer risk through differential CDX2 and TCF7L2 binding. *Cell Rep.* 2014;8(4):983-90.
- Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, *et al.* Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood*. 2010;116(18):3677-80.
- 30 Mulvihill, M.S., *et al.*, Gremlin is overexpressed in lung adenocarcinoma and increases cell growth and proliferation in normal lung cells. *Plos One*, 2012. 7(8): p. e42264.
- Namkoong, H., *et al.*, The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC*
- 35

- Cancer, 2006. 6: pág. 74.
- Neufert, C., Becker, C. y Neurath, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* **2**, 1998-2004, (2007).
- 5 Noll, J., *et al.*, Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating the proliferation of mesenchymal stromal cells. *Haematologica*, 2014. 99(1).
- Noll, J.E., *et al.*, PTTG1 expression is associated with hyperproliferative disease and poor prognosis in multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, 2015. 8: pág. 106.
- 10 Noll, J.E., *et al.*, SAMS1 Is a Tumor Suppressor Gene in Multiple Myeloma. *Neoplasia*, 2014. 16(7): págs. 572-85.
- Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):225-38.
- Ponomarev, V., *et al.*, A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004. 31(5): págs. 740-51.
- 15 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;459(7244):262-5.
- 20 Schmid, G. J., Kobayashi, C., Sandell, L. J. y 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.
- Scoville D, Sato T, He X, Li L. Current view: intestinal stem cells and signaling
- 25 *Gastroenterology*. 2008;134(3):849-64.
- Sethi A, Wordinger RJ, Clark AF. Gremlin utilizes canonical and non-canonical TGFbeta signaling to induce lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*. 2013;113:117-27.
- Shoshkes-Carmel, M. *et al.* Subepithelial telocytes are an important source of
- 30 Wnts that supports intestinal crypts. *Nature* **557**, 242-246, (2018).
- Sneddon, J.B., *et al.*, Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(40): págs. 14842-7.
- Tamminen, J.A., *et al.*, Gremlin-1 associates with fibrillin microfibrils in vivo and
- 35 regulates mesothelioma cell survival through transcription factor slug.

- Oncogenesis, 2013. 2: p. e66.
- Tomlinson IP, Carvajal-Carmona LG, Dobbins SE, Tenesa A, Jones AM, Howarth K, *et al.* Multiple Common Susceptibility Variants near BMP Pathway Loci GREM1, BMP4, and BMP2 Explain Part of the Missing Heritability of Colorectal Cancer. PLoS Genet. 2011;7(6):e1002105.
- Topol, L.Z., *et al.*, Identification of *drm*, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. Mol Cell Biol, 1997. 17(8): págs. 4801-10.
- Vande Broek, I., *et al.*, Extravasation and homing mechanisms in multiple myeloma. Clin Exp Metastasis, 2008. 25(4): págs. 325-34.
- Verheyden, J.M. y X. Sun, An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. Nature, 2008. 454(7204): págs. 638-41.
- Wang, D.J., *et al.*, The bone morphogenetic protein antagonist Gremlin is overexpressed in human malignant mesothelioma. Oncology Reports, 2012. 27(1): págs. 58-64.
- Worthley, D.L., *et al.*, Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. Cell, 2015. 160(1-2): págs. 269-84.
- Yin, Y., *et al.*, Overexpression of Gremlin promotes non-small cell lung cancer progression. Tumour Biol, 2015.
- Yu, Y. Y. *et al.* (2010), Bone 46, 841-851. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair.
- Documento WO-2014159010 (Prioridad: 14 de marzo de 2013) Regeneron Pharmaceuticals Inc. "Human antibodies to GREM 1".
- Documento WO-2013137686 (Prioridad: 15 de marzo de 2012) Seoul National University and Db foundation, Corea "Gremlin antibody".
- Documento US 2009041757A1 (Prioridad: 16 de marzo de 2007) Stanford University, "Bone morphogenetic protein antagonist and uses thereof".
- Documento WO2007124486 (Prioridad: 21 de abril de 2007) Children's Hospital Los Angeles, "BMP4 inhibitors".
- Documento W02002054940 (Prioridad: 12 de enero de 2001) University of Medicine and Dentistry of New Jersey, "Bone morphogenetic protein-2 in the treatment and diagnosis of cancer".