

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 949 159**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011 E 17205208 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023 EP 3345926**

(54) Título: **Composiciones y métodos de uso para anticuerpos terapéuticos de proteína 6 relacionada con lipoproteínas de baja densidad (LRP6)**

(30) Prioridad:

06.05.2010 US 331985 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.09.2023

(73) Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

(72) Inventor/es:

CONG, FENG;
ETTENBERG, SETH;
HARTLEPP, FELIX y
KLAGGE, INGO

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 949 159 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

5 Composiciones y métodos de uso para anticuerpos terapéuticos de proteína 6 relacionada con lipoproteínas de baja densidad (LRP6)

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos biparatópicos que se unen específicamente a LRP6.

10 Antecedentes de la invención

La vía Wnt/catenina β regula diversos procesos biológicos durante el desarrollo y la homeostasis tisular a través de la modulación de la estabilidad proteica de la catenina β (Clevers *et al.*, (2006) *Cell* 127:469-480; y Logan *et al.*, (2004) *Annu. Rev Cell Dev. Biol.* 20:781-810). En ausencia de señalización de Wnt, la catenina β citoplásmica se asocia al complejo de destrucción de catenina β que contiene múltiples proteínas, incluyendo la poliposis coli adenomatosa (APC), la Axina y la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3). En este complejo, la catenina β es fosforilada constitutivamente por GSK3 y degradada por la vía del proteasoma. La señal de Wnt se transduce a través de la membrana plasmática a través de dos receptores distintos, el receptor de serpentín Frizzled y la proteína transmembrana de paso único LRP5 o LRP6. Las proteínas Wnt promueven el ensamblaje del complejo de señalización Frizzled-LRP5/6 e inducen la fosforilación de los motivos citoplasmáticos PPPSPxS de LRP5/6 por GSK3 y Caseína Cinasa I. Las LRP5/6 fosforiladas se unen a Axina e inactivan el complejo de degradación de catenina β . La catenina β estabilizada entra al núcleo, se une a los factores de transcripción de la familia TCF y activa la transcripción.

25 El gran dominio extracelular de LRP5/6 contiene cuatro regiones de propulsor β de tipo YWTD, cada una de las cuales va seguida de un dominio similar a EGF y el dominio de LDLR. Cada región de propulsor contiene seis motivos YWTD que forman una estructura de propulsor β de seis palas. Los estudios bioquímicos sugieren que las proteínas Wnt interactúan físicamente tanto con Frizzled como con LRP6 e inducen la formación del complejo de señalización Frizzled-LRP6 (Semenov *et al.*, (2001) *Curr. Biol.* 11, 951-961; y Tamai *et al.*, (2000) *Nature* 407, 530-535). Además de las proteínas Wnt, el dominio extracelular grande de LRP5/6 se une a múltiples moduladores de Wnt secretados, incluyendo el antagonista de Wnt DKK1 y Esclerostina (SOST) y el agonista de Wnt Espondinas R.

30 La desregulación de la vía de señalización de Wnt se ha vinculado a muchas enfermedades humanas. La vía de señalización de Wnt/LRP5/6 desempeña una función importante en la homeostasis y la regeneración de los tejidos. La señalización de Wnt promueve la formación de hueso mediante el aumento del crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos (Baron *et al.*, (2006) *Curr. Top. Dev. Biol.* 76: 103-127). Las mutaciones de ganancia de función de LRP5 (Boyden *et al.*, (2002) *N. Engl. J Med.* 346:1513-1521; Little *et al.*, (2002) *Am. J Hum. Genet.* 70: 11-19; Van Wesenbeeck *et al.*, (2003) *Am. J Hum. Genet.* 72: 763-71) y las mutaciones de pérdida de función del antagonista de Wnt SOST (Balemans *et al.*, (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10:537-543; Brunkow *et al.*, (2001) *Am. J Hum. Genet.* 68:577-589) conducen ambas a enfermedades de masa ósea elevada. La señalización de Wnt también es crítica para la homeostasis del epitelio intestinal mediante el mantenimiento del estado proliferativo de las células madre en la cripta intestinal (Pinto *et al.*, (2005) *Biol. Cell* 97: 185-196). La señalización de Wnt también es crítica para la reparación y regeneración renal (Lin SL *PNAS* 107:4194, 2010). Además, las mutaciones en componentes de la vía, tales como APC y catenina β , se han asociado a cánceres humanos. Estudios recientes sugieren que la sobreexpresión de proteínas Wnt y/o el silenciamiento de antagonistas de Wnt tales como DKK1, WISP y sFRP promueven el desarrollo y la progresión del cáncer (Akiri *et al.*, (2009) *Oncogene* 28:2163-2172; Bafico *et al.*, (2004) *Cancer Cell* 6:497-506; Suzuki *et al.*, (2004) *Nat. Genet.* 36:417-422; Taniguchi *et al.*, (2005) *Oncogene* 24:7946-7952; Veeck *et al.*, (2006) *Oncogene* 25:3479-3488; Zeng *et al.*, (2007) *Hum. Pathol.* 38:120-133). Además, la señalización de Wnt se ha implicado en el mantenimiento de células madre cancerosas (Jamieson *et al.*, (2004) *Cancer Cell* 6:531-533 y Zhao *et al.*, (2007) *Cancer Cell* 12:528-541).

40 50 En consecuencia, existe la necesidad de agentes que antagonicen la señalización de Wnt a nivel extracelular como terapia para enfermedades asociadas a la señalización de Wnt canónica aberrante.

55 S. A. ETTENBERG *ET AL* (2010) describe que la inhibición de la tumorigénesis impulsada por diferentes proteínas Wnt requiere el bloqueo de distintas regiones de unión a ligando por anticuerpos contra LRP6.

Sumario de la invención

La presente invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

60 65 En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo biparatópico que comprende dos fracciones de unión a antígeno, en donde la primera fracción de unión a antígeno se une al dominio propulsor 1 de LRP6 y la segunda fracción de unión a antígeno se une al dominio propulsor 3 de LRP6, en donde dicho anticuerpo biparatópico inhibe la señalización de LRP6 mediada tanto por propulsor 1 como por propulsor 3 y no potencia la señalización de Wnt1 y Wnt3, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que expresa LRP6.

5 Los anticuerpos contra Propulsor 1 se unen al dominio propulsor β 1 y bloquean Wnt dependientes de Propulsor1 tales como Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt9, Wnt10A, Wnt10B. Los anticuerpos contra Propulsor 3 se unen al dominio propulsor β 3 y bloquean Wnt dependientes de Propulsor3, tales como Wnt3a y Wnt3. La invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que los anticuerpos contra LRP6 diferencian los ligandos Propulsor 1 y Propulsor 3 en dos clases separadas y se unen a distintos epítopos de la diana LRP6. Otro descubrimiento sorprendente es que la conversión de fragmentos de los anticuerpos contra LRP6 (por ejemplo, Fab) en anticuerpos IgG de longitud completa da como resultado un anticuerpo que potencia (mejora) una señal de Wnt en presencia de otra proteína, tal como un ligando Wnt 1 o Wnt 3. Además de los ligandos Wnt, se espera que los anticuerpos contra Propulsor 1 de LRP6 inhiban la interacción con otros ligandos de unión a Propulsor 1 (por ejemplo, Esclerostina, Dkk1). De manera similar, se espera que los anticuerpos contra Propulsor 3 inhiban la interacción con otros ligandos de unión a Propulsor 3 (por ejemplo, Dkk1). Además, se puede esperar que los anticuerpos de unión a propulsor 1 y 3 afecten a la actividad de otros moduladores de la señalización de Wnt, por ejemplo, espondinas R.

10

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 es un gráfico que muestra la determinación de la CE₅₀ por FACS de Fab seleccionados en células PA1, células U266 y células Daudi y los datos de expresión de ARNm correspondientes (A) y atenuación génica de LRP6 por ARNhp y los datos de expresión de ARNm correspondientes B;

20 las Figuras 2A-L son gráficos que muestran la actividad de fragmentos Fab anti-LRP6 en células HEK293T/17 STF (ensayo de indicador de genes) que expresan ligandos Wnt1 o Wnt3A. Los datos muestran que los Fab anti-LRP6 bloquean selectivamente la señalización de Wnt1 o Wnt3;

25 la Figura 3 muestra los valores de reactividad cruzada de anticuerpos anti-propulsor β 1 y propulsor β 3 de LRP6 para seres humanos, ratones y macacos cangrejeros;

30 la Figura 4 es un gráfico que muestra la expresión transitoria de diversos ligandos WNT en células HEK293T/17 STF (ensayo de indicador de genes) y el tratamiento con anticuerpos anti-LRP6, que muestra la inhibición de la actividad de WNT particulares en función de la unión/bloqueo de anticuerpos a regiones de propulsor β específicas de LRP6;

35 la Figura 5 es un gráfico de barras que muestra que la conversión de Fab en IgG da como resultado la potenciación de la señal del ligando Wnt no bloqueado;

40 la Figura 6 es una transferencia Western que muestra la inhibición de diana selectiva de LRP6 en sistemas celulares;

45 la Figura 7 es un gráfico que muestra una dosis i.v. única de un anticuerpo contra LRP6 que se une a la región del propulsor β 1 a 5 mg/kg en un roedor;

50 la Figura 8A es una tabla que muestra genes en tumores MMTV-Wnt1 que estaban regulados positivamente >2 veces con respecto al control t=0 con un valor P ajustado de <0,01 y la Figura 8B es una tabla que muestra genes que estaban regulados a la baja >2- veces con respecto al control t = 0 con un valor P ajustado de <0,01 8 h después de la administración de una dosis única de MOR08168 (5 mg/kg) a ratones portadores de tumores MMTV-Wnt1;

55 la Figura 9A es un gráfico que muestra que el mAb contra Propulsor 1, pero no contra Propulsor 3, provoca la regresión tumoral *in vivo* en el modelo de MMTV-Wnt1. La Figura 9B es un gráfico que muestra el efecto de diferentes dosis del mAb contra Propulsor 1 sobre el crecimiento del modelo de tumor MMTV-Wnt1;

60 la Figura 10 es un gráfico que muestra que el mAb contra Propulsor 3, pero no contra Propulsor 1, provoca la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de MMTV-Wnt3;

65 la Figura 11 es un gráfico que muestra que el mAb contra Propulsor 3, pero no contra Propulsor 1, provoca la inhibición de la actividad Súper Top Flash inducida por Wnt3A en células PA-1 *in vivo*;

la Figura 12 es una figura que muestra regiones protegidas con disolvente de PD3-4 de LRP6 por MOR06475 mediante HDx (del inglés *hydrogen-deuterium exchange*, intercambio de hidrógeno-deuterio) MS (A) y que las mutaciones de restos específicos dan como resultado la pérdida de unión de scFv MOR06475 (B);

la Figura 13 es un esquema que muestra las regiones de propulsor β de LRP6;

la Figura 14 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra que todas las moléculas de scFv se expresaron y purificaron satisfactoriamente a partir de *E. coli*;

las Figuras 15 A-D son ejemplos esquemáticos de anticuerpos multivalentes. (15A) scFv scFv unido al extremo C de la IgG completa (15B) scFv scFv unido al extremo N de Fc (15C) scFv scFv unido al extremo C de Fc (15D) scFv scFv unido al extremo N y C de Fc;

5 la Figura 16 es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra scFv de IgG anti-LRP6 biparatópico purificado en condiciones no reducidas (carril 1) y reducidas (carril 2);

10 la Figura 17 muestra la actividad en el ensayo de STF de un anticuerpo biparatópico y sus partes componentes respectivas por separado;

15 la Figura 18 muestra la actividad en el ensayo de STF de las comparaciones de longitud del enlazador en moléculas de scFv;

20 la Figura 19 es una tabla que muestra la actividad de unión de un anticuerpo biparatópico;

25 la Figura 20 muestra la actividad de un anticuerpo biparatópico y un anticuerpo contra Prop3 pero no un anticuerpo contra Prop1 en un modelo de cocultivo de células PA-1/Wnt3a L;

30 la Figura 21 es un gráfico que muestra una comparación entre dosis i.v. únicas de un anticuerpo contra Prop1 LRP6 y un anticuerpo biparatópico contra Prop 1/3 a 5 mg/kg en un roedor;

35 la Figura 22 es un gráfico que muestra que los anticuerpos contra Propulsor 1 y contra propulsor 1/3 biparatópico provocan la regresión tumoral *in vivo* en modelo de MMTV-Wnt1;

40 la Figura 23 es un gráfico que muestra la relación dosis-respuesta de un anticuerpo biparatópico de unión a Prop 1/3 en el modelo de MMTV-Wnt1;

45 la Figura 24 muestra que la diferenciación de tumores mamarios MMTV-Wnt1 murinos es inducida por anticuerpos contra LRP6 antagonistas. A-B) Se implantaron subcutáneamente fragmentos de tumores MMTV-Wnt1 en ratones atípicos. Los ratones portadores de tumores se trajeron con una dosis única de PBS (control) o 5 mg/kg de MOR08168IgG1LALA 6475 scfv. A) Imágenes representativas de tinción con Aceite Rojo O para lípidos. B) Cuantificación de la tinción con Aceite Rojo O. El gráfico representa valores de media ± ETM. n=4 en el grupo de 72 horas, n=3 en el grupo de 24 horas, n=2 en el grupo de 5 días y n=1 para PBS (control);

50 la Figura 25 es un gráfico que muestra la actividad del anticuerpo biparatópico de unión a Prop 1/3 en el modelo de xenoinjerto de MDA-MB231 negativo para cadherina E;

55 la Figura 26 muestra la afinidad y la cinética de unión de MOR08168, MOR06475 y MOR08168IgG1LALA 6475 scfv a PD1/2 y PD3/4 de LRP6 recombinantes. A) sumario tabla de las afinidades y las tasas de activación/desactivación determinadas mediante el análisis de Biacore. B) curvas de unión representativas de las moléculas anti-LRP6 para los correspondientes dominios del receptor LRP6, PD1/2 y PD3/4. C) unión secuencial de PD1/2 y PD3/4 de LRP6 a MOR08168IgG1LALA 6475 scfv;

60 la Figura 27 muestra un dibujo esquemático de anticuerpos biparatópicos basados en IgG;

65 la Figura 28 son fotografías de geles de SDS-PAGE que muestran la optimización de la expresión de scFv anti-LRP6 en *E. coli*;

la Figura 29 es una tabla que muestra el efecto de mutaciones únicas en MOR06475 scFv sobre la Tm;

la Figura 30 es una tabla que muestra el efecto de mutaciones únicas en MOR08168 scfv sobre la Tm;

la Figura 31 es una tabla que muestra el efecto de mutaciones dobles en MOR08168 scFv sobre la Tm en material expresado en sistemas tanto bacterianos como de mamíferos;

la Figura 32 es una tabla que resume las actividades funcionales y de unión de las versiones de TIPO SILVESTRE y con mutación única/doble de scFv MOR06475 y MOR08168 en ensayos ELISA, de afinidad por Proteon y de gen indicador de STF;

la Figura 33 es una ilustración de ejemplos seleccionados de las mutaciones diseñadas. En todas las figuras, la cadena principal de la proteína se representa en un diagrama de cinta, mientras que las cadenas laterales seleccionadas se representan como barras. (a): En el modelo de homología de scFv6475, VH:I37 está cerca de dos restos aromáticos, que eran VL:F98 y VH:W103. (b) En el mutante VH:I37F de scFv6475, VH:F37 y VH:W103 podrían formar una interacción de apilamiento pi-pi perpendicular, mientras que VH:F37 y VL:F98 podrían formar

5 otra interacción de apilamiento pi-pi perpendicular. (c) En el modelo de homología de scFv8168, el resto hidrófobo VH:V33 está cerca de un resto polar VH:N100a. (d) En el mutante VH:V33N de scFv8168, la cadena lateral VH:N33 podría formar un enlace de hidrógeno con VH:N100a, sugerido mediante modelado por homología. El enlace de hidrógeno entre los dos restos se ilustra mediante un enlace. (e): En el modelo de homología de scFv8168, el resto cargado VH:K43 no formaba un puente salino con el resto hidrófobo VH:V85. (f): Las dos cadenas laterales cargadas de VH:K43 y VH:E85 podrían formar un puente salino debido a la mutación VH:V85E en scFv8168. La distancia entre los dos grupos de carga podría ser de 2,61 Å; y

10 la Figura 34 es una tabla que muestra mediciones de termoestabilidad de anticuerpos biparatópicos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

15 Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

20 La expresión "respuesta inmunitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y el complemento) que provoca daño selectivo en, destrucción de o eliminación del organismo humano de los patógenos invasores, las células o tejidos infectados con patógenos, las células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

25 La expresión "vía de transducción de señales" o "actividad de señalización", como se usa en el presente documento, se refiere a una relación causal bioquímica generalmente iniciada por una interacción proteína-proteína tal como la unión de un factor de crecimiento a un receptor, dando como resultado la transmisión de una señal desde una parte de una célula a otra parte de una célula. Para LRP6, la transmisión implica la fosforilación específica de uno o más restos de tirosina, serina o treonina en una o más proteínas de la serie de reacciones que causan la transducción de señales. Los penúltimos 30 procesos normalmente incluyen eventos nucleares, dando como resultado un cambio en la expresión génica.

35 La expresión "vía de señalización de Wnt", como se usa en el presente documento, se refiere a la vía de Wnt canónica en la que los miembros de la familia Wnt de ligandos de proteína secretada se unen a un complejo receptor de LRP y Frizzled (FZD) permitiendo que la catenina β se transloque al núcleo, interactúe con los factores de transcripción LEF/TCF y active la expresión del gen diana. La vía de señalización de Wnt se puede medir utilizando un ensayo de gen indicador de Wnt u otra medida de señalización dirigida por Wnt (por ejemplo, fosforilación de LRP6, estabilización de catenina β y translocación nuclear, proliferación/supervivencia celular) como se describe en el presente documento.

40 La expresión "vía de señalización de Wnt 1" se refiere a una vía de Wnt canónica que se activa mediante la interacción de LRP6 con el ligando Wnt1 y la clase de ligandos de unión Wnt1, tales como Wnt2, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt9a, Wnt10a o Wnt10b.

45 La expresión "vía de señalización de Wnt 3" se refiere a una vía de Wnt canónica que se activa mediante la interacción de LRP6 con el ligando Wnt3 o Wnt3a.

El término LRP6 se refiere a LRP6 humana como se define en el N.º de acceso NP002327.

50 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos enteros que interactúan con (por ejemplo, por unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítopo de LRP6 e inhiben la transducción de señales. Un "anticuerpo" de origen natural es una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada una de las cadenas ligeras se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico. El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos químéricos, Fv monocatenarios (scFv), Fv unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab') y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los

anteriores. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

5 Tanto la cadena ligera como la pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las partes tanto de la cadena ligera (VL) como de la pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que están más distales
10 del sitio de unión al antígeno o del extremo amino del anticuerpo. El extremo N es una región variable y el extremo C es una región constante; los dominios CH3 y CL en realidad comprenden el extremo carboxí de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

15 La expresión "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más partes de un anticuerpo que conservan la capacidad de interactuar específicamente (por ejemplo, mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) con un epítopo de LRP6 e inhiben la transducción de señales. Los ejemplos de fragmentos de unión incluyen, pero sin limitación, un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

20 25 Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes diferentes, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permita ser preparados como una única cadena proteica en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (que se conocen como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, a Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883). Se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios también queden abarcados en la expresión "fragmento de anticuerpo". Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales 30 conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se criban en función de su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

35 Los fragmentos de anticuerpos también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) *Nature Biotechnology* 23: 1126-1136). Pueden injertarse fragmentos de anticuerpos en armazones basados en polipéptidos tales como Fibronectina tipo III (Fn3) (véase la Patente de EE.UU. N.º 6.703.199, que describe monocuerpos contra polipéptidos de fibronectina).

40 Se pueden incorporar fragmentos de anticuerpos en moléculas de una única cadena que comprenden un par de segmentos Fv en tandem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, junto con polipéptidos complementarios de la cadena ligera, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al., (1995) *Protein Eng.* 8:1057-1062; y la Patente de EE.UU. N.º 5.641.870).

45 La expresión "anticuerpo multivalente" se refiere a una única molécula de unión con más de una valencia, en donde "valencia" se describe como el número de fracciones de unión a antígeno presentes por molécula de una construcción de anticuerpo. Como tal, la molécula de unión única se puede unir a más de un sitio de unión en un receptor diana. Los ejemplos de anticuerpos multivalentes incluyen, pero sin limitación, anticuerpos bivalentes, anticuerpos trivalentes, anticuerpos tetravalentes, anticuerpos pentavalentes y similares, así como a anticuerpos biespecíficos y anticuerpos biparatápicos. Por ejemplo, para el receptor LRP6, el anticuerpo multivalente (por ejemplo, un anticuerpo biparatápico 50 contra LRP6) tiene una fracción de unión para el sitio de unión del dominio del propulsor β 1 y una fracción de unión para el sitio de unión del dominio del propulsor β 3 de LRP6, respectivamente.

55 La expresión "anticuerpo multivalente" también se refiere a una única molécula de unión que tiene más de una fracción de unión a antígeno para dos receptores diana separados. Por ejemplo, un anticuerpo que se une tanto a un receptor diana LRP6 como a un segundo receptor diana que no es LRP6 (tales como los receptores ErbB, cmet, IGFR1, Smoothened, Notch). Un anticuerpo multivalente puede ser un anticuerpo tetravalente que tiene cuatro dominios de unión al receptor. Una molécula tetravalente puede ser biespecífica y bivalente para cada sitio de unión en ese receptor diana.

60 El anticuerpo multivalente media un efecto biológico (por ejemplo, que modula la activación celular (por ejemplo, mediante la unión a un receptor de la superficie celular y dando como resultado la transmisión o inhibición de una señal inhibidora o activadora), que da como resultado la muerte de la célula (por ejemplo, mediante una vía inducida por la señal celular), o que modula una enfermedad o trastorno en un sujeto (por ejemplo, mediando o promoviendo la muerte celular, o modulando la cantidad de una sustancia que está biodisponible).

La expresión "anticuerpo monovalente", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a un único epítopo en un receptor diana tal como LRP6.

5 La expresión "anticuerpo bivalente", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos en al menos dos receptores diana idénticos (por ejemplo, un anticuerpo que se une al dominio del propulsor β 1 de dos receptores LRP6, o un anticuerpo que se une al dominio propulsor β 3 de dos receptores LRP6). El anticuerpo bivalente también puede entrecruzar los receptores diana entre sí. Un "anticuerpo bivalente" también se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos diferentes en al menos dos receptores diana idénticos.

10 La expresión "anticuerpo biparatópico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos diferentes en el mismo receptor diana, por ejemplo, un anticuerpo que se une al dominio del propulsor β 1 y al dominio del propulsor β 3 de un único receptor LRP6. La expresión también incluye un anticuerpo que se une a ambos dominios propulsor β 1 y propulsor β 3 de al menos dos receptores LRP6.

15 La expresión "anticuerpo biespecífico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a dos o más epítopos diferentes en al menos dos receptores diana diferentes (por ejemplo, un receptor LRP6 y un receptor que no es un receptor LRP6).

20 La expresión "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigenicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a LRP6 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de LRP6). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a LRP6 puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas LRP6 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar 25 sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en el presente documento, se refieren a polipéptidos, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, etc. que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica o derivan de la misma fuente genética. Esta expresión 30 también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítopo particular.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco conservadas como las CDR derivan de secuencias de origen humano. 35 Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de dichas secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la estirpe germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la estirpe germinal humana o anticuerpos que contienen secuencias marco de consenso derivadas del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik, *et al.* (2000. *J Mol Biol* 296, 57-86). Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, las CDR, pueden definirse utilizando esquemas de numeración 40 bien conocidos, por ejemplo, el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia o una combinación de Kabat y Chothia (véase, por ejemplo, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services (1991), ed. Kabat *et al.*; Al Lazikani *et al.*, (1997) *J. Mol. Biol.* 273:927-948); Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a edic., Publicación del NIH N.º 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia *et al.*, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, (1989) *Nature* 342:877-883; y 45 Al-Lazikani *et al.*, (1997) *J. Mol. Biol.* 273:927-948.

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos para su uso de acuerdo con la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*, o una sustitución conservadora para promover la estabilidad o fabricación). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que 55 tienen una especificidad de unión única, que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco conservadas como las CDR derivan de secuencias humanas. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

60 La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios de recombinación genética, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulinas humanas o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada 65 para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca

recombinante, combinatoria de anticuerpos humanos, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique cortar y empalmar todo o una parte de secuencias de un gen de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que el marco y las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. En determinadas 5 realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias V_H y V_L de estirpe germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro 10 del repertorio de estirpe germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

10 El término "enlazador", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido enlazador que consiste en restos de glicina y serina utilizados para unir un scFv a una IgG. Un enlazador Gly/Ser ilustrativo comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Ser)_n, es decir, (Gly₂ Ser)_n donde n es un número entero positivo igual o superior a 1. Por ejemplo, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 y n=6, n=7, n=8, n=9 y n=10. En una realización, los enlazadores incluyen, pero sin limitación, 15 (Gly₄ Ser)₄ o (Gly₄ Ser)₃. En otra realización, los restos de Glu y Lys de los enlazadores se intercalaron dentro de los enlazadores de Gly-Ser para una mejor solubilidad. En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly₂Ser), (GlySer) o (Gly₃Ser). En otra realización, los enlazadores incluyen combinaciones y múltiples de (Gly₃Ser)+(Gly₄Ser)+(GlySer). En otra realización, Ser puede reemplazarse por Ala, por ejemplo, (Gly₄Ala) o (Gly₃Ala). En otra realización, el enlazador comprende cualquier combinación de Gly, Ser y Pro. En otra realización más, el enlazador 20 comprende el motivo (GluAlaAlaAlaLys)_n, donde n es un número entero positivo igual o superior a 1.

La expresión "región Fc", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende CH3, CH2 y al menos una parte de la región bisagra de un dominio constante de un anticuerpo. Opcionalmente, una región Fc puede 25 incluir un dominio CH4, presente en algunas clases de anticuerpos. Una región Fc puede comprender la región bisagra completa de un dominio constante de un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo comprende una región Fc y una región CH1 de un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo comprende una región Fc y una región CH3 de un anticuerpo. En otra realización, el anticuerpo comprende una región Fc, una región CH1 y una región Ckappa/lambda del dominio constante de un anticuerpo. Una molécula de unión puede comprender una región constante, por ejemplo, una 30 región constante de cadena pesada. Dicha región constante puede modificarse en comparación con una región constante de tipo silvestre. Es decir, los polipéptidos pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio de región constante de cadena ligera (CL). Las modificaciones ilustrativas incluyen adiciones, supresiones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Dichos cambios pueden incluirse para optimizar la función efectora, la semivida, etc.

35 La expresión "sitio de unión", como se usa en el presente documento, comprende un área en un receptor diana a la que se une selectivamente un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno. Por ejemplo, los sitios de unión en LRP6 incluyen el dominio de unión propulsor β 1, el dominio de unión propulsor β 2, el dominio de unión propulsor β 3 y el dominio de unión propulsor β 4.

40 El término "epítopo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier determinante capaz de unirse con alta afinidad a una inmunoglobulina. Un epítopo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo que se dirige específicamente a ese antígeno y, cuando el antígeno es una proteína, incluye aminoácidos específicos que entran en contacto directamente con el anticuerpo. Muy a menudo, los epítopos residen en proteínas, pero en algunos casos, 45 pueden residir en otros tipos de moléculas, tales como ácidos nucleicos. Los determinantes de epítopo pueden incluir agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas.

50 Generalmente, los anticuerpos específicos para un antígeno diana particular se unirán a un epítopo sobre el antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítopo se pueden identificar utilizando cualquier número de técnicas de cartografiado de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols* en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos 55 lineales se pueden determinar, por ejemplo, sintetizando simultáneamente un gran número de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están fijados a los soportes. Dichas técnicas son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 4.708.871; Geysen *et al.*, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:3998-4002; Geysen *et al.*, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:78-182; Geysen *et al.*, (1986) *Mol. Immunol.* 23:709-715. De 60 manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de los aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, citado anteriormente. Las regiones antigenéticas de las proteínas también 65 se pueden identificar utilizando gráficos convencionales de antigenicidad e hidropatía, tales como aquellos calculados utilizando, por ejemplo, el programa informático Omiga versión 1.0 disponible en Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el método de Hopp/Woods, Hopp *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824-3828; para

determinar perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte *et al.*, (1982) *J.Mol. Biol.* 157:105-132; para gráficos de hidropatía.

5 La expresión "unión específica" entre dos entidades significa una unión con una constante de equilibrio (K_A) ($K_{\text{activación}}/K_{\text{desactivación}}$) de al menos 10^2 M^{-1} , al menos $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^3 M^{-1} , al menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^4 M^{-1} al menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^5 M^{-1} , al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^6 M^{-1} , al menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^7 M^{-1} , al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^8 M^{-1} , al menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^9 M^{-1} , al menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{10} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{11} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{12} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{13} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{14} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{15} M^{-1} o al menos $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$.

10 La expresión "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra LRP6) se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de un antígeno afín (por ejemplo, una LRP6 humana) en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Además de la constante de equilibrio (K_A) indicada anteriormente, un anticuerpo contra LRP6 normalmente también tiene una constante de velocidad de disociación (K_D) ($K_{\text{activación}}/K_{\text{desactivación}}$) de menos de $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, menos de 10^{-2} M , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, menos de 10^{-3} M , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, menos de 10^{-4} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de 10^{-6} M , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de 10^{-7} M , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de 10^{-8} M , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menos de 10^{-9} M , menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menos de 10^{-10} M , menos de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menos de 10^{-11} M , menos de $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, menos de 10^{-12} M , menos de $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, menos de 10^{-13} M , menos de $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, menos de 10^{-14} M , menos de $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ o menos de 10^{-15} M o inferior, y se une a LRP6 con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, HSA). El anticuerpo contra LRP6 puede tener una constante de disociación (K_d) de menos de 3000 pM, menos de 2500 pM, menos de 2000 pM, menos de 1500 pM, menos de 1000 pM, menos de 750 pM, menos de 500 pM, menos de 250 pM, menos de 200 pM, menos de 150 pM, menos de 100 pM, menos de 75 pM, menos de 10 pM, menos de 1 pM como se evalúa utilizando un método descrito en el presente documento o conocido por un experto en la materia (por ejemplo, un ensayo BIACore, ELISA, FACS, SET) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia).

15 El término " K_{asoc} " o " K_a ", como se usa en el presente documento, se refiere a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se usa en el presente documento, se refiere a la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término " K_D ", como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es la utilización de la resonancia de plasmones superficiales, o la utilización de un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

20 30 35 40 45 50 55 60

El término "afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigenicos individuales. Dentro de cada sitio antigenico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad.

El término "avidez" como se usa en el presente documento se refiere a una medida informativa de la estabilidad general o fuerza del complejo anticuerpo-antígeno. Está controlada por tres factores principales: afinidad del epítopo del anticuerpo; la valencia tanto del antígeno como del anticuerpo; y la disposición estructural de las partes que interactúan. En última instancia, estos factores definen la especificidad del anticuerpo, es decir, la probabilidad de que el anticuerpo particular se una a un epítopo antigenico preciso.

La expresión "anticuerpo antagonista", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a LRP6 e inhibe la actividad biológica de la señalización canónica de Wnt, por ejemplo, reduce, disminuye y/o inhibe la actividad de señalización inducida por LRP6 en un ensayo de gen indicador de Wnt, o un ensayo de fosfo LRP6. Se describen ejemplos de ensayos con más detalle en los Ejemplos a continuación. En algunas realizaciones, los anticuerpos reducen, disminuyen o inhiben la actividad inducida por LRP6 medida en un ensayo de gen indicador de Wnt en una IC_{50} de 10 nM o menos, 1 nM o menos, o 100 pM o menos, 10 pM, 1 pM, 0,5 pM, 0,1 pM. En algunas realizaciones, las actividades de los anticuerpos se pueden medir mediante la unión a LRP6 utilizando SET, ELISA, FACS, Scatchard en una IC_{50} de 10 nM o menos, 1 nM o menos, 0,5 pM o 100 pM o menos. En una realización, la IC_{50} es inferior a 300 μM (0,3 pM). En otra realización, la IC_{50} es igual a 300 μM (0,3 pM).

El término "Wnt 1", como se usa en el presente documento, se refiere a Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt9a, Wnt10a o Wnt10b.

El término "Wnt 3a", como se usa en el presente documento, se refiere a Wnt3a y Wnt3.

El término "potenciar", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante el cual la señal de Wnt se activa y mejora tras la conversión de un fragmento de un anticuerpo en un anticuerpo IgG contra LRP6 de longitud completa en presencia de un ligando Wnt.

La expresión "potenciación no significativa" o "evita la potenciación" se refiere a una señal de Wnt que no se activa ni mejora en comparación con un anticuerpo de control o fragmento del mismo que se une al mismo epítopo. Ninguna potenciación significativa puede ser al menos un 10 % inferior a la del anticuerpo de control o fragmento del mismo, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 % inferior a la del anticuerpo de control o fragmento del mismo.

5 El término "grupo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína que reúna o agrupe los receptores LRP6 y potencie la señalización de Wnt. Los ejemplos de dichas proteínas incluyen, pero sin limitación, 10 ligandos Wnt 1, ligandos Wnt 3a y ligandos Wnt 3. Estas proteínas pueden provocar multimerización, por ejemplo, dimerización de dos receptores LRP6 endógenos. Esta dimerización puede dar como resultado una mayor avidez debido a las interacciones aumentadas de LRP6, que en presencia de un ligando Wnt pueden potenciar una señal de Wnt.

15 La expresión "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen especificidades antigenicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a LRP6 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de LRP6). Sin embargo, 20 un anticuerpo aislado que se une específicamente a LRP6 puede tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

25 La expresión "variante modificada conservadoramente" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de los ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas conservadoramente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos 30 funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservadoramente. 35 Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada una de las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada una de las secuencias descritas.

40 Para las secuencias polipeptídicas, las "variantes modificadas conservadoramente" incluyen sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia polipeptídica que dan como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas conservadoramente se suman y no excluyen las variantes polimórficas, los homólogos entre especies y los alelos. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparragina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)). La expresión "modificaciones de secuencia conservadoras" se usa para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

45 45 Las expresiones "bloquear de forma cruzada", "bloqueado de forma cruzada" y "bloqueo cruzado" se usan indistintamente en el presente documento para indicar la capacidad de un anticuerpo u otro agente de unión de interferir con la unión de otros anticuerpos o agentes de unión a LRP6 en un ensayo de unión competitiva convencional.

50 50 La capacidad o el grado en que un anticuerpo u otro agente de unión es capaz de interferir con la unión de otro anticuerpo o molécula de unión a LRP6 y, por lo tanto, si puede decirse que la bloquea de forma cruzada, se puede determinar utilizando ensayos de unión por competencia convencionales. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, utilizando el instrumento BIACore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el grado de las interacciones utilizando la tecnología de resonancia de plasmones superficiales. Otro ensayo para medir el bloqueo cruzado utiliza una estrategia basada en ELISA.

55 60 El término "optimizado", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos que ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que se prefieren en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia*, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se genomanipula para que conserve por completo o en la mayor medida posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "parental".

65 Se conocen en la técnica ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos con LRP6 de diversas especies, incluyendo, por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia de tipo Western y RIA. Se describen en detalle

ensayos adecuados en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) de los anticuerpos también se puede evaluar mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, como el análisis Biacore o la afinidad relativa por FACS (Scatchard). En los Ejemplos se describen con mayor detalle ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos sobre las propiedades funcionales de LRP6 (por ejemplo, ensayos de unión al receptor, modulación de la vía de Wnt).

En consecuencia, se entenderá que un anticuerpo que "inhibe" una o más de estas propiedades funcionales de LRP6 (por ejemplo, actividades bioquímicas, inmunoquímicas, celulares, fisiológicas u otras actividades biológicas, o similares) según se determina de acuerdo con metodologías conocidas en la técnica y descritas en el presente documento, se refiere a una disminución estadísticamente significativa en la actividad particular respecto a la observada en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando está presente un anticuerpo de control de especificidad irrelevante). Un anticuerpo que inhibe la actividad de LRP6 efectúa una disminución estadísticamente significativa de este tipo de al menos un 10 % del parámetro medido, de al menos un 50 %, un 80 % o un 90 %, y en determinadas realizaciones puede inhibir más del 95 %, el 98 % o el 99 % de la actividad funcional de LRP6.

Las expresiones "porcentaje idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, el 60 % de identidad, opcionalmente el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad sobre una región especificada o, cuando no se especifica, sobre la secuencia completa), cuando se comparan y se alinean para la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada, como se mide utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferentemente sobre una región que tiene de 100 a 500 o de 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Pueden usarse parámetros por defecto del programa o pueden indicarse parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en 20 a 600, habitualmente de 50 a 200, más habitualmente de 100 a 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para comparación. La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de programas informáticos de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent *et al.*, (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad secuencial y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; y Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El programa informático para realizar análisis BLAST está a disposición del público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica identificar, en primer lugar, las parejas de secuencias con alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. Se hace referencia a T como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul *et al.*, citado anteriormente). Estos aciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que los contengan. Los aciertos de palabra se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en todo lo que pueda aumentar la puntuación acumulada de alineación. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos de emparejamiento erróneo; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La prolongación de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación acumulada de alineación desciende en la cantidad X desde su valor máximo conseguido; la puntuación 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 alguna secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación para ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos,

el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras.

5 El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación 10 del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es de menos de aproximadamente 0,2, más preferentemente de menos de aproximadamente 0,01 y mucho más preferentemente de menos de aproximadamente 0,001.

15 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo 20 de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de programas informáticos GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

25 Aparte del porcentaje de identidad de secuencia indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene una reacción inmunológicamente cruzada con los anticuerpos producidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido normalmente es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos polipéptidos difieren solamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus 30 complementos hibriden entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Otra indicación más de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que puedan usarse los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

35 La expresión "ácido nucleico" se usa en el presente documento indistintamente con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. La expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos nucleotídicos conocidos o restos de la cadena principal o enlaces modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos peptidónucleicos (APN).

40 A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka *et al.*, (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; y Rossolini *et al.*, (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98).

45 La expresión "unido operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Normalmente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está unida operativamente a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula hospedadora apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias reguladoras de la transcripción promotoras que están unidas operativamente a una secuencia transcrita son físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, actúan en *cis*. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras transcripcionales, tales como los potenciadores, no necesitan ser físicamente contiguas o estar ubicadas muy próximas a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

50 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Las expresiones se aplican a polímeros de aminoácidos en que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia polipeptídica particular también abarca de forma implícita variantes modificadas conservadoramente de la misma.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, gallinas, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indique otra cosa, los términos "paciente" o "sujeto" se usan en el presente documento indistintamente.

5

La expresión "agente antineoplásico" significa cualquier agente que se puede usar para tratar un trastorno de proliferación celular tal como el cáncer, incluyendo los agentes citotóxicos, los agentes quimioterápicos, la radioterapia y los agentes radioterápicos, los agentes antineoplásicos dirigidos y los agentes inmunoterápicos.

10

El término "tumor" se refiere a la proliferación y el crecimiento celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

15

La expresión "actividad antitumoral" significa una reducción en la tasa de proliferación, viabilidad o actividad metastásica de las células tumorales. Una forma posible de mostrar actividad antitumoral es mostrar una disminución en la tasa de crecimiento de células anómalas que surge durante la terapia o estabilidad o reducción del tamaño tumoral. Dicha actividad se puede evaluar utilizando modelos tumorales *in vitro* o *in vivo* aceptados, que incluyen, pero sin limitación, modelos de xenoinjerto, modelos de aloinjerto, modelos de MMTV y otros modelos conocidos en la técnica para investigar la actividad antitumoral.

20

La expresión "neoplasia maligna" se refiere a un tumor no benigno o un cáncer. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye una malignidad caracterizada por un crecimiento celular desregulado o descontrolado. Los ejemplos de cánceres incluyen: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas. El término "cáncer" incluye tumores malignos primarios (por ejemplo, aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto que no sean el sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (por ejemplo, los que surgen de la metástasis, la migración de células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

25

Diversos aspectos de la invención se describen con mayor detalle en las siguientes secciones y subsecciones.

LRP6 y la vía de señalización de Wnt

30

La inhibición de la señalización de Wnt por moléculas dirigidas a LRP6 conduce a una pérdida de la señalización de Wnt canónica. Por lo tanto, el antagonismo de la función del receptor LRP6 con un anticuerpo inhibirá la señalización de Wnt y ayudará en enfermedades asociadas a la señalización de Wnt canónica, por ejemplo, el cáncer. En particular, los anticuerpos contra LRP6 pueden aumentar o disminuir específicamente la señalización mediada por proteínas de clase Wnt1 o Wnt3a en diferentes entornos de enfermedad.

35

La regulación errónea de la vía de señalización de Wnt/catenina β se ha relacionado con diversas enfermedades humanas, tales como el cáncer y los trastornos óseos. Las moléculas que restablecen el equilibrio de la señalización de Wnt en estas enfermedades podrían tener potencial terapéutico. Utilizando la selección basada en fagos, se han identificado anticuerpos contra LRP6 que inhiben o mejoran la señalización de Wnt. Sorprendentemente, se han identificado dos clases de anticuerpos antagonistas de LRP6. Una clase de anticuerpos inhibe específicamente las proteínas Wnt representadas por Wnt1, mientras que la segunda clase inhibe específicamente las proteínas Wnt representadas por Wnt3a. Los experimentos de cartografiado de epítopos indican que los anticuerpos contra LRP6 específicos de Wnt1 y específicos de Wnt3a se unen al primer y tercer propulsor de LRP6 respectivamente, lo que sugiere que las proteínas Wnt1 y Wnt3a se unen a diferentes propulsores de LRP6 (véase la publicación internacional N.º 45

45

WO/2009/056634, presentada el 31 de octubre de 2008). La caracterización adicional del dominio Propulsor 3 de LRP6 identificó restos en este dominio responsables de la interacción con los anticuerpos. Los sitios de unión de anticuerpos dentro de la región YWTD-EGF del Propulsor 3 se identificaron utilizando espectrometría de masas (MS) de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx) y corresponden a una superficie cóncava entre la pala 1 y 6 del dominio Propulsor 3.

50

La vía de señalización de Wnt es importante en el desarrollo embrionario y el mantenimiento del tejido posnatal. Esto se logra dirigiendo un conjunto específico de genes que controlan la regulación temporal y espacial del crecimiento celular, el movimiento y la supervivencia celular (revisado en Barker y Clevers (2006) *Nature Rev. 5:997*). La regulación adecuada de esta vía es importante para mantener la homeostasis tisular. La activación crónica de esta vía promueve el crecimiento y la supervivencia celular descontrolados y, en consecuencia, puede impulsar el desarrollo de enfermedades de proliferación celular, tales como el cáncer. Como alternativa, la inhibición anómala de esta vía puede dar como resultado muchas patologías, por ejemplo, pérdida de masa ósea y otras enfermedades óseas. Las proteínas Wnt inician la señalización corriente abajo al interactuar con un receptor Frizzled y uno de los dos receptores de la superficie celular, que son miembros de las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (LRP): LRP5 y LRP6 (revisado en He *et al.*, (2004) *Development 31:1663-1677*).

55

La función de LRP6 en la señalización de Wnt canónica se descubrió a través de estudios genéticos. Los ratones mutantes que carecían de LRP6 presentaron fenotipos compuestos similares a mutaciones en varios genes de Wnt individuales (Pinson *et al.*, (2000) *Nature 407:535-538*). En embriones de *Xenopus*, LRP6 dominante-negativo bloqueó la señalización

de varias proteínas Wnt, mientras que la sobreexpresión de LRP6 activó la señalización de Wnt/catenina β (Tamai *et al.*, (2000) *Nature* 407:530-535). Además, se ha demostrado que la expresión de LRP6 o LRP5 es necesaria para que las células respondan a la señalización de Wnt canónica (revisado en He *et al.*, citado anteriormente, 2004).

5 LRP5 y LRP6 son altamente homólogas y comparten un 73 % y un 64 % de identidad en sus dominios extracelulares e intracelulares, respectivamente. Se coexpresan ampliamente durante la embriogénesis y en tejidos adultos y comparten determinada redundancia funcional.

10 Los dominios extracelulares de LRP5 y LRP6 comprenden tres dominios básicos: 1) una región de propulsor β de tipo YWTD (tirosina, triptófano, treonina, ácido aspártico), 2) un dominio similar a EGF (factor de crecimiento epidérmico) y 3) un dominio LDLR de tipo A (LA).

15 La región de propulsor β de tipo YWTD contiene seis repeticiones de YWTD de 43-50 restos de aminoácidos cada una y forma una estructura de propulsor β de seis palas. En LRP5 y LRP6, hay cuatro regiones de propulsor β de tipo YWTD, cada una seguida de un dominio similar a EGF, que comprende aproximadamente 40 restos de aminoácidos con restos de cisteína conservados, que a su vez van seguidos de tres dominios LA. (Springer *et al.*, (1998) *J. Mol. Biol.* 283:837-862; Jeon *et al.*, (2001) *Nat. Struct. Biol.* 8:499-504). Los dominios similares a propulsor β -EGF se pueden unir a ligandos extracelulares. El dominio extracelular de LRP6 está definido por los restos de aminoácidos 19 a 1246 y contiene cuatro dominios propulsor β en los restos de aminoácidos 43-324, 352-627, 654-929 y 957-1250, que corresponden a las 20 regiones de propulsor β 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Los dominios Propulsor 1-2 incluyen los aminoácidos 19-629, y los dominios Propulsor 3-4 incluyen los aminoácidos 631-1246.

Anticuerpos contra LRP6

25 Los anticuerpos que se unen específicamente a LRP6 pueden ser LRP6 humana, LRP6 de macaco cangrejero, LRP6 de ratón y LRP6 de rata. La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que las proteínas Wnt capaces de activar la señalización de catenina β se pueden dividir en dos clases y requieren diferentes propulsores de LRP6 para la señalización, como se describe en la Publicación Internacional N.º WO/2009/056634, presentada el 31 de octubre de 2008. Además, los anticuerpos contra LRP6 diméricos/bivalentes (por ejemplo, IgG) sensibilizan fuertemente a las células frente a la 30 señalización de Wnt, por ejemplo, a través de la dimerización de LRP6 endógena. Estos resultados sugieren que Propulsor 1 y Propulsor 3 se requieren de manera diferenciada para la actividad de señalización de Wnt1 y Wnt 3. Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre la activación de LRP6 inducida por Wnt y allanan el camino para el desarrollo de anticuerpos contra LRP6 para modular la señalización de Wnt en diferentes enfermedades. La conversión de 35 fragmentos de los anticuerpos contra LRP6 (por ejemplo, Fab) en un formato de IgG da como resultado un anticuerpo que agrupa a los receptores LRP6 y, en presencia de una proteína ligando, puede potenciar una señal de Wnt.

En la invención, los anticuerpos evitan potenciar una señal de Wnt. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen específicamente a LRP6 tanto humana como de macaco cangrejero. Los anticuerpos contra LRP6 pueden ser anticuerpos antagonistas.

40 Como diferentes proteínas Wnt requieren diferentes Propulsores de LRP6 para la señalización y debido a que la agrupación o dimerización de LRP6 potencia la señalización de Wnt, la terapia que usa los anticuerpos contra LRP6 se puede regular utilizando diferentes combinaciones de anticuerpos.

45 Los anticuerpos contra LRP6 se pueden usar como anticuerpos multiméricos o fragmentos de los mismos tales como anticuerpos contra LRP6 biespecíficos y biparatápicos.

Además de los ligandos Wnt, se espera que los anticuerpos contra Propulsor 1 de LRP6 inhiban la interacción con otros 50 ligandos de unión a Propulsor 1 (por ejemplo, Esclerostina, Dkk1). De manera similar, se espera que los anticuerpos contra Propulsor 3 inhiban la interacción con otros ligandos de unión a Propulsor 3 (por ejemplo, Dkk1). Además, se puede esperar que los anticuerpos de unión a propulsor 1 y 3 afecten a la actividad de otros moduladores de la señalización de Wnt, por ejemplo, espondinas R. Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) pueden comprender una CDR de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR de VH enumeradas en la Tabla 1, más abajo. Los anticuerpos que se unen específicamente a una 55 proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) pueden comprender (o, como alternativa, consistir en) una, dos, tres, cuatro, cinco o más CDR de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR de VH enumeradas en la Tabla 1, más abajo.

60 Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) pueden comprender un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 34, 36, 44, 60 y 62. Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) pueden comprender un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 33, 35, 43, 59 y 61.

65 Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) pueden comprender un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 82, 89, 106, 108, 128, 130

y 138. Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) pueden comprender un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 81, 90, 105, 107, 127 y 129.

5 En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen aminoácidos que se han mutado, pero que tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, manteniendo al mismo tiempo su especificidad por el epítopo del anticuerpo original.

10 En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen aminoácidos que se han mutado, pero tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad en las regiones marco conservadas con las regiones marco conservadas representadas en las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en las que no se han mutado más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos en las regiones marco conservadas en comparación con las regiones marco conservadas representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, manteniendo al mismo tiempo su especificidad por el epítopo del anticuerpo original.

20 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos se pueden unir específicamente a una proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero). Dichas secuencias de ácidos nucleicos pueden optimizarse para la expresión en células de mamíferos (por ejemplo, la Tabla 1 para MOR08168, MOR08545 y MOR06706 para anticuerpos contra propulsor β 1 y MOR06475, MOR08193 y MOR08473 para anticuerpos contra propulsor β 3).

25 Los anticuerpos contra LRP6 se pueden unir a distintas regiones de propulsor β de LRP6. Los anticuerpos contra Propulsor 1 se unen al dominio propulsor β 1 y bloquean Wnt dependientes de Propulsor1 tales como Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt9, Wnt10A, Wnt10B. Los anticuerpos contra Propulsor 3 se unen al dominio propulsor β 3 y bloquean Wnt dependientes de Propulsor 3, tales como Wnt3a y Wnt3.

30 Tabla 1: Ejemplos de anticuerpos contra LRP6

ES 2 949 159 T3

NÚMERO de SEQ ID	Región del Ab	Secuencia
MOR08168 Prop1		
SEQ ID NO: 1 (Kabat)	HCDR1	DYVIN
SEQ ID NO: 2 (Kabat)	HCDR2	GISWSGVNTHYADSVKG
SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	LGATANNIRYKFMDV
SEQ ID NO: 4 (Kabat)	LCDR1	SGDSLRLNKVY
SEQ ID NO: 5 (Kabat)	LCDR2	KNNRPS
SEQ ID NO: 6 (Kabat)	LCDR3	QSYDGQKSLV
SEQ ID NO: 7 (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO: 8 (Chothia)	HCDR2	SWSGVN
SEQ ID NO: 9 (Chothia)	HCDR3	LGATANNIRYKFMDV
SEQ ID NO: 10 (Chothia)	LCDR1	DSLRLNK
SEQ ID NO: 11 (Chothia)	LCDR2	KN
SEQ ID NO: 12 (Chothia)	LCDR3	YDGQKSL
SEQ ID NO: 13	VL	DIELTQPPSVVAPGQTARISCGDSLRLNKVYWYQQKPGQAPVVLVYKNNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 14	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKGLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWGGTLTVSS
SEQ ID NO: 15	VL de ADN	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCCTCAGTGAGCGTTGCACCAAGGTCAAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGC GATTCTCTCGTAATAAGTTTATTGGTACCAAGCAGAAACCCGGCAGGGCCAGTTCTGTGATTATAAGA ATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGAACGCTTACGGGATCCAACAGCGGAAACACCGCGACCCCTGACCCATTAG CGGCACACTCAGGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTATGCCAGTCTTATGATGGTCAGAAGTCTCTGTGTTGGC GGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 16	VH de ADN	<p>CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCCGGCGCCTGGTCAACCGGGCGGAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGC CTCCGGATTACCTTCTGATTATGTTATAATTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGAAAGGGTCTCGAGTGGGT AGCGGTATTCTGGTCTGGTTAATACTCATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTCACGTGAT AATTGAAAAACACCCGTATCTGCAAATGAACAGCTGCGGAAAGATAAGCCGTGATTATTGCGCG GTCTGGTCTACTGCTAATAATTGTTAAGTTATGGATTTGGGCAAGGACCCGTGAGGGT TAGCTCA</p>
SEQ ID NO: 17	Lambda ligera	<p>DIELTQPPSVVAPGQTARISCGDSLRLNKVYWYQQKPGQAPVLVYKNNRPSGIPERFSGNSNGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTQLVLPQPKAAPSVLFPSSSEELQANKATLVLISDFYPGAVTVAKDSSP VKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>
SEQ ID NO: 18	IgG1 pesada LALA	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPKGKLEWVSGISWGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWGGTQLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAAL GCLVKDYLFPPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVTPVSSSLGTQTYICNVNHPKNSNTKVDKRPEKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPDTLMISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVTPLPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHTQKSLSLSP GK</p>
SEQ ID NO: 19	ADN de lambda ligera	<p>GATATCGAACTGACCCAGCCCTTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTAGACCGCGCGTATCTCGTGTAGCGGC GATTCTCTCGTAAATAAGTTTATTGTAACAGCAGAAACCCGGCGAGGCGCAGTTCTGTTGATTATAAGA ATAATCGTCCCTCAGGCATCCCGAACGCTTAGCGGATCCAACAGCGGAAACACCGCGACCCCTGACCATAG CGGGACTCAGGGCGGAAGACGAAGCGGATTATTGCGAGTCTATGATGGTCAGAAGTCTCTGTGTTGGC GGGCGCACGAAGTAAACCGCTTAGGTAGCAGCCAAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTGTCTCCGCCCTCCTCTG AGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAGTACTTCTACCCGGAGCCGTGACAGTGG CCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCAAACAAAGCAACAAAC AAGTACGCGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACCGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAG GTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA</p>
SEQ ID NO: 20	ADN de IgG1 pesada LALA	<p>CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCCGGCGCCTGGTCAACCGGGCGGAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGC CTCCGGATTACCTTCTGATTATGTTATAATTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGAAAGGGTCTCGAGTGGGT AGCGGTATTCTGGTCTGGTTAATACTCATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTCACGTGAT AATTGAAAAACACCCGTATCTGCAAATGAACAGCTGCGTGGAAAGATAAGCCGTGATTATTGCGCG GTCTGGTCTACTGCTAATAATTGTTAAGTTATGGATTTGGGCAAGGACCCCTGGTACGGGT TAGCTCAGCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTCCCTGGCACCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGGACA GCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCGAAGGGTACGGGTGCTGGAACTCAGCGCCCTG ACCAGCGCGTGCACACCTCCCGTGTCTCACAGTCTCAGGACTCTACCTCCCTAGCAGCGTGGTACCG TGCCCTCCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTAACTCACACGCCACCGTGCACCTGAAGCAGCG ACAAGAGAGTTGAGCCAATCTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCACCTGAAGCAGCG GGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTAC ATGCGTGGTGGGAGCTGAGGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGTCAGTGGACGGGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGGTCTC GTCTCGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCGCC ATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTCACCCCTGCCCCATCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCGAGTCAGCTGACCTGGCTGGTCAAGGCTTATCCAGCGACATCGCGTG GAGTGGGGAGACAATGGGAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAACGCCCTCCGTGCTGGACTCCAGGGCTC CTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAGAGCCTCCCTGTCTCCGGTAAA</p>
MOR08545 Prop1		

SEQ ID NO: 21 (Kabat)	HCDR1	VNGMH
SEQ ID NO: 22 (Kabat)	HCDR2	VIDGMGHTYYADSVKG
SEQ ID NO: 23 (Kabat)	HCDR3	YDYIKYGAFDP
SEQ ID NO: 24 (Kabat)	LCDR1	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 25 (Kabat)	LDCR2	GDSNRPS
SEQ ID NO: 26 (Kabat)	LCDR3	TRTSTPISGV
SEQ ID NO: 27 (Chothia)	HCDR1	GFTFSVN
SEQ ID NO: 28 (Chothia)	HCDR2	DGMGH
SEQ ID NO: 29 (Chothia)	HCDR3	YDYIKYGAFDP
SEQ ID NO: 30 (Chothia)	LCDR1	DNIGSKY
SEQ ID NO: 31 (Chothia)	LDCR2	GDS
SEQ ID NO: 32 (Chothia)	LCDR3	TSTPISG
SEQ ID NO: 33	VL	<p>DIELTQPPSVVAPGQTARISCGDNIGSKVHWYQQKPGQAPVLVIYGDSNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGT QAEDEADYYCTRSTPISGVFGGGTKLTVL</p>
SEQ ID NO: 34	VH	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSVNGMHWRQAPGKLEWVSVIDGMGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDYIKYGAFDPWGQGTIVSS</p>
SEQ ID NO: 35	VL de estirpe germinal	<p>SYELTQPPSVVSPGQTASITCSGDNIGSKVHWYQQKPGQSPVLVIYGDSNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCTRSTPISGVFGGGTKLTVL</p>
SEQ ID NO: 36	VH de estirpe germinal	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSVNGMHWRQAPGKLEWVSVIDGMGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDYIKYGAFDPWGQGTIVSS</p>

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 37	VL de ADN	<p>GATATCGAACTGACCCAGCCGCCCTCAGTGAGCGTTGCACCAAGGTCAAGACCGCCGTATCTGTAGCGGC GATAATATTGGTCTAAGTATGTTAGGTACAGCAGAAACCCGGGAGGCCAGTTCTGTGATTATG GTGATTCTAATCGTCCCTAGGCATCCGGAACGCCAGCTTAGCGGATCCAACAGCGCAACACCGCACCCTGAC CATTAGCGGCACTCAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTAGCACTGACTCTACTCTATTCTGGTGTG TTGGCGCGGCCACGAAGTTAACCGTCTT</p>
SEQ ID NO: 38	VH de ADN	<p>CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCCGGCGGCCCTGGTCAACCGGGCGCAGCCTGCGTGTAGCTGCGCGC CTCCGGATTACCTTTCTGTTATGGTATGTCATTGGTGCAGCAAGCCCTGGAAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCGTTATTGATGGTATGGGTATCTTATTATGCTGATTTCTGTTAAGGGTGTGTTTACCATTCACGTGATAA TTCGAAAAAACACCTGTATCTGAAATGAACAGCCTGCGTGCAGGAAGATAACGGCGTGTATTATTGCGCGC TATGATTATATTAAAGTATGGTGTGTTGATCCTGGGCAAGGCACCCCTGGTACGGTTAGCTCA</p>
SEQ ID NO: 39	Lambda ligera	<p>DIELTQPPSVAPGQTARISCGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLIYQDGSNRPSGIPERFSGNSGNATLTISGT QAEDEADYYCTRTSTPISGVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLPSSSEELQANKATLVLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEA</p>
SEQ ID NO: 40	Fab pesado	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVNGMHWVRQAPGKGLEWVSVIDGMGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDYIKYGAFDPWQGQTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGLTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVPEPKS</p>
SEQ ID NO: 41	ADN de lambda ligera	<p>GATATCGAACTGACCCAGCCGCCCTCAGTGAGCGTTGCACCAAGGTCAAGACCGCCGTATCTGTAGCGGC GATAATATTGGTCTAAGTATGTTAGGTACAGCAGAAACCCGGGAGGCCAGTTCTGTGATTATG GTGATTCTAATCGTCCCTAGGCATCCGGAACGCCAGCTTAGCGGATCCAACAGCGCAACACCGCACCCTGAC CATTAGCGGCACTCAGCGGAAGACGAAGCGGATTATTAGCACTGACTCTACTCTATTCTGGTGTG</p>
		<p>TTGGCGGCCACGAAGTTAACCGTTCTGGCAGCCAAACCGCACCGAGTGACGCTGTTCCGCCGA GCAGCGAAGAATTGCAGCGAACAAAGCGACCCCTGGTGTGCTGATTAGCGACTTTATCCGGAGCCGTGA CAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAACACCCCTCAAACAAAGC AACAAACAAGTACCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAACGCTACAGC TGCCAGGTACCGCATGAGGGGAGCACCGTGGAAAAAACCGTTGCCGACTGAGGCC</p>
SEQ ID NO: 42	ADN de Fab pesado	<p>CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCCGGCGGCCCTGGTCAACCGGGCGCAGCCTGCGTGTAGCTGCGCGC CTCCGGATTACCTTTCTGTTATGGTATGTCATTGGTGCAGCAAGCCCTGGAAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCGTTATTGATGGTATGGGTATCTTATTATGCTGATTTCTGTTAAGGGTGTGTTTACCATTCACGTGATAA TTCGAAAAAACACCTGTATCTGAAATGAACAGCCTGCGTGCAGGAAGATAACGGCGTGTATTATTGCGCGC TATGATTATATTAAAGTATGGTGTGTTGATCCTGGGCAAGGCACCCCTGGTACGGTTAGCTACGCGTGA CCAAAGGTCAAGCGTGTCCGCTGGCCAGCAGCAAACGACCCAGCGGCCAGCGCTGCCCTGGGCT GCCTGGTTAAAGATTATTCGGGAAACCGTACCGTGAGCTGGAAAGCGGGCGCTGACCAGCGCGTGC ATACCTTCCGGCGGTGCTGCAAAGCAGCGGCCGTATAGCCTGAGCAGCGTTGACCGTGCCAGCAGCA GCTTAGGCAGACCTATATTGCAACGTGAACCATAACCGAGCAACACAAAGTGGATAAAAAGTGG AACCGAAAAGC</p>

ES 2 949 159 T3

MOR06706 Prop1		
SEQ ID NO: 47 (Kabat)	HCDR1	DYAIH
SEQ ID NO: 48 (Kabat)	HCDR2	GISYSGSSTHYADSVKG
SEQ ID NO: 49 (Kabat)	HCDR3	GSHGNIMAKRYFDF
SEQ ID NO: 50 (Kabat)	LCDR1	SGDNIRKKYVY
SEQ ID NO: 51 (Kabat)	LDCR2	EDSKRPS
SEQ ID NO: 52 (Kabat)	LCDR3	STADSGINNGV
SEQ ID NO: 53 (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO: 54 (Chothia)	HCDR2	SYSGSS
SEQ ID NO: 55 (Chothia)	HCDR3	GSHGNIMAKRYFDF
SEQ ID NO: 56 (Chothia)	LCDR1	DNIRKKY
SEQ ID NO: 57 (Chothia)	LDCR2	EDS
SEQ ID NO: 58 (Chothia)	LCDR3	ADSGINNG

MOR06706 Prop1		
SEQ ID NO: 59	VL	DIELTQPPSVVAPGQTARISCGDNIRKKVYWWQQKPGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGNSGNATLTISGTQ AEDEADYYCSTADSGINNGVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 60	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYAIHWVRQAPGKLEWVSGISYSGSSTHYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHGNIMAKRYFDFWGQGTLVTSS
SEQ ID NO: 61	VL de estirpe germinal	SYELTQPPSVVSPGQTASITCGDNIRKKVYWWQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGNSGNATLTISGTQ AMDEADYYCSTADSGINNGVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 62	VH de estirpe germinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYAIHWVRQAPGKLEWVSGISYSGSSTHYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHGNIMAKRYFDFWGQGTLVTSS
SEQ ID NO: 63	VL de ADN	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCCTCAGTGAGCGTTGACCAGGTAGACCGCGCTATCTGTAGCGGC GATAATATTCTGAAAGATATGTTATTGGTACCAAGCAGAAACCCGGCAGGCCAGTTCTGTGATTATAG AGGATTCTAACGGTCCCTCAGGCATCCCGAACGCTTAGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACCCCTGA CCATTAGCGGCACTCAGGCAGAACGAGCGGATTATTGCTACTGCTGATTCTGGTATTAAATATGG TGTGTTGGCGCGCCACGAAGTTAACCGTTCTT
SEQ ID NO: 64	VH de ADN	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCCGGCGGCCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTCTGATTATGCTATTCTGGTACCGTACCCATTATGCGGATAGCGTAAAGGCCGTTTACCATTCACGTGA TAATTGAAAAAACACCCCTGTATGCAAATGAACAGCCTGCGTGCAGAACGAGATACGGCCGTGATTATTGCGCG CGTGGTTCTATGGTAATTATGGTAAAGCGTTATTGATTTGGGGCAAGGCACCCCTGGTGACGGTTA GCTCA
SEQ ID NO: 65	Lambda ligera	DIELTQPPSVVAPGQTARISCGDNIRKKVYWWQQKPGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGNSGNATLTISGTQ AEDEADYYCSTADSGINNGVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVLFPSSSEELQANKATLVLISDFYPGAFTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 66	IgG1 pesada LALA	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYAIHWVRQAPGKLEWVSGISYSGSSTHYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHGNIMAKRYFDFWGQGTLVTSSASTKGPSVFLPAPSSKSTGGTAALGCL VKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNNTVKDRVEPKSCDK THTCPPCAPEAAGGPSVFLPPPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYNS SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFYLSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHTQKSLSLSPKG

MOR06706 Prop1		
SEQ ID NO: 67	ADN de hlamda	<p>GATATCGAACTGACCCAGCCGCCCTCAGTGAGCGTTGACCAGGTAGACCGCGGTATCTGTAGCGGC GATAATATTCTGAAGAAGTATGTTATTGGTACAGCAGAAACCCGGGCAGGCCAGTTCTGTGATTATG AGGATTCTAACGGTCCCTCAGGCATCCCGAACGCTTACGGATCCAAACAGCGAACCGCGACCCGA CCATTAGCGCACTCAGGCAGAACGAGCGATTATTCTACTGCTGATTCTGGTATTAAATGG TGTGTTGGCGCGCAGAAGTTAACCGTCTAGGTAGCAGCCAAGGCTGCCCTCGGTACTCTGTTCCCG CCCTCTGAGGAGCTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCG TGACAGTGGCTGAGGAGCAGTAGCAGCCGCTAAGGGAGTGGAGACCACACCCCTCAAACAA AGCAACAACAAGTACCGGCCAGCAGCTATCGAGCTGACGCCAGCAGTGAAAGTCCACAGAAGCTAC AGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA</p>
SEQ ID NO: 68	ADN de IgG1 pesada LALA	<p>CAGGTGCAATTGGGAAAGCGGGCGGCCCTGGTCAACCGGGCGCAGCTGCTGAGCTGCGGCC CTCCGGATTACCTTTCTGATTATGCTATTCTGGTCAAGGCCCTGGAAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCGGTATCTTATTCTGGTAGCTACCCATTGCGGATAGCGTAAAGGCCCTTACATTACAGTGA TAATTGAAAACACCCCTGATCTGCAAATGAACAGCCTCGTGCAGGAAAGATACGGCCGTATTGCGCG CGTGGTTCTATGTAATTATGGCAAGCGTTATTGATTTGGGCAAGGCACCCCTGGTACGGTGA GCTCAGCCTCCACAGGGTCCATGGTCTCCCGTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTTGGGGCACAGC GGCCTGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTCCCGAACCGGTGACGGTCTGGAACCTCAGCGTGGTACCGTG CAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCGTGGTACCGTG CCCTCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCGAACCGTAACTCACAGCCACCGTGCCTGGGAG AAGAGAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCTGGCACCTGAAGCAGCGGG GGACCGTCAGTCTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGC ATAATGCAAGACAAGCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACCGTCTCACCCTGC TGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCG AGAAAACATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCGAGAACCCACAGGTGACCCCTGCCCCATCCGGGAGG AGATGACCAAGAACAGGTACGGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTATCCAGCGACATGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCGCCGAGAACAACTACAAGAACCGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCATGTCCTGTGATGC ATGAGGCTGACAACCAACTACACGCAGAACAGCCTCCCTGTCTCCGGTAA</p>
MOR06475 Prop3		
SEQ ID NO: 69 (Kabat)	HCDR1	NRGGGVG
SEQ ID NO: 70 (Kabat)	HCDR2	WIDWDDDKSYSTSLKT
SEQ ID NO: 71 (Kabat)	HCDR3	MHLPLVFDS
SEQ ID NO: 72 (Kabat)	LCDR1	RASQFIGSRYLA
SEQ ID NO: 73 (Kabat)	LCDR2	GASN RAT
SEQ ID NO: 74 (Kabat)	LCDR3	QQYYDYPQT
SEQ ID NO: 75 (Chothia)	HCDR1	GFSLSNRGG
SEQ ID NO: 76 (Chothia)	HCDR2	DWDDD
SEQ ID NO: 77 (Chothia)	HCDR3	MHLPLVFDS
SEQ ID NO: 78 (Chothia)	LCDR1	SQFIGSRY

ES 2 949 159 T3

MOR06706 Prop1		
SEQ ID NO: 79 (Chothia)	LDCR2	GAS
SEQ ID NO: 80 (Chothia)	LCDR3	YYDYPQ
SEQ ID NO: 81	VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIG5RYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGVPARFSGSGSGTDFLTISSE EPEDFATYYCQQYYDYPQTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 82	VH	QVQLKESGPALVKPTQTLTCTSGFSLNRGGGVGIRQPPGKALEWLAWIDWDDDSYSTS LKTRLTISKDT KNQVVLMTNMDPVDTATYCARMLPLVFDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFLPSSKSTS GGTAALGCLVKD
SEQ ID NO: 83	VL de ADN	GATATCGT GCTGACCCAGAGCCCGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGCGAACGTGCGACCC TGAGCTGCAGA GCGAGCCAGTTTATTGGTCTCGTTATCTGGCTTGTACAGCAGAAACCCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAA TTTATGGTGCTTAATCGTCAACTGGGGTCCCGCGCTTTAGCGGCTCTGGATCGGACGGATTTCAC CCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATTATTGCCAGCAGTATTATGATTATCCTCAGA CTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAATTA
SEQ ID NO: 84	VH de ADN	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCGGCCCTGGTGAACCGACCCAAACCTGACCC TGACCTGTACCTTT CCGGATTAGCCTGCTAATCGTGGTGGTGGTTGGATT CGCAGCCGCTGGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTGGATCGATTGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCAGCCTGAAAACCGCTGACCATTAGCA AAGATACTCGAAAATCAGGTGGTGCTGACTATGACCAACATGGACCCGGTGGATACGGCCACCTATTATG CGCGCTATGCATCTCCCTCTGTTTGATCTGGGCAAGGCACCCGGTGA CGGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 85	Kappa ligera	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIG5RYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGVPARFSGSGSGTDFLTISSE EPEDFATYYCQQYYDYPQTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIPPSDEQLKSGTASV VCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLKSADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
SEQ ID NO: 86	IgG1 pesada LALA	QVQLKESGPALVKPTQTLTCTSGFSLNRGGGVGIRQPPGKALEWLAWIDWDDDSYSTS LKTRLTISKDT KNQVVLMTNMDPVDTATYCARMLPLVFDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFLPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGSPVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYP SDI AVEWESNGQPNYYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 87	ADN de kappa ligera	

ES 2 949 159 T3

MOR06706 Prop1		
		GATATCGTCTGACCCAGAGCCCGCGACCTGAGCCTGTCCTCGGGCGAACGTGCGACCCCTGAGCTGCAGA GCGAGCCAGTTATTGGTCTCGTTATCGGCTTGGTACCAAGCAGAACCGAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAA TTATGGTCTCTAATCGTCAACTGGGTCGGCGCGCTTTAGCGGCTCTGGATCGGCACGGATTTCAC CCTGACCAATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCACTTATTATTGCCAGCAGTATTATGATTATCCTCAGA CCTTGGCCAGGGTACGAAAGTGAATAAACGTAACGGTGCACCATCTGTCATCTCCCGCATCT GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGCTCTGTTGTGCGTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCAAAG TACAGTGGAAAGGTGATAACGCCCTCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAGCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCC TGCAGAATCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTAACACAGGGAGAGTGT
SEQ ID NO: 88	ADN de IgG1 pesada LALA	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCAGCCCTGGTAAACCGACCCAAACCCCTGACCCCTGACCTGTACCTTT CCGGATTAGCCTGCTAATCGTGTGGTGGTGGGGTGGATCGCCGCGCTGGAAAGGCCCTGAGT GGCTGGCTTGATCGATGGGATGATGATAAGCTTATAGCACCGCTGAAACACGCCGCTGACCCATTAGCA AAGATACTTCGAAAATCAGGGTGTGCTGACTATGACCAACATGGACCCGTGGATACGCCACCTTATTG CGCCGCTATGCACTTCTCTTGTGTTGATCTGGGCAAGGGCACCTGGTACGGTTAGCTAGCCTCA CCAAGGGTCCATCGGTCTCCCTGGCACCCCTCTCAAGAGACCTCTGGGACAGCGGCCCTGGCTG CTGGTCAAGGACTACTCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACCTCAGGCCCTGACCCGGCTGCA CACCTCCGGCTGCTCACAGTCTCAGGACTCTACCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCAGCAGCT TGCGACCCAGACCTACATCTGCAAGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC CCAAATCTGTACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGGGGGGACCGTCAGCTT CCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGAC GTGAGCACGAAGACCTGAGGTCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGTGGAGGTGATAATCCAAGAC AAAGCCGGGAGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGGCTCCTCACCGTCTGCACCAAGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGACCCCTGCCCCATCCGGGAGGAGATGACCAAG AACAGGTACGGTACCTGCTGGTCAAAGGTTATCCAGCAGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGAGCCGAGACAACACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCAGCA ACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAA
SEQ ID NO: 89	VH de estirpe germinal	QVTLKESGPALVKPTQTLITCTFSFSLSNRGGVGWIRQPPGKALEWLAWIDWDDDSYSTSILKTRLTISKDTS KNQVVLMTMNMDPVDATYYCARMHLPFLVFDWSQGQTLTVSS
SEQ ID NO: 90	VL de estirpe germinal	EIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTISSE PEDFAVYYCQYYDYPQTFGQGTKEIK
SEQ ID NO: 91	ADN de VH de estirpe germinal	CAGGTACACTGAAAGAGTCGGCCCTGCCCTGGTAAACCCACCCAGACCCCTGACCTGACATGCCCTCA GCGGCTTCACCTGAGCACAGAGGGCGGGAGTGGCTGGATCAGACGCCCTCCGGCAAGGCCCTGGAA TGGCTGCCCTGGATCGACTGGGACGACAGAACAGAGCTACAGCACCGCTGAAACCCGGCTGACCATCAGC AAGGACACCAAGAACCCAGGGTGTGACCATGACCAACATGGACCCCTGGACCCGGCAACCTACTAC TGCGCCGGATGCACTGCCCTGGTGTGATAGCTGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTCAGCTCA GAAATCGTCTGACCCAGAGCCGCCACCCCTGCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCCTGAGCTGCCGG GCCAGCAGTTCATCGGACGAGATACTGGCTGGTACAGCAGAACGCCGGCAGGCCCCAGACTGCTG ATCTACGGCGCAGCAACCGGGCACCGGATCCCTGCCAGATTCTGGCAGGGCAGCGGCACCGACTTC ACCCCTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGACTACTGCCAGCAGTACTACGACTACCCCC AGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 92	ADN de VL de estirpe germinal	

ES 2 949 159 T3

MOR06706 Prop1		
		GAAATCGTGTGACCCAGAGCCCCGCCACCCCTGTCTTGAGCCCTGGCGAGAGAGGCCACCCGTAGCTGCCGG GCCAGCCAGTTCATCGGCAGCAGATAACCTGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGACTGCTG ATCTACGGCGCCAGCAACCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTTCTGGCAGGGCAGCGGCACCGACTTC ACCCCTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACGACTACCCCC AGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

MOR08193 Prop3		
SEQ ID NO: 93 (Kabat)	HCDR1	NRGGGVG
SEQ ID NO: 94 (Kabat)	HCDR2	WIDWDDDKSYSTSLKT
SEQ ID NO: 95 (Kabat)	HCDR3	MHLPLVFDS
SEQ ID NO: 96 (Kabat)	LCDR1	RASQFIGSRYLA
SEQ ID NO: 97 (Kabat)	LDCR2	GASN RAT
SEQ ID NO: 98 (Kabat)	LCDR3	QQYWSIPIT
SEQ ID NO: 99 (Chothia)	HCDR1	GFSLSNRGG
SEQ ID NO: 100 (Chothia)	HCDR2	DWDDD
SEQ ID NO: 101 (Chothia)	HCDR3	MHLPLVFDS
SEQ ID NO: 102 (Chothia)	LCDR1	SQFIGSRY
SEQ ID NO: 103 (Chothia)	LDCR2	GAS
SEQ ID NO: 104 (Chothia)	LCDR3	YWSIPI
SEQ ID NO: 105	VL	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGVPARFSGSGSGTDFLTISSE EPEDFAVYYCQQYWSIPIFGQGKVEIK
SEQ ID NO: 106	VH	QVQLKESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLNRGGGVGIRQPPGKALEWLAWIDWDDDKSYSTSLKTRLTISKDTS KNQVVLMTNMDPVTATYYCARMHLPLVFDSWGQGTLTVSS
SEQ ID NO: 107	VL de estirpe germinal	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTISSE PEDFAVYYCQQYWSIPIFGQGKVEIK
SEQ ID NO: 108	VH de estirpe germinal	QVTLKESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLNRGGGVGIRQPPGKALEWLAWIDWDDDKSYSTSLKTRLTISKDTS KNQVVLMTNMDPVTATYYCARMHLPLVFDSWGQGTLTVSS

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 109	VL de ADN	GATATCGTGCTGACCCAGAGCCGGCGACCCCTGAGCCTGCTCCGGCGAACGTGCGACCCCTGAGCTGAGA GCGAGCCAGTTATTGGTCTCGTTATCTGGCTTGGTACAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAA TTTATGGTCTCTAATCGTGCACTGGGGTCCCGCGCTGGGCTTGGATCCGGCACGGATTTC CCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTGCCTGTTATTGCCAGCAGTATTGGTCTATTCTATTAA CCTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTTAA
SEQ ID NO: 110	VH de ADN	CAGGTGCAATTGAAAGAAAAGCGGCCGGCCCTGGTAAACCGACCCAAACCTGACCCCTGACCTGACCTGACCTTT CCGGATTAGCCTGCTAATCGTGGGGTGGTGGGGATTCGCCAGCCGCTGGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTTGGATCGATTGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCGCCTGAAAACCGCTGACCCATTAGCA AAGATACTCGAAAAATCAGGTGGTCTGACTATGACCAACATGGACCCGGTGGATACGGCACCTATTATTG CGCGCGTATGCATCTCTCTTGTGTTTGTATTGCTGGGCCAGGCACCCCTGGTACGGTAGCTCA
SEQ ID NO: 111	Kappa ligera	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSL EPEDFAVYYCQQYWISIPFQGQGTKVEIKRTVAAPSVFIPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTKADYEHKVKYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEA
SEQ ID NO: 112	Fab pesado	QVQLKESGPALVKPTQLTLTCTFSGFSLNRGGVGWIRQPPGKALEWLAWIDWDDDKSYSTLKRTRLISKDTS KNQVVLMTNMDPVDTATYYCARMHPLVFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKS
SEQ ID NO: 113	ADN de kappa ligera	GATATCGTGCTGACCCAGAGCCGGCGACCCCTGAGCCTGCTCCGGCGAACGTGCGACCCCTGAGCTGAGA GCGAGCCAGTTATTGGTCTCGTTATCTGGCTTGGTACAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAA TTTATGGTCTCTAATCGTGCACTGGGGTCCCGCGCTGGGCTTGGATCCGGCACGGATTTC CCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTGCCTGTTATTGCCAGCAGTATTGGTCTATTCTATTAA CCTTGGCCAGGGTACGAAATTAAACGTACCGTGGCTGCTCGAGCGTGTGGTATTTCCGCCAG CGATGAACAACGTAAAGCGGCACGGCAGCGTGGTGTGCCGTGAAACAACTTATCCCGTGAAGCGA AGTCAGTGGAAAGTAGACAACCGCGCTGAAAGCGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAACAGGATAGCA AAGATAGCACCTATTCTGAGCAGCACCCGTGACCCCTGAGCAAAGCGGATTATGAAAAACATAAAGTGTATGC GTGCGAAGTGCACCATCAAGGTCTGAGCAGCCGGTGAATAATCTTAACTGTGGCAGGGC
SEQ ID NO: 114	ADN de Fab pesado	CAGGTGCAATTGAAAGAAAAGCGGCCGGCCCTGGTAAACCGACCCAAACCTGACCCCTGACCTGACCTGACCTTT CCGGATTAGCCTGCTAATCGTGGGGTGGTGGGGATTCGCCAGCCGCTGGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTTGGATCGATTGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCGCCTGAAAACCGCTGACCCATTAGCA AAGATACTCGAAAAATCAGGTGGTCTGACTATGACCAACATGGACCCGGTGGATACGGCACCTATTCTG CGCGCGTATGCATCTCTCTTGTGTTTGTATTCTGGCCAAGGCACCCGGTGGTACGGTTAGCTCAGCGTCGA CCAAAGGTCGAAGCGTGTGGCGCTGGCTCGAGCAGCAAAGCACCGAGCGGGCACGGCTGCCCTGGGCT GCCGGTAAAGATTATTCGGAACCGTACCGTGAGCTGGAACAGCGGGGCGCTGACCAGCGGGTGC ATACCTTCGGCGGTGCTGCAAAGCAGCGGCTGTAGCTGAGCAGCGTGTGACCCGTGCCGAGCAGCA GCTTAGGCACTCAGACCTATATTGCAACGTGAACCATAACCGAGAACACCAAAGTGGAAAAAGTGG AACCGAAAAGC
MOR08473 Prop3		
SEQ ID NO: 115 (Kabat)	HCDR1	SYGMS

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 116 (Kabat)	HCDR2	NISNDGHYTYYADSVKG
SEQ ID NO: 117 (Kabat)	HCDR3	FQASYLDIMDY
SEQ ID NO: 118 (Kabat)	LCDR1	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 119 (Kabat)	LDCR2	NDSNRPS
SEQ ID NO: 120 (Kabat)	LCDR3	QAWGDNGTRV
SEQ ID NO: 121 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
SEQ ID NO: 122 (Chothia)	HCDR2	SNDGHY
SEQ ID NO: 123 (Chothia)	HCDR3	FQASYLDIMDY
SEQ ID NO: 124 (Chothia)	LCDR1	DNIGSKY
SEQ ID NO: 125 (Chothia)	LDCR2	NDS
SEQ ID NO: 126 (Chothia)	LCDR3	WGDNGTR
SEQ ID NO: 127	VL	<p>DIETQPPSVVAPGQSITISCGDNIGSKVHWYQQKPGQAPVLVIYNDSNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQ AEDEADYYCQAWGDNGTRVFGGGTKLTVL</p>
SEQ ID NO: 128	VH	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKLEWVSNISNDGHYTYYADSVKGRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFQASYLDIMDYWGQGTIVTVSS</p>
SEQ ID NO: 129	VL de estirpe germinal	<p>SYELTQPPSVVSPGQTASITCSGDNIIGSKVHWYQQKPGQSPVLVIYNDSNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWGDNGTRVFGGGTKLTVL</p>
SEQ ID NO: 130	VH de estirpe germinal	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKLEWVSNISNDGHYTYYADSVKGRTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFQASYLDIMDYWGQGTIVTVSS</p>
SEQ ID NO: 131	VL de ADN	<p>GATATCGAACTGACCCAGCCGCCCTCAGTGAGCGTTGCACCAGGTAGAGCATTACCATCTCGTAGCGCG ATAATATTGGTTCAAGTATGTTATTGGTACACAGCAGAAACCCGGGAGGCAGCGCAGTTCTGTGATTATAAT GATTCTAACATGTCCTCAGGCATCCCGAACGCTTAGCGGATCAAACAGCGAACACCGCGACCCCTGACCA TTAGCGGCACTCAGGCAGAACGAAGACGAGCGGATTATTGCCAGGCTGGGTGATAATGGTACTCGTGTG TTGGCGGCAGAACGTTAACCGTTCTT</p>

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 132	VH de ADN	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCCGGCGGCCCTGGT6CAACGGGGCGGAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGCCTCCGGATTACCTTCTTATGGTATGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGCTCGAGTGGGTAGCAATATTCTAATGATGGTCATTACCTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTCACGTGATAATTGCAACAGCTGCGGAAAGATAACGCCGTGATTATTGCGCCTTTCAAGGCTTCTTATCTGATATTATGGATTATTGGGCAAGGCACCTGGTACGGTAGCTCA
SEQ ID NO: 133	Lambda ligera	DIELTQPPSVAPGQSITISCGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYNDSNRPSGIPERFSGNSGNATLTISGTQAEDEADYYCQAWGDNGTRVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVLISDFYFPGAVTVAWKADSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEA
SEQ ID NO: 134	Fab pesado	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWSVRQAPGKLEWVSNISNDGHYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFQASYLDIMDYWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSSVTVPSQLGTQTYICNVNWKPSNTKVDDKVKVEPKS
SEQ ID NO: 135	ADN de lambda ligera	GATATCGAACTGACCCAGCGCCTTCAGTGAGCGTTGACCCAGGTGAGAGCATTACCATTCGTGTAGCGCGATAATATTGGTCTAAGTATGTCATTGGTACCGAGCAGAAACCCGGCAGGGCCAGTTCTGTGATTATAATGATTCTAATCGCCCTCAGGCATCCCGAACGCTTAGCGGATCAAACAGCGCAACACCGCGACCCGTGACCAATTAGCGGCACTCAGCGGAAGCAGCGAACGCGATTATTATGCCAGGCTTGGGTGATAATGGTACTCGTGTGTTGGCGCGGACAGGTAACCGTTCTGCCAGCCAAAGCCGACCGAGTGTGACGCTGTTCCGCCAGCAGCGAAGAAATTGAGCGAACAAAGCGACCCCTGGTGTGCTGATTAGCGACTTTATCCGGAGCCGTGACAGTGGCCCTGGAAAGGCAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGCGGGAGTGGAGACCACCCCTCAAACAAAGCAACACAAGTACCGGGCAGCAGCTATCTGAGCCGTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAACGCTACAGCTGCCAGGTACCGCATGAGGGGAGCACCGTGGAAAAACCGTTGCGCCACTGAGGCC
SEQ ID NO: 136	ADN de Fab pesado	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCCGGCGGCCCTGGT6CAACGGGGCGGAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGCCTCCGGATTACCTTCTTATGGTATGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGCTCGAGTGGGTAGCAATATTCTAATGATGGTCATTACCTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTCACGTGATAATTGCAACAGCTGCGGAAAGATAACGCCGTGATTATTGCGCCTTTCAAGGCTTCTTATCTGATATTATGGATTATTGGGCAAGGCACCTGGTACGGTAGCTCAGCGCTGACCAAAGGTCCAAGCGTCTTCCGCTGGCAGCAGCAGCAACAGCAGCGAGCAGCAGCGAGCAGCAGCGAGCAGCAGCTGGTACCGTGACCGTGGAGACCACCCCTCAAACAAAGTGCAACGTGAAACCATAACCGAGCAACACAAAGTGGATAAAAAG
SEQ ID NO: 137	VL de estirpe germinal	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLVIYNDSNRPSGIPERFSGNSGNATLTISRAQAGDEADYYCQAWGDNGTRVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 138	VH de estirpe germinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWSVRQAPGKLEWVSNISNDGHYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFQASYLDIMDYWGQGTLVTSS

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 139	ADN de VL de estirpe germinal	<pre> AGCTATGAACTGACCCAGCCGCTGAGTGTAGCGTTGCGCTGGGTAGACCGCCGTATTACCTCGCCGGT GATAACATTGGCAGCAAATATGTGATTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCAGCGGTGCTGGTATTAT AACGATAGCAACCGTCCGAGCGGCATTCGGAACGTTTAGCGGCAGCAACAGGGCAATACCGCAGCCCTG ACCATTAGCGTGCAGCGGGTGTAGAAGGGATTATTAGCCAGCGTGGGCGATAATGGTACGCG TGTGTTGGCGGTGAGAAGTTAACGTTCTT </pre>
SEQ ID NO: 140	ADN de VH de estirpe germinal	<pre> GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGGGGCGGCTGGTCAACCGGGGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGC CTCCGGATTACCTTTCTTATGGTATGCTGGTGCAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTG AGCAATATTCTAATGATGGTCATTACTTATGCTGATTCTGTTAAGGGTGTCTTACATTACGTGAT AATTGAAAAACACCCGTATCTGAAATGAAACAGCTGCGTGGGAAGATAAGGCCGTGATTATTGCGCGC GTTTCAGGCTCTTATCTGATATTGGATTATTGGGCAAGGCACCTGGTACGGTTAGCTCA </pre>

ES 2 949 159 T3

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 172	ADN de MOR08168 hlgG1 LALA (sin K) MOR06475 scFv pesado	CAGGTGCAATTGGTCGAGTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGTGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACGTGATCACTGGTGCACAGGCCCTGAAAGGCCCTGGAATGGGT GTCGGCATCTTGGCTGGCGTGAACACCCACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCGGTTACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTCGAGATGAACAGCCTGAGAGCGAGGACACCGCGTGTACTACTG TGCCAGACTGGCGCCACGCCAACAACATCCGTACAGTCAAGTTATGGACGTGTGGGCCAGGGCACACTGG GACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAGGGCCAGCGTGTCCCCCTGGGCCAGCAGCAAGGACACCAGGG CGGCACAGGCCCTGGCTGGTGAAGGACTACTCCCCAGGCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGG AGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCAGCGTGTGAGAGCAGCGGCCGTGACCGCTGTCAGCGT GTGACAGTGCCAGCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCCAAGGCCAGCAACCC AAGGTGACAAGAGAGTGGAGGCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCTGCCAGGCCAGA GGCAGCGGGCCGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCAAAGGACACCCGTATGATCAGCAGGACCCC GAGGTGACCTGCGTGTGGTGAAGTGAAGTCAACTGGTACGGTACGGGAGCGTGAAGTCAACTGGTACGG CGTGGAGGTGACAACGCCAACAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGGGTGTCCG TGCTGACCGTGTGACCCAGACTGCTGAACGCCAAGGAATACAAGTGAAGGTTCAACAAGGCCCTGC CAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAACGGGAGGCCACGGGAGCCAGGTGTAACCCCTGCC CCTCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGTCCTGACCTGCTGGTGAAGGGCTTACCCAGCACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGGCCAGAACACTAACAGACCCAGTGTGACGC AGGGCAGCTTCTCTGACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGGGCAACGTGTTAGC
		TGCAGCGTGTGACGAAGCGCTGCACAACCAACTACACCCAGAAAGAGCCTGAGCCGTGCCCCGGCGCCGCGC TCGGGCGGAAGCGATATCGTGTGACACAGGCCCTGCCACCCCTGCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACC CTGAGCTGCCGGCCAGCCAGTCATGGCTCCGCTACCTGGCTGGTATCAGCAGAACGCCGGACAGGCT CCCAGACTGCTACTACGGCGCCAGCAACAGACTACCCGGCTGCCCCAGGATTTCTGCCAGGGCGAC GGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCACCTGGAACCCAGGACTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACT ACGACTACCCCAAGACCCCTGGCCAGGGCACCAAGGTGAGGATCAAGGGCGGAGGCGGATCCGGGGTGG CGGAAGTGGAGGCCAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCCAGGTGCAATTAAAGAGTCCGGCCCTGCCG TGTAAGGCTACCCAGACCCCTGACCTGACATGCACCTCAGCGCTTGCAGCTGAGAACAGAGGCCGCGA GTGGGCTGGATCAGACAGCCTCCGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGATGACTGGGACGACAA GAGCTACAGCACCCAGCCTGAAAACCCGGCTGACCATCTCAAGGACACCAAGCAAAAGCAGGGTGTCTCAC CATGACCAACATGGACCCCTGGACACCGCACCTATTATTGCGCCCGGATGCTGCCCCCTGGTGTGCTG AGCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTGAAGTGTGTTAGC
SEQ ID NO: 173	MOR08168 hlgG1 LALA MOR06475 scFv pesado (DP a DA)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYVINWVRQAPGKGLEWVSGISWGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVYCARLGATANNIRYKFMDVWGGTTLVTVSSASTKGPSPVPLAPSSKSTGGTAAL GCLVKDVFPEPVTVWSNLSGALTSGVHTFPALQSSGLYLSLSSVTVPSLSSLTQTYICNVNHPKNSNTKVDKRVPEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWVVDGVEVHNNAKTPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPQREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDSRWWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSP GKGGSGGSIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGPARFSGSGSG TDFTLTISSEPEDFATYYCQQYYDYPQTFGQGTKEIKGGGGGGGGGGGGGGGGSQVQLKESGPALVKPTQ TLTLCFTSGFSLSNRGGVGVWIRQPPGKALEWLAWIDWDDDKSystSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDAV DTATYYCARMHLPVFDSWGQGTLVSS

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 174	ADN de MOR08168 hlgG1 LALA MOR06475 scFv pesado (DP a DA)	<p>CAGGTGCAATTGGTCGAGTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGTGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGC CAGCGGCTTCACCTTCAGCGACTACGTGATCACTGGTGCACAGGCCCCCTGAAAGGGCCTGGAATGGGT GTCGGCATCTTGGTCTGGCTGAACACCCACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCGGTTACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCGAGGACACCGCGTGTACTACTGT TGCCAGACTGGCGCCACCGCAACACATCCGGTACAAGTTCATGGACGTGTGGGCCAGGGACACTGGT GACCGTCAGCTCAGCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAAGAGCACAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGGCTGGTAAGGACTACTCCCGAGCCGTGACCGTGTCTGAAACAGCGG AGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCTGGCGTGTGAGAGCAGCGGGCTGTACAGCTGTCCAGCGTG GTGACAGTGCCAGCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATGCAACGTGAACCCAAGCCCAGCAACAC AAGGTGACAAGAGAGTGGAGCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCGCCAGCCAGCCAGA GGCAGCGGGCCGACCCCTCGTGTCTGTGTCAGCTGGGACCCAGGACACCTGTATGATCAGCAGGACCCCG GAGGTGACCTCGTGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGGAGGTGAAGTTCAACTGGTACCTGGACCG CGTGGAGGTGACAACGCCAACGCAAGGCCAACGCCCAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGTCTGG TGCTGACCGTGTGACCCAGGACTGGCTAACGCCAACGGAAGTACAAGTGTCAAGGTCTCAAACAAGGCCCTGC CAGCCCCATCGAAAAGGACATCAGCAAGGCCAACGCCAGGGAGCCAGGTGTAACCCCTGCCCCC CCTCCCGGGAGGAGATGACCAAAACAGGTTGACCTGTGACCTGTGTCAGGTTCAAGGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCGTGGAGTGGAGAGCAACGCCAGCCAGAACAACACTACAAGACCAACCCCCCAGTGTGGACGC GACGGCAGCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAACAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGC TGCAGCGTGTGACGAAGCGCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCGTGCCCCCGCAAGGGC GGCTCCGGCGGAAGCGATATCGTGTGACACAGAGCCCTGCCACCCCTGTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCC ACCCTGAGCTGCCGGCCAGCCAGGTTCATCGGCCCGTACCTGGCTGGTATCAGCAGAACGCCGGACAG GCTCCAGACTGCTGATCTAGCGCCAGCACAGAGTACCCGGCTGCCAGATTCTGGCAGCGC AGCGGCACCGACTTACCCCTGACCATCAGCAGCTGAAACCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGT ACTACGACTACCCCAAGCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGGAGGCGATCCGGGGGT GCGGGAAGTGGAGGCGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCCAGGTGAATTGAAAGAGTCCGGCCCTGCC CTGGTGAAGCCTACCCAGACCCCTGACCATGACATTGACCTTCAGCGGCTTACGGCTGAGCAACAGAGGGCGC GGAGTGGGCTGAGCAGACCCCTCCGCAAGGCTGGAAATGGCTGGCTGGATGACTGGGAGCAGCA AAGAGCTACAGCACCCTGAAAACCCGGCTGACCATCTCAAGGACACCAGCAAGAACCGGGTGTCT CACCATGACCAACATGGACGCCGTGGACACCCGACCTATTATTCGCCCCGGATGATCTGCCCTGGTGTCT GATAGCTGGGCCAGGGAAACCTGGTACAGTGTCCAG</p>
SEQ ID NO: 175	MOR08168 hlgG1 LALA MOR06475 scFv pesado (DP a TA)	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKLEWVSGISWGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFDVWGGQGTIVTVSSASTKGPSVFLAPSSKTSGGTAAL GCLVKDVFPEPVTVWSNMGALTSGVHTFPVLQSSGLYLSSSVTVPSSSLGQTYYICNVNHPSPNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPCCPAPEAGGPSVLFPPPKDTLMSIRTPVEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLP GKGGSGGSIDLTVQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGVPARFSGSGSG</p>
		<p>TDFTLTISLEPEDFATYYCQQYYDYPQTFGQGKTVIEKGGGGGGGGGGGGGGGGGGSQVQLKESGPALVKPTQ TLTLTCTFSGFSLSNRGGVGVWIRQPPGKALEWLAWIDWDDDSYSTSLSKTRLTISKDTSKNQVVLTMNTAVD TATYYCARMHPLVFDWSWGQGTLVTSS</p>

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 176	ADN de MOR08168 hlgG1 LALA MOR06475 scFv pesado (DP a TA)	<p>CAGGTGCAATTGGTCGAGTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGTGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCCGCC</p> <p>CAGCGGCTTCACCTTCAGCAGACTACGTGATCACTGGTGCAGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGT</p> <p>GTCCGGCATCTTGGTCTGGCTGGTGAACACCCACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCGGTTACCATCAGCCG</p> <p>GGACAAACAGCAAGAACACCTGTACCTGAGATGAACAGCCTGAGAGCGAGGACACCGCCGTACTACTGT</p> <p>TGCCAGACTGGCGCCACGCCAACAACATCCGTACAAGTCTGGACGTGTGGGCCAGGGCACACTGGT</p> <p>GACCGTCAGCTCAGTAGCAGCAAGGGCCCAAGCGTGTCTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACAGCGG</p> <p>CGGCACAGGCCCTGGCTGGTGAAGGACTACTCCCCAGGCCGTGACCGTGTCTGGAAACAGCGG</p> <p>AGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCAGCGTGTGAGAGCAGGGCGCTGTACAGCTGTCCAGCGTG</p> <p>GTGACAGTGGCCAGCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATGCACTGAAACCAAGGCCAGCAACAC</p> <p>AAGGTGACAAGAGAGTGGAGCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACCTGCCCCCTGCCAGGCCAGA</p> <p>GGCAGCGGGCCGACCCCTCGTGTCCCTGGCCCCAAGGCCAAGGACACCTGTATGATCAGCAGGACCCCC</p> <p>GAGGTGACCTCGTGTGGTGGACGTGAGGCCAGAGGAGCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACCTGGACCG</p> <p>CGTGGAGGTGACAACGCCAACGCAAGGCCAGAGGAGGAGCAGTACAAGCACCTACAGGGTGTGCG</p> <p>TGCTGACCGTGTGACCCAGGACTGGCTGACAGCAAGGCCAGGAAATACAAGTCAAGGTCTCAACAAGGCCCTGC</p> <p>CAGCCCCATGCCAACAGGACATCAGCAAGGCCAGGCCAGGGAGGCCAGGTGTACACCCCTGCC</p> <p>CCTCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGCTCTGGTGAAGGGTTTACCCAGCGACA</p> <p>TCGCGTGGAGTGGAGAGCAAGGCCAGGCCAGAACAACTACAAGACCAACCCCCAGTGTGGACGC</p> <p>GACGGCAGCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGC</p> <p>TGCAAGCTGATGCAAGCGCTGCACAACCAACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCGTGCCCCGCCAGGGC</p> <p>GGCTCCGGCGGAAGCGATATCGTGTGACACAGAGGCCCTGCCACCTGTCTGAGCCGTGGAGAGAGCC</p> <p>ACCTGAGCTGCCGGCCAGCCAGTTACGGTCCCGTACCTGGCTGGTATCAGCAGAACGCCGGACAG</p> <p>GCTCCAGACTGCTGATCTACGGGCCAGAACAGAGTACCGCGTGGCCAGATTTCTGGCAGCGGC</p> <p>AGCGGCACCGACTTACCCCTGACCATCAGCAGCTGAACCCGAGGACTTCGCCACTACTGCGCAG</p> <p>ACTACGACTACCCCAAGCCCTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGAGGCGATCGGGGG</p> <p>GGCGGAAGTGGAGGCCAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCCAGGTGAATTGAAAGAGTCCGGCCCTGC</p> <p>CTGGTGAAGCTTACCCAGACCCCTGACATGCACTTCAGCGGCTTACGGCTGACAAACAGAGGCC</p> <p>GGAGTGGCTGATCAGACAGCTCCGGCAAGGGCTGGATGCACTGGCTGGATGACTGGAGCAGA</p> <p>CAAGAGCTACAGCACCCTGAAACCCGGCTGACCATCTCAAGGACACCAGCAAGAACAGGGTGTCT</p> <p>CACCATGACCAACATGACCCGGCTGGACACCCGACCTATTATTGCGCCCGATGATCTGCCCTGGTGTCT</p> <p>GATAGCTGGGCCAGGGAAACCTGGTGAAGTGTCCAGC</p>
SEQ ID NO: 177	MOR06475 scFv MOR08168 lambda ligera	<p>DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGVPARFSGSGSGTDFLTISL</p> <p>EPEDFATYYCQQYYDYPQTFGQGTKEVIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGQVQLKESGPALVPTQLTLCFTS</p> <p>GFSLSNRGGVWIRQPPGKALEWLAWIDWDDKSYSTSLKTRLISKDTSKNQVVLTMNMDPVDTATYYCAR</p> <p>MHPLVFDWSWQGQTLTVSSGGSGSDIELTQPQPSVAPQQTARISCSGDSLNRKVVWYQQKPGQAPVLIYKN</p> <p>NRPSGIPERFSGNSNGNTATLISGTQAEDEADYYCQSYDQKSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSSSEELQA</p> <p>NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE</p> <p>KTVAPTECS</p>
SEQ ID NO: 178	ADN MOR06475 de scFv MOR08168 lambda ligera	<p>GATATCGTGTGACACAGAGCCCTGCCACCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGGCCACCTGAGCTGCCGG</p> <p>GCCAGCCAGTTCATCGGCTCCGCTACCTGGCTGGTATCAGCAGAACGCCGGACAGCGCAGCCACTCG</p> <p>ATCTACGGCGCAGCAACAGAGCTACCGCGTGGCCAGATTTCTGGCAGCGCAGCGCAGCCACTCG</p> <p>ACCCCTGACCATCAGCAGCTGGAAACCCGAGGACTTCGCCACCTACTGCGCAGCAGTACTACGACTACCC</p> <p>AGACCTTCGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGGCGAGGGCGATCCGGGGTGGCGGAAGTGGAG</p> <p>CGCGAGGAAGGGAGGGGGCGGAAGCGCAGGTGCAATTGAAAGAGTCCGGCCCTGCCCTGGTGAAGCCTAC</p> <p>CCAGACCCCTGACCATCAGCAGCTGGCCAGGACTTCGCCACCTACTGCGCAGCAGAGGGCGGGAGTGGCTGGAT</p> <p>CAGACAGCTCCCGGCAAGGCCCTGGATGCACTGGCTGGCTGGAGTCAAGGGACGACGACAAGAGTACAGCA</p> <p>CCAGCCTGAAAACCCGGCTGACCATCTCAAGGACACCAGCAAGAACCCAGGTGGTGTCTACCATGACCAACA</p> <p>TGGACCCCGTGGACACCGCCACCTATTATTGCGCCCGGATGCACTGGCCCTGGTGTGATAGCTGGGGCCA</p> <p>GGGAACCCCTGGTGAAGTGTCCAGCGGGGGCTCCGGCGGAAGCGACATCAGCTGAGCGCAGCCCTGGGAACAAGGTGACTGGT</p> <p>GTCTGTGGCGCCGGAGACGCCAGAATCAGCTGAGCGGGAGCAGCCCTGGGAACAAGGTGACTGGT</p> <p>ATCAGCAGAACGCCGGCCAGGCTCCCGTGTGGTATCAGAAGAACACCGGCCAGCGGATCCTGGCTGAGC</p> <p>GGTTAGCGGCAGCACAGCGCAATCCGCCACCTGACCATCAGCGCAGCCAGGCGGAAGATGAGGCC</p> <p>GACTACTGCGCAGAGCTACGCGCAGAAAAGCTGGTGTGGCGGAGGCCAGGCAAGCTACCGTGT</p> <p>GGCCAGCCAAAGCCGCCCTAGCGTGACCCCTTCCCGCCAGCAGCGAGGAACCTGAGGCCAACAAAGGCC</p> <p>ACCCCTGGTGTGCTGATCAGCGACTCTACCCCTGGCGCCGTGACCGTGGCTGGCTGAAAGGCCAGCAGGCC</p> <p>GTGAAGGCCGGCTGGAGACAACCACCCAGCAAGCAGAGCAACAAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCT</p>

ES 2 949 159 T3

		GAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAAGAGCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACCCACGAGGGCAGCACCG TGGAGAAAACCGTGGCCCCACCGAGTCAGCAG
SEQ ID NO: 179	VH MOR08168	QVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFSYVINWVRQAPKGLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWGGTIVTSSASTKGPSPVFLAPSSKSTGGTAAL
SEQ ID NO: 180	ADN de VH MOR08168	Cagggtcaattggtcgactgtggcgaggactggtcgacgcgtggcggactggcgtggcggactggcgtggcactggcgt actgtgtcaactgggtcgacggccctggaaaggccgtggaaatgggtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgtggcgt cgtgaaggccgggttccacatcagccggacacacggcaagaaacccctgtacccgtacccgtacccgtacccgtacccgt actactgtgcacactggcgccaccgcacaacaatccgtacaagttcatggactgtggccaggcggacactggcgtggcgt actactgtgcacactggcgccaccgcacaacaatccgtacaagttcatggactgtggccaggcggacactggcgtggcgt
SEQ ID NO: 181	MOR08168 hlgG1 LALA pesada	QVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFSYVINWVRQAPKGLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWGGTIVTSSASTKGPSPVFLAPSSKSTGGTAAL GCLVKDVFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDKRVPEKS CDKHTCPCPAPAEAAAGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDVGEVHNAKTPREE QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
SEQ ID NO: 182	ADN de MOR08168 hlgG1 LALA pesada	CAGGTGCAATTGGTCGAGTCTGGCGGAGGAAGTGGTCAGCCTGGTGCAGCCTGGCAGCTGAGACTGAGCTGCGCCG CAGCGGCTTCACCTTCAGCAGTACGTGATCAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGAAAGGCCCTGGAAATGGGT GTCCGGCATCTTGGTCTGGCTGAACACCCACTACGCCGACAGCTGAAGGGCCGGTACCATCAGCG GGACAACAGCAAGAACACCCCTGACCTGAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTACTACTG TGCCAGACTGGCGCCACCGCCAACACATCCGTACAAGTTACATGGACGTGGGGCCAGGGCACACTGGT GACCGTCAGCTCAGTACGACCAAGGGCCCAAGCGTGTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG CGGCACAGCCGCCCTGGCTGGTAAGGACTACTCCCGAGCCCTGACCGTGTCTGGAACAGCG AGCCCTGACCTCCGGCGTGCACCCCTCCCGCTGCTGAGCAGCAGCCGTGACAGCTGTCAGCCTGCG GTGACAGTGGCCAGCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAAGCTGAACCCAAGCCAGCAACACC AAAGGTGGACAAGAGAGTGGGAGCCAAAGAGCTGGACAAGACCCACCTGCCAGCCCCAGA GGCAGCGGGCCGACCCCTCGTGTCTGTCCTGGCCAGACCTGATGATCAGCAGGG GAGGTGACCTGGTGGTGGAGCTGAGCCAGGAGCCAGGGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGGGACCG CGTGGAGGTGACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGGGTGTCC TGCTGACCGTGTGACCCAGGACTGGCTAACCGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCAACAAGGCCCTGC CAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCAAGGTGTACACCCCTGCC CCTCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGGTGTCCCTGACCTGCTGGTGAAGGGCTTACCCAGCGACA TCGCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACCACCCCGAGTGTGGACAGC GACGGCAGCTTCTCTGTACAGCAAGTGAACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGCAGCGTGTGACGAGGCCCTGACAACCAACTACACCCAGAAGGCCCTGAGCCTGTCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 183	VL MOR06475	DIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGVPARFSGSGSTDFLTISSL EPEDFATYYCQQYYDPQTFGQGTKEIK

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 184	ADN de MOR06475	VL	Gatatcgctgaccagagccggcgaccctgagctgtccggcgaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagccagttatgttctcggtatctggctggtaaccaggcagaaccaggtaagcaccgcgtctattaaatgtgtcttaatctgtcaactgggtccggcgcttttagcggctctggatccgcacggatttaccctgaccattagcagcgttggaaacctgaagacttgcgacttattatgcacagcgtattatgttccatcagacccattggccagggtacgaaagtgtaaattaaa
SEQ ID NO: 185	MOR06475 kappa ligera		DIVLTSQSPATLSLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGVPARFSGSGSGTDFTLISSL EPEDFATYYCQQYDYPQTFQGQTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNQSQEVTEQDSKDTSTLSLTKADYEHKVKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 186	ADN de MOR06475 kappa ligera		GATATCGTGCTGACCAGAGCCGGCGACCCTGAGCTGTCCGGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGCCAGTTATGGCTTCTCGTTATCTGGCTTGGTACAGCAGAACCCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAA TTTATGTCGCTCTAACTCGCAACTGGGCTCCGGCGCTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTCAG CCTGACCATTAAGCAGCTGGAAACCTGAAGACTTGCAGACTTATTATGGCAGCAGTATTATGATTATCCTCAGA CCTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAATAAACGTAACGGTGGCCGCTCTGGTTCATCTTCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTCCAGCTGTTCAACAACTTACCCCCGGAGGCCA AGGTGAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGAGAGCGGAACAGCCAGAGCGTCACCGAGCAGGACAG CAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTGAGCAAGGGCAGTACGAGAAGCATAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCACCGGGCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGCGAGTGC
SEQ ID NO: 187	MOR06475 hIgG1LALA MOR08168 scFv pesado (VH-3-VL)		QVQLKESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLNSRGGGVWIRQPPKGAKLEWLAWIDWDDDKSYSTSLKTRLTIKDTDS KNQVVLMTNMDPVDATYYCARMHPLVFDWSWGQGTIVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKRVEPKSCDKTDHT CPPCAPEAAGGSPVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIETKTIKAKGQPREQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCEVMHEALHNHYTQKSLSPKGKGGGS GSQVQLVESGGGLVCPGGLSLRCAASGFTSDYVINWVRQAPGKGLEWVSGISWGVNTHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMVDWVGQGTIVTWSGGGGSGGGSGGGSDIELTQ PPSVSVAPGQTARISCGSDLSRNKVYWWQKPGQAPVLIYKNNRPSGIPERFSGNSGNATLTISGTQAEDEAD YYCQSYDGQKSLVFGGGTKLTV

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 188	ADN MOR06475 hlgG1LALA MOR08168 scFv pesado (VH-3-VL)	de CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCCCTGGTAAACCGACCCAACCCCTGACCTGACCTGTACCTTT CCGGATTTAGCTGTCTAATCGTGGTGGTGGGGTGGATTGCCAGCCGCTGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTTGGATCGATGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCAGCCTGAAAACCGCTGACCTAGCA AAGATACCTCGAAAAATCAGGTGGTCTGACTATGACCAACATGGACCCCGTGGATAACGCCACCTATTATG CGCGCTATGCATCTTCTCTTGTGATCTTGGGCAAGGCACCCCTGGTGAAGGTTAGCTCAGTAGCA CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACAGCGGGCAGCCGCTGGCT GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGCGCCGTGACCGTGTCTGGACAGGGAGCCCTGACCTCCGGCTGC ACACCTTCCCAGCGTGTGAGAGCAGCGGGCTGTACAGCTGTCCAGCGTGGTGAAGTCCCAGCAGCA GCCTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG
SEQ ID NO: 189	MOR06475 hlgG1 LALA MOR08168 scFv pesado (VH- 4-VL)	QVQLKESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSNRGGVGWIRQPPGKALEWLAVIDWDDDKSYSTS LKRLTISKDTS KNQVVLMTNMDPVDATYYCARMHLPLVFDWSWQGQTLVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVWSNNGALTSVHFTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKRVEPKSCDKHT CPPCPAPEAAGGPSPVFLPPPKDPLMISRTPEVTCVV/DVSHEDPEVKFNWV/DVGEVHNAKTPREEQNSTY RVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPNNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHELNHYTQSKLSLSPGKGGS GSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYVNWVRQAPGKLEWVSGISWGVNTHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWGQTLTVSSGGGGGGGGGGGGGGGG DIELTQPPSVVAPGQTAIRSCSGDLSLRNKVYWWYQQKPGQAPVLVYKNNRPSGIPERFSGNSNGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTQLTV
SEQ ID NO: 190	ADN MOR06475 hlgG1 LALA MOR08168 scFv pesado (VH- 4-VL)	CAGGTGCAATTGAAAGAAAGCGGCCCCCTGGTAAACCGACCCAACCCCTGACCTGACCTGTACCTTT CCGGATTTAGCTGTCTAATCGTGGTGGTGGGGTGGATTGCCAGCCGCTGGAAAGCCCTCGAGT GGCTGGCTTGGATCGATGGGATGATGATAAGTCTTATAGCACCAGCCTGAAAACCGCTGACCTAGCA AAGATACCTCGAAAAATCAGGTGGTCTGACTATGACCAACATGGACCCCGTGGATAACGCCACCTATTATG CGCGCTATGCATCTTCTCTTGTGATCTTGGGCAAGGCACCCCTGGTGAAGGTTAGCTCAGTAGCA CCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACAGCGGGCAGCCGCTGGCT GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGCGCCGTGACCGTGTCTGGACAGGGAGCCCTGACCTCCGGCTGC ACACCTTCCCAGCGTGTGAGAGCAGCGGGCTGTACAGCTGTCCAGCGTGGTGAAGTCCCAGCAGCA GCCTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG

ES 2 949 159 T3

		<p>GAGCCAAGAGCTGGACAAGACCCACCTGCCCCCTGCCCCAGAGGCAGGGGGGACCCCTCGTGGCTCTGGTGAAGGACACCTGTGATGACGGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGAACACGCAAGACCAAGCCCAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTGGTGAACCGTGTGACCAAGACTGGCTGAACGCAAGGAATAACAAGTCAAGGTTCCAACAAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAGACCATCAGCAAGGCAAGGGCAGCCACGGGAGCCAGGTGACCTGCCCCCTCCGGAGGAGATGACAAGAACCAGGTGTCCTGACCTGTTGGTAAGGGCTTACCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCAACCCCGTAGTGTGGACAGCAGGGCAGCTGAGCTGAGCTGACGGTGTGACAGAACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAAGTGTGACGTGAGCTGAGCTGACAGAACGAGCGTCAACACCAACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGCCCCGGCAAGGGGGCTCCGGCGGAAGCGGGTGAATTGGTGAAGAGCGGTGGTGTGGTCTGGTCAAGGCTGGTGTGAGCTGTGAGCAAGCGGTTACCTTACCGATTATGTGATTAATTGGTCTGTAGGACCCGGTAAAGGTCTGGAATGGTTAGGATAGCTGGTAAAGGTGTTTACCATAGCGTGTGAAAGGTGTTTACCATAGCGTGTGATAATAGCAAAAATACCCCTGATCTGAGATGAATAGCCTGCGTGCAGAAGATAACCGCAGTTATTATTGTGACGTTCTGGTGAACCGTAAACCGAAATAATTCTGCTATAAATTATGGATGTGGGGTCAAGGGTACACTTAGCTTACCGTTAGCAGTGGTGGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGGGTGGTCAAGGGTGGTGGAGCTGATACTGCAACTGCCGCTCCAGCGTGGTGGTGGAGCTGATACTGCTGGTGTGAGCTGAGCTGGTGTGATACTGCGTAAAGTTATTGGTATCAGCAGAACCGGGTCAGGCTCGGTTCTGGTTATTATAAAATAACCGTCCGAGCGGTATTCCGAAACGTTAGCGTAGCAATAGCGGTAATACCGCAACCCCTGACCATAGCGGACCCAGGCAAGAGTGAAGCGATTATTATGTGAGAGTATGATGGTCAGAAAAGCTGGTTTGGTGGTGGCAGCTTACCGTGTG</p>
SEQ ID NO: 191	VL MOR08168ts	DIELTQPPSVVAPGQTARISCGDSLRLNKVWYQQKPGQAPVLVYKNNRPSGIPERFSGNSNGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP
SEQ ID NO: 192	ADN de VL MOR08168 ts	GACATCGAGCTGACTCAGCCCCCTAGCGTGTCACTGGCTCTGGCCAGACCGCTAGAATTAGCTGTAGCGGC GATAGCCTGCGTAACAAGGTCTACTGGTATCAGCAGAACGCCGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATAAG AACAAATAGGCCCTAGCGGCATCCCCGAGCGGTTAGCGGCTTAATAGCGGCAACACCGCTACCCGTACTATT GCGGCACTCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTGTCACTGCTACGAGGCCAGAAAGTCACTGGTCTTG GCGGCGGAACTAAGCTGACCGTGTGGACAGCCTAAGGCTGCCCCAGCGTGAACCTGTTCCCCCAGCA GCGAGGAGCTCAGGCCAACAGGCCACCCCTGGTGTGCTGTACCGGACTTCAACCCAGGCCGTGACCC TGGCTGGAAAGGCCACAGCAGGCCGTGAAGGCCGGTGGAGACCAACCCAGCAAGCAGAGCAAC AACAAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGTGGAAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGC CAGGTGACCCACGAGGCCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCAACCGAGTGCAGC
SEQ ID NO: 193	Lambda MOR08168 ts	DIELTQPPSVVAPGQTARISCGDSLRLNKVWYQQKPGQAPVLVYKNNRPSGIPERFSGNSNGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVETVAPTECS
SEQ ID NO: 194	ADN de lambda MOR08168 ts	GACATCGAGCTGACTCAGCCCCCTAGCGTGTCACTGGCTCTGGCCAGACCGCTAGAATTAGCTGTAGCGGC GATAGCCTGCGTAACAAGGTCTACTGGTATCAGCAGAACGCCGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTATAAG AACAAATAGGCCCTAGCGGCATCCCCGAGCGGTTAGCGGCTTAATAGCGGCAACACCGCTACCCGTACTATT GCGGCACTCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTGTCACTGCTACGAGGCCAGAAAGTCACTGGTCTTG GCGGCGGAACTAAGCTGACCGTGTGGACAGCCTAAGGCTGCCCCAGCGTGAACCTGTTCCCCCAGCA GCGAGGAGCTCAGGCCAACAGGCCACCCCTGGTGTGCTGTACCGGACTTCAACCCAGGCCGTGACCC TGGCTGGAAAGGCCACAGCAGGCCGTGAAGGCCGGTGGAGACCAACCCAGCAAGCAGAGCAAC AACAAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGTGGAAAGAGCCACAGGTCTACAGCTGC CAGGTGACCCACGAGGCCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCAACCGAGTGCAGC

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 195	MOR08168IgG 1LALA_6475sc Fv ts pesado	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVDVIIWVVRQAPGKGLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARLGATANNIRYKFMMDVWGGTTLVSSASTKGPSPFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALVQSSGLYSLSVVTVPSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKRVEPKSCKTHTCPCCPAPEAAGGSPVFLPPKPKDTLMSIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWVVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVTLPPREEMTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLSSKLTVDKSRW/QQGNVFCSCVMHEALHNHTQKSLSPGKGGSGGSIDLVTQSPATLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA5NRATGVPARFSGSGSDTFTLTISLEPEDFATYYCQQYYDYPQTFQGQTKVEIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGSQVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGLSLSNRGGGVGWRQPPGKALEWLAWIDWDDDKSYSTSLSKTRLTISDKTSKNQVVLTMNDPVDTATYYCARMHPLVFDWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 196	ADN MOR08168IgG 1LALA_6475sc Fv ts pesado	de
		CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGAGGACTGGTCCAGCCTGGCGGATCACTTAGACTGAGCTGTGCCGC TAGTGGCTCACCTTACGCACTATGTGATTAACCTGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGT GTCAGGCAATTAGTTGGAGCGGGTGAACACTCACTACGCCGATAGCGTAAGGGCCGGTTCACTATTAGCCG GGATAACTCTAAGAACACCCCTGACCTCAGATGAATAGCCTGAGAGGCCGAGGACACCGCCGCTACTACTG CGCTAGACTGGCGCTACCGCTAACAACATCCGCTATAAGTCAGGCGTGTGGGGCAGGGCACCCCTGGT CACAGTGTCTCAGCTAGCACTAAGGGCCCCTAGTGTCCCCCTGGCCCTAGCTCTAAGTCTACTAGCGGTG
		GCACCGCCGCTCTGGCTGCCCTGGCAAGGACTACTCCCCGAGGCCGTGACCGTGTCTGGAAATAGCGCGC CTCTGACTAGCGGAGTGCACACCTTCCCGCGTGCAGCTAGCGGCTGTATAGCCTGCTAGCGTCGT GACCGTGCCTAGCTCAGCCTGGGCACTCAGACCTATATCTGTAACGTAACGCAACAGCCTAGTAACACTAAG GTGGACAAGCGGGTGGAACTTAAGTCTTGCATAAGACTCACACCTGTCCCCCTGCCCTGCCAGAACGTC CTGGCGGACCTAGCGTGTCTGTTCCACCTAACGCTAAAGACACCCCTGATGATTAGTAGGACCCCGAAGT GACCTGCGTGTGGGAGCTAGCCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTATGTGGACCCCGTGG AAAGTGCACAACGCTAAGACTAACGCTAGAGGAGAACAGTATAACCTCCACCTATAGGGTGGTCACTGCTGA CCGTGCTCAGCAGGACTGGCTGAACGGCAAGAGTATAAGTCATAACAAAGGCCCTGCCCTGCC CTATCGAAAAGACTATCTAAGGCTAACGGCCAGCTAACGAGCTAACCCCTGAGCTAACCCCTGCCCTAGTAG AGAAGAGATGACTAAGAACACTAGGTGTCCCTGACCTGTCGGTAAGGGCTTACCCCTAGCGATATGCCGT GAGTGGGAGTCAACGGCCAGCCGAGAACACAACATAAGACTACCCCCCTGTGCTGGATAGCGACGCC TTCTTCTCTGACTACTCTAAACTGACCGTGGACAAGTCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGCTGTTCAGCTGCT TGCACGAGGCCCTGACAATCACTACACTCAGAAGTCACTGAGGCTGAGTCCCGCAAGGGCGGCTAGCG GTAGCGATATCGTGTACTCAGTCACCCGCTACCTGAGCTGAGGCTGGCGAGCGGGCTACACTGAGCT GTAGAGCTAGTCACTTATCGGCTACCGCTACCTGGCTGGTACAGCAGAAGCCGCCAGGCCCTAGACT GCTGATCTACGGCGCTAGTAATAGACTACCGCGCTGCCGCTAGGTTAGCGGCTCAGGATCAGGCC CTTACCCCTGACTATTAGTAGCCTGGAAACCCGAGGACTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTACTACGACTACC CTCAGACCCCTGCCAGGGAAACTAAGGTGAGATAAGGGCGTGGCGTAGGGCGAGGGCGATCAGG TGGTGGTGGTAGTGGCGGGAGGTAGTCAGGCTCAGCTGAAGAGTCAAGGCCCTGCCCTGGCAAGGCC CTCAGACCCCTGACCCCTGACCTGCACTTTAGCGCTTCTAGGCTGAGTAATAGAGGCCGGAGTGGCTG TTAGACAGCCTCCAGGCAAAGCCCTGGAGTGGCTGGCTGGAGTCACTGGGACGACGATAAGTC CTAGCCTGAAAAGTACTAGGCTGACAATCAGCAAGGACACTAGTAAACACCGGTGGCTGACTATGACTAATA TGGACCCCTGGAGACCCGCTACCTATTAGCGCTAGAAATGACCTCCACTGGTGGTCAAGCTGGG GGGAACTCTGGTACAGTCAGTACG
SEQ ID NO: 197	VL MOR08168 DI	SYELTQPPSVVAPGQTARISCGDSLRLNKVYWYQQKPGQAPVLVIYKNNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTAKLVL

ES 2 949 159 T3

SEQ ID NO: 198	ADN de VL MOR08168 DI	<pre>TCTTACGAGCTGACCCAGCCCCCTCCGTGTCCTGGCTCTGGCCAGACGCCAGAAATCTTGTCCGGCA CTCCCTCGGAACAAGGTGACTGGTATCAGCAGAACGCCGGCAGGCCCTGTGCTGGTATCTACAAGAA CAACCGGCCCTCGCATCCCCGAGAGATTCTGGCTCAACTCCGCAACACGCCACCCGTACAATCTCT GGCACACAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTGCCAGTCTACGACGCCAGAAATACTGGTGTCCGGC GGAGGCACCAAGCTGACAGTGTG</pre>
SEQ ID NO: 199	Lambda MOR08168 ligera	<pre>SYELTQPPSVVAPGQTARISCGDSLRLNKVYWYQQKPGQAPVLVYKNNRPSGIPERFGNSGNTATLTISGTQA EDEADYYCQSYDGQKSLVFGGTKLTVLQPKAAPSVTLPSSSEELQANKATLVLISDFYPGAVTVAKDSSP VKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</pre>
SEQ ID NO: 200	ADN de lambda MOR08168 ligera	<pre>TCTTACGAGCTGACCCAGCCCCCTCCGTGTCCTGGCTCTGGCCAGACGCCAGAAATCTTGTCCGGCA CTCCCTCGGAACAAGGTGACTGGTATCAGCAGAACGCCGGCAGGCCCTGTGCTGGTATCTACAAGAA CAACCGGCCCTCGCATCCCCGAGAGATTCTGGCTCAACTCCGCAACACGCCACCCGTACAATCTCT GGCACACAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTGCCAGTCTACGACGCCAGAAATACTGGTGTCCGGC GGAGGCACCAAGCTGACAGTGTGGGAAGCCTGAGCTAACGCTAAGGCTGCCAGCGTGAACCTGTTCCCCCAGCAGC GAGGAGCTGAGGCAACAGGCCACCCCTGGTGTGCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGGCCGTGACCTG GCCTGGAAGGGCGACAGCAGCCCGTGAAGGGCCGGTGGAGACCACCCCCAGCAAGCAGAGAACAA CAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCTGACCCCGAGCAGTGGAAAGGCCACAGGTCTACAGTGCCTA GGTACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC</pre>
SEQ ID NO: 201	MOR08168IgG 1LALA_6475sc Fv DI pesado	<pre>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYVINWVRQAPGKLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWGGTTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVWSNLNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSSVTVPSLQSLTQTYICNVNHPNSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLPPPKDMLISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREE QYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHEALHNHTQKSLSLSP GKGGSGGSIDLVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFQIGRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSG TDFTLTISLLEPEDFATYYCQYYDPQTFGQGTKEIKGGGGGGGGGGGGGGGGGGQVQLKESGPALVKPTQ TTLTCTFSGLSNRGGGVGWIRQPPGKALELWALIDWDDDKSYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPV DTATYYCARMHPLVFDSWGQGTLTVSS</pre>
SEQ ID NO: 202	ADN MOR08168IgG pesada	<pre>de CAGGTGCAGCTGGGAAATCAGGCCGAGGACTGGTCCAGCCTGGGGATCACTTAGACTGAGCTGTGCCGC TAGTGGCTTCACCTTAGCAGACTATGTGATTAACCTGGGTCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGT GTCAGGCATTAGTTGGAGCGGGGTGAACACTCACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCACTATTAGCCG</pre>

ES 2 949 159 T3

	1LALA_6475sc Fv DI	<p>GGATAACTCTAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGGAGGACACCGCCGCTACTACTG CGCTAGACTGGCGCTACCGCTAACAAACATCCGCTATAAGTTCATGGACGTGCCCCCAGGGCACCCCTGGT CACAGTGTCTCAGCTAGCACTAAGGGCCCTCAGTGTCCCCCTGGCCCTAGCTAAGTCTACTAGCGGTG GCACCGCCGCTGGGCTGCCGGTCAAGGACTACTCCCCGAGCCGTGACCGTGTGGAAATAGCGCG CTCTGACTAGCGGAGTGCACACCTTCCCCGGTGTGAGTCTAGCGGCTGTAGCCTGCTAGCGTGT GACCGTGCCTAGCTAGCCTGGGACTAGACACCTATATCTGTAACGTGAACCCAAGGCCAGTAACTAAG GTGGACAAGCGGGTGGAAACCTAACGTCAGCTGACGCCAGGAGCCCTGAAGTGAAGTCAATTGGTATGGACGGCGTGG GACCTGCGTGGTGGGAGCTAGCGTGTGGACCTAACGCTAAAGACACCCGTATGATTAGGACCCCGAAGT AAGTGCACAACGCTAACGACTAACGCTAGAGAGGAACAGTATAACTCCACCTATAGGGTGGTGTAGCTGA CCGTGCTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGAGTAAAGTGTAAAGTCTCTAACAGGCCGCTGCCG CTATCGAAAAGACTATCTAACGGCTAACGGCCAGGCTAGAGAACCCCGAGGTACACCCCTGCCCTAGTAG AGAAGAGATGACTAACGATAGCTGTCAGCTGAGGCTGAGGCTTCTACCTAGCGATATCGCG GAGTGGGAGTCTAACGGCAGGGAGAACAACTAACAGACTACCCCCCTGTGCTGGATAGCGACGGCT TTCTCCCTGACTCTAAACTGACCGTGAGCTAGGTGGCAGCGAGGCAACGTGTTAGCTGAGCTGA TGCACGAGGCCCTGACAACTACACTACAGAAGTCACTGAGCTGAGTCCGGCAAGGGCGCTAGCG GTAGCGATATCGTGTACTCAGTACCCCGTACCCCTGAGTCTGAGCCCTGGCGAGCGGGCTACACTGAGCT GTAGAGCTAGTCACTGGCTACCGTACCTGGCTGTATCAGCAGAACGCCGCCAGGCCCTAGACT GCTGATCTACGGCGCTAGTAATAGAGCTACCGCGTGTAGGTTAGCGGCTCAGGATCAGGCACCGA CTTACCCCTGACTATTAGTAGCCTGGAACCCGAGGACTCGTACCTACTACTGTCAGCAGTACTACGACTAC CTCAGACCTTCGCCAGGGAACTAACGGCTGAGGATTAAGGGCGTGGCGGTAGCGCGAGGCGGATCAGG TGGTGGTGGTAGTGGCGCGAGGAGTAGTCAGGCTCAGCTAACAGTCAAGGCTGAGTCCGGCTGCCCTG CTCAGACCCCTGACCTGACCTGCACTTTAGCGGCTTAGCCCTGAGTAATAGAGCGGCGAGTGGCTGG TTAGACGCTCAGGCAAAGCCCTGGAGTGGCTGGCTGGATCGACTGGGACGACATAAGTCTACTCCA CTAGCCTGAAAAGTACGGCTAACATCAGCAAGGACACTAGTAAAACCGAGTGGCTGACTATGACTATA TGGACCCCGTGGACACCGCTACCTATTAGCGCTAGAATGCACCTCCACTGGTGTGAGCTGGGCT GGAAACTCTGGTACAGTCAGTAGC</p>
SEQ ID NO: 203	VL MOR08168 GL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDSLRLNKVYWYQQKPGQAPVLVLYKNNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRAQA GDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCISDFYPGAVTVAKDSSP
SEQ ID NO: 204	ADN de VL MOR08168 GL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCTGAGCGTGTCACTGGCTCTGGCCAGACCGCTAGAACCTGAGCG GATAGCCTGAGAAAACAGGCTACTGGTATCAGCAGAACGCCGCCAGGCCCTGTGCTGGTACCTATAAG AACAAATAGGCTAGCGGATCCCCGAGCGGTTAGCGGCTTAATAGCGCAACACCGCTACCCCTGACTATT GTAGGGCTAGGCCGGCGACGAGGCCGACTACTACTGTCAGTCTACGACGCCAGAAGTCAGTGGCT GCGGCCGAACTAACGTCAGCGTCT
SEQ ID NO: 205	Lambda MOR08168 ligera GL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDSLRLNKVYWYQQKPGQAPVLVLYKNNRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRAQA GDEADYYCQSYDGQKSLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCISDFYPGAVTVAKDSSP VKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 206	ADN de lambda MOR08168 GL ligera	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCCTGAGCGTGTCACTGGCTCTGGGCCAGACCGCTAGAATCACCTGTAGCGGC GATAGCCTGAGAAAACAAGGTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGGCCCTGTGCTGGTACATATAAG AACAAATAGGCCTAGCGGCATCCCCGAGCGGTTAGCGGCTTAATAGCGCAACACCGCTACCCGTACTATT GTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGCCGACTACTACTGTCACTGAGCAGGCCAGAAGTCACTGGCTT GCCGGCGGAACTAAGCTGACCGTCTGGACAGCCTAAGGCTGCCCTAGCGTGAACCTGTTCCCCCAGCA GCGAGGAGCTCAGGCCAACAAGGCCACCCCTGGTGTGCTGATCAGGACTTCAACCCAGGCCGTGACCG TGGCCTGGAAGGCCACAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAAGAGCCACAGGTCTACAGCTG CAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCAACCGAGTGCAGC
SEQ ID NO: 207	MOR08168IgG 1LALA_6475sc Fv GL pesado	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVDYINWVRQAPGKLEWVSGISWSGVNTHYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGATANNIRYKFMDVWQGQTLTVSSASTKGPSPVFLPSSKSTSGGTAALG CLVKDVFPEPVTSVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLSLSVTPVSSSLGTQTYICNVNHPKNSNTKVDKRVPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPDKTLMSRTPETVCFVNWVVDVSHEDPEVFKFNWVYDGVEVHNATKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNQNPENNYKTTTPVPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK GGSGGS DIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQFIGSRYLAWYQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSTD FTLTISLEPEDFATYCCQYYDYPQTFGQGTKEVIEKGGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLKESGPALVKPTQL TLTCTFSGFSLNRGGVGWIROPPGKALEWLAWIDWDDKSYSLKLRTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDT ATYYCARMHLPVFDSWQGQTLTVSS
SEQ ID NO: 208	ADN de MOR08168IgG 1LALA_6475sc Fv GL pesado	GAGGTGCAGCTGCTGAATCAGGCCAGGACTGGTCAGCCTGGCGATCACTGAGACTGAGCTGTGCCG TAGTGGCTCACCTTAGCAGTATGTGATTAACCTGGCTCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGG GTCAGGCAATTAGTGGAGCGGGCTGAACACTCACTACCGCGATAGCGTGAAGGGCCGGTCACTATTAGCG GGATAACTCTAAAGAACCCCTGACCTCGAGATGAATAGCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTG CGCTAGACTGGCGCTACCGCTAACAACATCCGCTAACCTGAGTCACTGGACGTGTTGGCCAGGGCACCCCTGG CACAGTGTCTCAGCTAGCAGTAAAGGCCCTCAGTGTCCCCCTGGCCCTAGCTAACGCTACTAGCGGT GCACCCGCGCTCTGGCTGGCTGGCAAGGACTACTCCCGAGCCGTGACCGTGTCTGGAAATAGCGCG CTCTGACTAGCGGAGTGCACACCTTCCCGCGTGTGAGCTAGCGCTGTAGCTGTACTAGCGTGT GACCGTGCCTAGCTAGCCTGGGACTCAGACCTATATCTGAACTGAAACCCAAGCCTAGTAACACTAAG GTGGACAAGCGGGTGGAAACCTAAGTCTGCGATAAGACTCACACCTGCCCCCTGCCCCAGAACGCT CTGGCGGACCTAGCGTTCTGTTCCACCTAACGCTAACGACCCCTGATGATTAGTAGGACCCCGAAGT GACCTCGTGGTGGGAGCTCAGCCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTATGGACGGCGTGG AAAGTGCACAACGCTAAGACTAAAGCTAGAGAGGAACAGTATAACTCACCCTATAGGGTGGTCACTGCTGA CCGTGCTGACCCAGGACTGGCTGAACGCCAACAGTATAAGTGTAAAGTCTAACAAAGGCCCTGCCGCCC CTATCGAAAAGACTATCTCTAAGGCTAACGGCCAGGCTAGAGAACCCCGAGGTCTACCCCTGCCCTAGTAG AGAAGAGATGACTAAGAACCTAGGGTCTGGCTAACGCTAACGACCCCTAACCTAGCGATATCGCCGTG GAGTGGGAGTCTAACGCCAGCCGAGAACACAACTAAAGACTAACCCCTGTGCTGGATAGCGACGGCTCT TCTCCCTGTACTAAACTGACCGTGGACAAGTCTAGGGCAGCAGGGCAACGTTAGCTGAGCTGTAGCGTGA TGCACGAGGCCCTGACAAACTACACTACAGAAGTCACTGAGCTGAGTCCGGCAAGGGCGGTAGGGCG GTAGGGATATCGTCTACTCAGTACCGCTACCTGAGTCTGAGCCTGGGAGCTAGCTAACGAGTCACTAG GCTGATATCGCGCTAGTAATAGCCTACCGCGTGTGAGCTGAGGCTGAGCTAACGAGTCACTAG CTTACCCCTGACTATTAGTAGCTGGAAACCCGAGGACTCGTACCTACTACTGTCACTGAGCTAACGACT CTCAGACCTTCGGCCAGGGAACTAACGCTGAGGATTAAGGGCGTGGCGGTAGGGCGGAGGGCGGATCAGG TGGTGGTGGTAGTGGCGCGAGGAGTAGTCAGGTCAGCTGAAGAGTCAGGCCCTGCCGTCAAGCCTA CTCAGACCCCTGACCCCTGACCTGCACTTTAGCGCTTGTGAGTAAAGAGGGCGGAGGTGGCTG TTAGACAGCCTCAGGCAAAGCCCTGGAGTGGCTGGCTGGATCGACTGGACGACGATAAGTCTACTCCA CTAGCCTGAAACTAACGCTGACAACTCAGCAAGGACACTAGTAAACCCAGGTGGTCACTGACTATGACTAATA TGGACCCCTGGACACCCGCTACCTATTAGCGCTAGAATGCACTCCACTGGTGTGAGTAGCTGGGTCA GGGAACTCTGGTACAGTCAGTAC

En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen aquellos en los que los aminoácidos o los ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos se han mutado, pero tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones variables en comparación con las regiones

variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, mientras conservan sustancialmente la misma actividad terapéutica.

5 Puesto que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a LRP6, las secuencias de VH, VL, de la cadena ligera de longitud completa y de la cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) se pueden "mezclar y emparejar" para crear otros anticuerpos contra LRP6. Dichos anticuerpos contra LRP6 "mezclados y emparejados" se pueden analizar utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISA y otros ensayos descritos en la sección de Ejemplos). Cuando estas cadenas se mezclan y emparejan, una secuencia de VH de un emparejamiento VH/VL particular se debe reemplazar con una secuencia de VH estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un emparejamiento de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe remplazarse con una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de VL de un emparejamiento VH/VL particular debe remplazarse con una secuencia de VL estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un emparejamiento de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe remplazarse con una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento del mismo que tiene: una región variable de cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 34, 36, 44, 60 y 62; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 33, 35, 43, 59 y 61; una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 82, 106, 108, 128, 130 y 138; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 81 y 90, 105, 107, 127, 129 y 137; en donde el anticuerpo se une específicamente a LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero).

25 Los anticuerpos contra LRP6 se pueden unir al dominio propulsor β 1 de LRP6 que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VH de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 1, 21 y 47. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 2, 22 y 48. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VH de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 3, 23 y 49. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VL de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 4, 24 y 50. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VL de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 5, 25 y 51. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VL de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 6, 26 y 52. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N.º 91-3242; Chothia *et al.*, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia *et al.*, (1989) *Nature* 342: 877-883; y Al-Lazikani *et al.*, (1997) *J. Mol. Biol.* 273, 927-948).

35 Los anticuerpos contra LRP6 se pueden unir al dominio propulsor β 3 de LRP6 que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VH de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 69, 93 y 115. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 70, 94 y 116. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VH de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 71, 95 y 117. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VL de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 72, 96 y 118. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VL de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 73, 97 y 119. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VL de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 74, 98 y 120. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N.º 91-3242; Chothia *et al.*, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia *et al.*, (1989) *Nature* 342: 877-883; y Al-Lazikani *et al.*, (1997) *J. Mol. Biol.* 273, 927-948).

50 Puesto que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a LRP6 y que la especificidad de unión a antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de CDR1, 2 y 3 de VH y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de VL se pueden "mezclar y emparejar" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y emparejar, aunque cada uno de los anticuerpos debe contener una CDR1, 2 y 3 de VH y una CDR1, 2 y 3 de VL para crear otras moléculas de unión a LRP6. Dichos anticuerpos contra LRP6 "mezclados y emparejados" se pueden analizar utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y los descritos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA). Cuando las secuencias de CDR de VH se mezclan y emparejan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VH particular se debe reemplazar con secuencias de CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias de CDR de VL se mezclan y emparejan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VL particular debe remplazarse con una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. Será muy evidente para los expertos en la materia que pueden crearse secuencias de VH y VL novedosas sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de VH y/o VL con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en el presente documento para anticuerpos monoclonales.

55 Un anticuerpo monoclonal contra propulsor β 1 de LRP6 aislado o un fragmento del mismo puede comprender una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 21 y 47; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22 y 48; una CDR3 de región variable de cadena pesada que

comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 23 y 49; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 24 y 50; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 25 y 51; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 26 y 52; en donde el anticuerpo se une a LRP6.

5 Un anticuerpo monoclonal contra propulsor β 3 de LRP6 aislado o un fragmento del mismo puede comprender una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69, 93 y 115; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70, 94 y 116; una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 71, 95 y 117; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 72, 96 y 118; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73, 97 y 119; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, 98 y 120; en donde el anticuerpo se une a LRP6.

10 En una realización específica, el anticuerpo comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1; una CDR2 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 2; una CDR3 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4; una CDR2 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5; y una CDR3 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 6.

15 En una realización específica, el anticuerpo comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 21; una CDR2 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 22; una CDR3 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 23; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24; una CDR2 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 25; y una CDR3 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 26.

20 En una realización específica, el anticuerpo comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 47; una CDR2 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 48; una CDR3 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 49; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 50; una CDR2 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 51; y una CDR3 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 52.

25 En una realización específica, el anticuerpo comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 69; una CDR2 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 70; una CDR3 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 71; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 72; una CDR2 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 73; y una CDR3 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 74.

30 En una realización específica, el anticuerpo comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 93; una CDR2 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 94; una CDR3 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 95; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 96; una CDR2 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 97; y una CDR3 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 98.

35 En una realización específica, el anticuerpo comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 115; una CDR2 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 116; una CDR3 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 117; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 118; una CDR2 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 119; y una CDR3 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 120.

40 En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 14 y VL de SEQ ID NO: 13. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 34 y VL de SEQ ID NO: 33. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 35 y VL de SEQ ID NO: 36. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 43 y VL de SEQ ID NO: 44. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 60 y VL de SEQ ID NO: 59. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 62 y VL de SEQ ID NO: 61. En una realización específica, el anticuerpo comprende una SEQ ID NO: 82 y VL de SEQ ID NO: 81. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 90 y VL de SEQ ID NO: 89. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 106 y VL de SEQ ID NO: 105. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 108 y VL de SEQ ID NO: 107. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 128 y VL de SEQ ID NO: 127. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 130 y VL de SEQ ID NO: 129. En una realización específica, el anticuerpo comprende un VH de SEQ ID NO: 138 y VL de SEQ ID NO: 137.

45 En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo que se describe en la Tabla 1.

50 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena ligera o pesada o cadenas ligeras o pesadas de longitud completa que son "el producto de" o "derivadas de" una secuencia de estirpe

germinal particular si se obtienen las regiones variables o las cadenas de longitud completa del anticuerpo de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Dichos sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o cribar una biblioteca de inmunoglobulinas humanas expresadas en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la estirpe germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana que está más cercana en secuencia (es decir, el % de identidad más alto) con la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de la estirpe germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la estirpe germinal debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o introducción intencionada de mutaciones dirigidas al sitio. Sin embargo, en las regiones marco conservadas de VH o VL, un anticuerpo humano seleccionado es normalmente al menos un 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de estirpe germinal humana y contiene restos de aminoácidos que identifican al anticuerpo humano como humano en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la estirpe germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la estirpe germinal murina). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de estirpe germinal. Normalmente, un anticuerpo humano recombinante no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana en las regiones marco conservadas de VH o VL. En determinados casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser derivados de anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, anticuerpos de dominio, nanocuerpos y unicuerpos. Un "anticuerpo monocatenario" (scFv) consiste en una única cadena polipeptídica que comprende un dominio VL unido a un dominio V, en donde el dominio VL y el dominio VH se emparejan para formar una molécula monovalente. Un anticuerpo monocatenario se puede preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426 y Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Un "diacuerpo" consiste en dos cadenas, comprendiendo cada cadena una región variable de cadena pesada conectada a una región variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica conectada por un enlazador peptídico corto, en donde las dos regiones de la misma cadena no se emparejan entre sí sino con dominios complementarios en la otra cadena para formar una molécula biespecífica. Se conocen en la técnica métodos de preparación de diacuerpos (véase, por ejemplo, Holliger *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; y Poljak *et al.*, (1994) *Structure* 2:1121-1123). Los anticuerpos de dominio (dAb) son unidades de unión funcionales pequeñas de anticuerpos, correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de los anticuerpos. Los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas celulares bacterianos, de levadura y de mamífero. Se conocen en la técnica detalles adicionales de los anticuerpos de dominio y métodos de producción de los mismos (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6.696.245; las Patentes Europeas 0368684 y 0616640; los documentos WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609. Los nanocuerpos derivan de las cadenas pesadas de un anticuerpo. Normalmente un nanocuerpo comprende un único dominio variable y dos dominios constantes (CH2 y CH3) y mantiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. Los nanocuerpos se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.765.087, la Patente de EE.UU. N.º 6.838.254 y el documento WO 06/079372). Los unicuerpos consisten en una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo IgG4. Los unicuerpos también se pueden preparar por eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. Se pueden encontrar detalles adicionales de los unicuerpos y métodos para prepararlos en el documento WO2007/059782.

Además de los ligandos Wnt, se espera que los anticuerpos contra Propulsor 1 de LRP6 inhiban la interacción con otros ligandos de unión a Propulsor 1 (por ejemplo, Esclerostina, Dkk1). De manera similar, se espera que los anticuerpos contra Propulsor 3 inhiban la interacción con otros ligandos de unión a Propulsor 3 (por ejemplo, Dkk1). Además, se puede esperar que los anticuerpos de unión a propulsor 1 y 3 afecten a la actividad de otros moduladores de la señalización de Wnt, por ejemplo, espondinas R

Anticuerpos homólogos

En otra realización más, el anticuerpo comprende secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias descritas en la Tabla 1 y conserva las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal aislado (o un fragmento funcional del mismo) puede comprender una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 34, 36, 44, 60 y 62; la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 33, 37, 43, 59 y 61; el anticuerpo se une al propulsor β 1 de LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de

macaco cangrejero) e inhibe la actividad de señalización de las proteínas Wnt dependientes del propulsor β 1, que se puede medir en el ensayo de gen indicador de Wnt u otra medida de señalización dirigida por Wnt (por ejemplo, fosforilación de LRP6, estabilización de catenina β y translocación nuclear, proliferación/supervivencia celular) como se describe en el presente documento. En un ejemplo específico, dichos anticuerpos tienen un valor de CE_{50} en un ensayo de Wnt1 de menos de 10 nM cuando se usa medio acondicionado o se usan células transfectadas.

Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal aislado (o un fragmento funcional del mismo) puede comprender una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 82, 89, 106, 108, 128, 130 y 138; la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 81, 90, 105, 107, 127, 129 y 137; el anticuerpo se une al propulsor β 3 de LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) e inhibe la actividad de señalización de las proteínas Wnt dependientes del propulsor β 3, que se puede medir en el ensayo de gen indicador de Wnt u otra medida de señalización dirigida por Wnt (por ejemplo, fosforilación de LRP6, estabilización de catenina β y translocación nuclear, proliferación/supervivencia celular) como se describe en el presente documento. En un ejemplo específico, dichos anticuerpos tienen un valor de CE_{50} en un ensayo de Wnt3a de menos de 10 nM cuando se usa medio acondicionado o se usan células transfectadas.

Además, para los anticuerpos contra Propulsor 1, se muestran secuencias de nucleótidos parentales de cadena pesada variable en SEQ ID NO: 16, 38 y 64. Se muestra secuencias de nucleótidos parentales de cadena ligera variable en las SEQ ID NO: 15, 37 y 63. Se muestran secuencias de cadena pesada de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero en las SEQ ID NO: 20, 42 y 68. Se muestran secuencias de cadena ligera de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero en SEQ ID NO: 19, 41 y 67. En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen aminoácidos o ácidos nucleicos que se han mutado, pero que aún tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con las secuencias descritas anteriormente. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos por supresión, inserción o sustitución de aminoácidos en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en la secuencia descrita anteriormente.

Además, para los anticuerpos contra Propulsor 3, se muestran secuencias de nucleótidos parentales de cadena pesada variable en SEQ ID NO: 84, 110 y 132. Se muestra secuencias de nucleótidos parentales de cadena ligera variable en SEQ ID NO: 83, 109 y 131. Se muestran secuencias de cadena pesada de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero en SEQ ID NO: 88, 91, 114, 136 y 140. Se muestran secuencias de nucleótidos de cadena ligera de longitud completa optimizadas para la expresión en una célula de mamífero en SEQ ID NO: 87, 92, 113, 135 y 139. En algunas realizaciones, los anticuerpos incluyen aminoácidos o ácidos nucleicos que se han mutado, pero que aún tienen al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con las secuencias descritas anteriormente. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos por supresión, inserción o sustitución de aminoácidos en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en la secuencia descrita anteriormente.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser idénticas excepto por una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Se puede obtener un anticuerpo que tenga regiones VH y VL que tengan una identidad alta (es decir, un 80 % o más) con las regiones VH y VL de los anticuerpos contra Propulsor 1 descritos en la Tabla 1 por mutagénesis (es decir, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NO: 14, 34, 60, 13, 33 y 59 respectivamente, seguida de pruebas del anticuerpo alterado codificado para determinar la función conservada utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Se puede obtener un anticuerpo que tenga regiones VH y VL que tengan una identidad alta (es decir, un 80 % o más) con las regiones VH y VL de los anticuerpos contra Propulsor 3 descritos en la Tabla 1 por mutagénesis (es decir, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NO: 82, 106, 128, 81, 105 y 127 respectivamente, seguida de pruebas del anticuerpo alterado codificado para determinar la función conservada utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

En otras realizaciones, las regiones variables de secuencias de nucleótidos de cadena pesada y/o cadena ligera pueden ser un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias expuestas anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad" entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad es igual al número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que debe ser introducido para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

Adicionalmente o como alternativa, las secuencias de proteínas se pueden usar además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Por ejemplo, dichas búsquedas se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2.0) de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

5 Anticuerpos con modificaciones conservadoras

En determinadas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de 10 CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR tienen secuencias de aminoácidos específicas basadas en los anticuerpos descritos en el presente documento o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos contra LRP6.

15 Un anticuerpo monoclonal contra Propulsor 1 aislado, o un fragmento funcional del mismo, puede consistir de una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde: las secuencias de aminoácidos de CDR1 de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 21 y 47, y modificaciones 20 conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de CDR2 de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22 y 48, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de CDR3 de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 23 y 49, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de CDR1 de regiones variables de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 24, 50, y modificaciones 25 conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de CDR2 de regiones variables de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 25 y 51, y modificaciones conservadoras de las mismas; las regiones variables de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 26 y 52, y modificaciones conservadoras de las mismas; el anticuerpo o fragmento del mismo se une 30 específicamente a LRP6 e inhibe la actividad de LRP6 mediante la inhibición de una vía de señalización de Wnt, que se puede medir en el ensayo de gen indicador de Wnt u otra medida de señalización dirigida por Wnt (por ejemplo, fosforilación de LRP6, estabilización de catenina β y translocación nuclear, proliferación/supervivencia celular) como se describe en el presente documento.

Un anticuerpo monoclonal contra Propulsor 3 aislado, o un fragmento del mismo, puede consistir de una región variable 35 de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde: las secuencias de aminoácidos de CDR1 de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69, 93 y 115, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de CDR2 de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70, 94 y 116, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos 40 de CDR3 de región variable de cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 71, 95 y 117, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de CDR1 de regiones variables de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 72, 96 y 118, y modificaciones conservadoras de las mismas; las secuencias de aminoácidos de CDR2 de regiones variables de cadena ligera se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73, 97 y 119, y modificaciones conservadoras de las mismas; las regiones variables de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, 98 y 120, y 45 modificaciones conservadoras de las mismas; el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a LRP6 e inhibe las actividades de las proteínas Wnt dependientes de Propulsor 3, que se pueden medir en el ensayo de gen indicador de Wnt u otra medida de señalización dirigida por Wnt (por ejemplo, fosforilación de LRP6, estabilización de catenina β y translocación nuclear, proliferación/supervivencia celular) como se describe en el presente documento.

50 Anticuerpos que se unen al mismo epítopo

En determinadas realizaciones, los anticuerpos se unen al mismo epítopo que los anticuerpos contra LRP6 descritos en la Tabla 1. Por lo tanto, se pueden identificar anticuerpos adicionales en función de su capacidad para competir de forma cruzada (es decir, para inhibir competitivamente la unión, de una manera estadísticamente significativa) con los 55 anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención en ensayos de unión de LRP6. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de los anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención a una proteína LRP6 (es decir, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo por la unión a LRP6; dicho anticuerpo se puede unir, de acuerdo con la teoría no limitante, al mismo epítopo o a uno relacionado (es decir, un epítopo estructuralmente similar o espacialmente proximal) en la proteína LRP6 como el anticuerpo con el que compite.

Anticuerpos genomanipulados y modificados

En algunas realizaciones, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención se puede preparar adicionalmente 65 utilizando un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de VH y/o VL que se muestran en el presente documento

como material de partida para genomanipular un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado que puede tener propiedades alteradas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede genomanipular modificando uno o más restos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco conservadas. Adicionalmente o como alternativa, un anticuerpo se puede genomanipular modificando restos dentro de la región o regiones constantes, por ejemplo, para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de genomanipulación de la región variable que puede realizarse es injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácidos que están ubicados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones antígeno-anticuerpo, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyan secuencias de CDR del anticuerpo de origen natural específico injertadas en secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann *et al.*, (1998) *Nature* 332:323-327; Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321:522-525; Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 86:10029-10033; Patente de EE.UU. N.º 5.225.539 de Winter y Patentes de EE.UU. N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*)

Un anticuerpo monoclonal contra Propulsor 1 aislado, o un fragmento del mismo, puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 21 y 47; secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22 y 48; secuencias de CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 23 y 49, respectivamente; y una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 24 y 50; secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 25 y 51; y secuencias de CDR3 que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 26 y 52, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias de CDR de VH y VL de anticuerpos monoclonales, pero pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

Un anticuerpo monoclonal contra Propulsor 3 aislado, o un fragmento del mismo, puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69, 93 y 115; secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70, 100 y 116; secuencias de CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 71, 95 y 117, respectivamente; y una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 72, 96 y 118; secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73, 97 y 119; y secuencias de CDR3 que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, 98 y 120, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos contienen las secuencias de CDR de VH y VL de anticuerpos monoclonales, pero pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

Dichas secuencias marco se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de estirpe germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de estirpe germinal para genes de la región variable de cadena ligera y pesada humanas se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de la estirpe germinal humana "Vase" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N.º 91-3242; Chothia *et al.*, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia *et al.*, (1989) *Nature* 342:877-883; y Al-Lazikani *et al.*, (1997) *J. Mol. Biol.* 273:927-948; Tomlinson *et al.*, (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox *et al.*, (1994) *Eur. J Immunol.* 24:827-836.

Un ejemplo de secuencias marco para su uso en los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco utilizadas por anticuerpos seleccionados para su uso de acuerdo con la invención, es decir, secuencias consenso y/o secuencias marco utilizadas por anticuerpos monoclonales. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 de VH, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de VL, pueden injertarse en regiones marco conservadas que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal del que deriva la secuencia marco, o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la estirpe germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en determinados casos es beneficioso mutar restos dentro de las regiones marco conservadas para mantener o mejorar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*).

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo

de interés, conocido como "maduración por afinidad". Se puede realizar una mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir la o las mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en el presente documento y se proporciona en los Ejemplos. Se pueden introducir modificaciones conservadoras (como se ha analizado anteriormente). Las mutaciones 5 pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. Además, normalmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos dentro de una región CDR.

Un anticuerpo monoclonal contra Propulsor 1 aislado, o un fragmento del mismo, puede consistir en una región variable 10 de cadena pesada que tiene: una región CDR1 de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NO: 1, 21 y 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 1, 21 y 47; una región CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22 y 48, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos 15 en comparación con SEQ ID NO: 2, 22 y 48; una región CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 23 y 49, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 3, 23 y 49; una región CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 24 20 y 50, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 4, 24 y 50; una región CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 25 y 51, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 5, 25 y 51; y una región CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 26 25 y 52, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 6, 26 y 52.

Un anticuerpo monoclonal contra Propulsor 3 aislado, o un fragmento del mismo, puede consistir en una región variable de cadena pesada que tiene: una región CDR1 de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NO: 69, 93 y 115 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 69, 93 y 115; una región CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70, 94 y 116, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 70, 94 y 116; una región CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 71, 95 y 117, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 71, 95 y 117; 30 una región CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 72, 96 y 118, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 72, 96 y 118; una región CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73, 97 y 119, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 73, 97 y 119; 35 y una región CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, 98 y 120, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 74, 98 y 120.

Injerto de fragmentos de anticuerpos en marcos o armazones alternativos

45 Puede emplearse una amplia diversidad de marcos o armazones de anticuerpos/inmunoglobulinas siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente a LRP6. Dichos marcos o armazones incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de las mismas, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferentemente que tienen aspectos humanizados. Los expertos en la materia continúan descubriendo y desarrollando marcos, armazones y fragmentos novedosos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos no basados en inmunoglobulinas se generan utilizando armazones no basados 50 en inmunoglobulinas en los que se pueden injertar las CDR. Se pueden emplear marcos y armazones que no sean de inmunoglobulina conocidos o futuros, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína LRP6 diana (es decir, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero). Los marcos o armazones que no son de inmunoglobulina conocidos incluyen, pero sin limitación, fibronectina (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), ankirina (Molecular Partners AG, Zúrich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Proteína A (Affibody AG, Suecia) y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

60 Los armazones de fibronectina se basan en el dominio de fibronectina de tipo III (por ejemplo, el décimo módulo de la fibronectina de tipo III (dominio ¹⁰ Fn3)). El dominio de fibronectina de tipo III tiene 7 u 8 cadenas beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y además contienen bucles (análogos a las CDR) que conectan las cadenas beta entre sí y están expuestos a los disolventes. Hay al menos

tres de bucles de este tipo en cada uno de los bordes del sándwich de láminas beta, en que el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las cadenas beta (véase el documento US 6.818.418). Estos armazones basados en fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue general está estrechamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de cadena pesada, que comprende toda la unidad de reconocimiento de antígeno en IgG de camello y llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo que no es inmunoglobulina imita las propiedades de unión al antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos armazones se pueden utilizar en una estrategia de aleatorización y redistribución de bucles *in vitro* que es similar al proceso de maduración por afinidad de anticuerpos *in vivo*. Estas moléculas basadas en fibronectina se pueden usar como armazones donde las regiones de bucle de la molécula se pueden reemplazar por CDR utilizando técnicas de clonación convencionales.

La tecnología de ankirina se basa en el uso de proteínas con módulos repetidos derivados de ankirina como armazones para portar regiones variables que se pueden usar para unirse a diferentes dianas. El módulo de repetición de ankirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste en dos hélices α antiparalelas y un giro β . La unión de las regiones variables se optimiza principalmente utilizando la presentación de ribosomas.

Los avímeros derivan de proteínas que contienen dominio A natural tales como LRP6. Estos dominios se usan por naturaleza para interacciones proteína-proteína y en seres humanos más de 250 proteínas se basan estructuralmente en dominios A. Los avímeros consisten en un determinado número de monómeros de "dominio A" diferentes (2-10) unidos a través de enlazadores de aminoácidos. Pueden crearse avímeros que se pueden unir al antígeno diana utilizando la metodología descrita, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20040175756; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

Los ligandos de afinidad de aficuerpos son proteínas pequeñas y sencillas compuestas por un haz de tres hélices basado en el armazón de uno de los dominios de unión a IgG de la Proteína A. La Proteína A es una proteína de superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de armazón consiste en 58 aminoácidos, 13 de los cuales se aleatorizan para generar bibliotecas de aficuerpos con una gran cantidad de variantes de ligandos (véase, por ejemplo, el documento US 5.831.012). Las moléculas de aficuerpos imitan a los anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de las moléculas de aficuerpos es similar al de un anticuerpo.

Las anticalinas son productos desarrollados por la empresa Pieris ProteoLab AG. Derivan de las lipocalinas, un grupo extenso de proteínas pequeñas y robustas que habitualmente están implicadas en el transporte o almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales se encuentran en tejidos humanos o líquidos corporales. La arquitectura de la proteína recuerda a las inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de un marco rígido. Sin embargo, a diferencia de los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas están compuestas por una única cadena polipeptídica con 160 a 180 restos de aminoácidos, que son ligeramente más grandes que un único dominio de inmunoglobulina. El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra una plasticidad estructural pronunciada y tolera una diversidad de cadenas laterales. Por lo tanto, el sitio de unión puede remodelarse en un proceso patentado para que reconozca moléculas diana indicadas de diferente forma con alta afinidad y especificidad. Una proteína de la familia de las lipocalinas, la proteína de unión a bilina (BBP) de *Pieris brassicae* se ha utilizado para desarrollar anticalinas mutagenizando el conjunto de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe anticalinas se encuentra en la Publicación PCT N.º WO 199916873.

Las moléculas de afilina son pequeñas proteínas que no son inmunoglobulinas que están diseñadas para afinidades específicas hacia proteínas y moléculas pequeñas. Pueden seleccionarse muy rápidamente nuevas moléculas de afilina a partir de dos colecciones, cada una de las cuales se basa en una proteína de armazón de origen humano diferente. Las moléculas de afilina no muestran homología estructural alguna con las proteínas de inmunoglobulina. Actualmente, se emplean dos armazones de afilina, uno de los cuales es gamma cristalina, una proteína estructural del cristalino del ojo humano y el otro es de proteínas de la superfamilia "ubiquitina". Ambos armazones humanos son muy pequeños, muestran estabilidad a altas temperaturas y son casi resistentes a cambios de pH y agentes desnaturalizantes. Esta alta estabilidad se debe principalmente a la estructura de lámina beta expandida de las proteínas. En el documento WO200104144 se describen ejemplos de proteínas derivadas de gamma cristalina y en el documento WO2004106368 se describen ejemplos de proteínas "similares a ubiquitina".

Los miméticos de epítitos de proteínas (PEM) son moléculas de tamaño mediano, cíclicas, similares a péptidos (PM 1-2 kDa) que imitan las estructuras secundarias de las proteínas en forma de horquilla beta, la principal estructura secundaria implicada en las interacciones proteína-proteína.

En algunas realizaciones, los Fab se convierten al formato de IgG1 silenciosa cambiando la región Fc. Por ejemplo, los anticuerpos MOR08168, MOR08545, MOR06706, MOR06475, MOR08193 y MOR08473 de la Tabla 1 se pueden convertir al formato de IgG1 añadiendo la secuencia de aminoácidos:

CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTIASKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 209).

5 y sustituyendo la cadena ligera por: CS si la cadena ligera es lambda o C si la cadena ligera es kappa. Como se usa en el presente documento, una "IgG1 silenciosa" es una secuencia de Fc de IgG1 en la que la secuencia de aminoácidos se ha alterado para disminuir las funciones efectoras mediadas por Fc (por ejemplo, ADCC y/o CDC). Un anticuerpo de este tipo tendrá normalmente una unión reducida a receptores de Fc. En algunas otras realizaciones, los Fab se convierten al formato de IgG2. Por ejemplo, los anticuerpos MOR08168, MOR08545, MOR06706, MOR06475, MOR08193 y
 10 MOR08473 de la Tabla 1 se pueden convertir al formato de IgG2 sustituyendo la secuencia constante con la secuencia constante por la cadena pesada de IgG2:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP
 APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIASKT
 KGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 210).

15 Anticuerpos humanos o humanizados

Se pueden unir anticuerpos totalmente humanos específicamente a una proteína LRP6 (es decir, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero). En comparación con los anticuerpos químéricos o humanizados, los anticuerpos contra LRP6 humana tienen una antigenicidad adicionalmente reducida cuando se administran a sujetos humanos.

20 Los anticuerpos contra LRP6 humana pueden generarse utilizando métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, la tecnología de humanización utilizada para convertir anticuerpos no humanos en anticuerpos humanos genomanipulados. La publicación de la patente de EE.UU. N.º 20050008625 describe un método *in vivo* para reemplazar en un anticuerpo una región variable de un anticuerpo no humano con una región variable humana manteniendo las
 25 mismas características de unión o proporcionando mejores características de unión con respecto a las del anticuerpo no humano. El método se basa en el reemplazo guiado por epítopo de regiones variables de un anticuerpo de referencia no humano con un anticuerpo totalmente humano. El anticuerpo humano resultante generalmente no está relacionado estructuralmente con el anticuerpo no humano de referencia, pero se une al mismo epítopo en el mismo antígeno que el anticuerpo de referencia. En resumen, el método en serie de reemplazo de complementariedad guiado por epítopo se habilita mediante la creación de una competencia en las células entre un "competidor" y una biblioteca de diversos híbridos del anticuerpo de referencia ("anticuerpos de prueba") en la unión a cantidades limitantes de antígeno en presencia de un sistema indicador que responde a la unión del anticuerpo de prueba al antígeno. El competidor puede ser el anticuerpo de referencia o derivado del mismo, como un fragmento Fv monocatenario. El competidor también puede ser un ligando natural o artificial del antígeno que se une al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia. Los únicos requisitos del
 30 competidor son que se una al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia y que compita con el anticuerpo de referencia por la unión al antígeno. Los anticuerpos de prueba tienen una región V de unión al antígeno en común del anticuerpo de referencia no humano, y la otra región V elegida al azar de una fuente diversa tal como una biblioteca de repertorio de anticuerpos humanos. La región V común del anticuerpo de referencia sirve como guía, colocando los anticuerpos de prueba en el mismo epítopo en el antígeno y en la misma orientación, de modo que la selección esté sesgada hacia la
 35 mayor fidelidad de unión del antígeno al anticuerpo de referencia.

40

45 Se pueden usar muchos tipos de sistemas indicadores para detectar las interacciones deseadas entre los anticuerpos de prueba y el antígeno. Por ejemplo, los fragmentos indicadores complementarios pueden estar unidos al antígeno y al anticuerpo de prueba, respectivamente, de modo que la activación del indicador por complementación de fragmentos solo se produce cuando el anticuerpo de prueba se une al antígeno. Cuando las fusiones de anticuerpo de prueba- y antígeno-fragmento indicador se coexpresan con un competidor, la activación del indicador se vuelve dependiente de la capacidad del anticuerpo de prueba para competir con el competidor, que es proporcional a la afinidad del anticuerpo de prueba por el antígeno. Otros sistemas indicadores que se pueden usar incluyen el reactivador de un sistema de reactivación de

indicadores autoinhibidos (RAIR) como se divulga en la Solicitud de patente de EE.UU. con N.º de serie 10/208.730 (N.º de Publicación 20030198971), o el sistema de activación competitivo divulgado en la Solicitud de Patente de EE.UU. con N.º de serie 10/076.845 (N.º de Publicación 20030157579).

5 Con el sistema de reemplazo de complementariedad guiado por epítopos en serie, se realiza una selección para identificar las células que expresen un único anticuerpo de prueba junto con los componentes competidor, antígeno e indicador. En estas células, cada anticuerpo de prueba compite uno a uno con el competidor por la unión a una cantidad limitante de antígeno. La actividad del indicador es proporcional a la cantidad de antígeno unido al anticuerpo de prueba, que a su vez es proporcional a la afinidad del anticuerpo de prueba por el antígeno y la estabilidad del anticuerpo de prueba. Los 10 anticuerpos de prueba se seleccionan inicialmente en función de su actividad con respecto a la del anticuerpo de referencia cuando se expresan como el anticuerpo de prueba. El resultado de la primera ronda de selección es un conjunto de anticuerpos "híbridos", cada uno de los cuales está compuesto por la misma región V no humana del anticuerpo de referencia y una región V humana de la biblioteca, y cada uno de los cuales se une al mismo epítopo en el antígeno que el anticuerpo de referencia. Uno de los anticuerpos híbridos más seleccionados en la primera ronda tendrá una afinidad 15 por el antígeno comparable o superior a la del anticuerpo de referencia.

En la segunda etapa de reemplazo de la región V, las regiones V humanas seleccionadas en la primera etapa se usan como guía para la selección de reemplazos humanos para la región V restante del anticuerpo de referencia no humano 20 con una biblioteca diversa de regiones V humanas afines. Los anticuerpos híbridos seleccionados en la primera ronda también se pueden usar como competidores para la segunda ronda de selección. El resultado de la segunda ronda de selección es un conjunto de anticuerpos totalmente humanos que difieren estructuralmente del anticuerpo de referencia, pero que compiten con el anticuerpo de referencia por la unión al mismo antígeno. Algunos de los anticuerpos humanos 25 seleccionados se unen al mismo epítopo en el mismo antígeno que el anticuerpo de referencia. Entre estos anticuerpos humanos seleccionados, uno o más se unen al mismo epítopo con una afinidad que es similar o superior a la del anticuerpo de referencia.

Utilizando uno de los anticuerpos de unión a LRP6 quimérica o de ratón descritos anteriormente como el anticuerpo de referencia, este método se puede emplear fácilmente para generar anticuerpos humanos que se unan a LRP6 humana con la misma especificidad de unión y la misma o mejor afinidad de unión. Además, dichos anticuerpos contra LRP6 30 humana también se pueden obtener en el mercado de compañías que habitualmente producen anticuerpos humanos, por ejemplo, KaloBios, Inc. (Mountain View, CA).

Anticuerpos de camélidos

35 Las proteínas de anticuerpos obtenidas de miembros de la familia de los camellos y dromedarios (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), incluyendo los miembros del nuevo mundo, tales como especies de llamas (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*), se han caracterizado con respecto al tamaño, la complejidad estructural y la antigenicidad para sujetos humanos. Determinados anticuerpos IgG de esta familia de mamíferos como se encuentran en la naturaleza 40 carecen de cadenas ligera y, por lo tanto, son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria típica de cuatro cadenas que tiene dos cadenas pesadas y dos ligera, para anticuerpos de otros animales. Véase el documento PCT/EP93/02214 (documento WO 94/04678 publicado el 3 de marzo de 1994).

Una región del anticuerpo de camélido, que es el dominio variable único pequeño identificado como VHH, se puede 45 obtener mediante ingeniería genética para producir una proteína pequeña que tenga una alta afinidad por una diana, dando como resultado una proteína derivada de anticuerpos de bajo peso molecular conocida como "nanocuerpo de camélido". Véase la patente de EE.UU. N.º 5.759.808 emitida el 2 de junio de 1998; véanse también Stijlemans *et al.*, (2004) *J Biol Chem* 279:1256-1261; Dumoulin *et al.*, (2003) *Nature* 424:783-788; Pleschberger *et al.*, (2003) *Bioconjugate Chem* 14:440-448; Cortez-Retamozo *et al.*, (2002) *Int J Cancer* 89:456-62; y Lauwereys *et al.*, (1998) *EMBO J* 17:3512-520. Hay disponibles en el mercado bibliotecas genomodificadas de anticuerpos de camélidos y fragmentos de 50 anticuerpos, por ejemplo, de Ablynx, Ghent, Bélgica. Al igual que con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido se puede alterar de forma recombinante para obtener una secuencia que se parezca más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo se puede "humanizar". Por lo tanto, la baja antigenicidad natural de los anticuerpos de camélidos para seres humanos puede reducirse adicionalmente.

55 El nanocuerpo de camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte del de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de solo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de los nanocuerpos de camélidos para unirse a sitios antigenicos que son funcionalmente invisibles para las proteínas anticuerpos más grandes, es decir, los nanocuerpos de camélidos son útiles como reactivos que detectan antígenos que de otro modo son crípticos, utilizando técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos. Por lo tanto, otra consecuencia más del tamaño pequeño es que un nanocuerpo de camélido puede inhibir 60 como resultado de la unión a un sitio específico en un surco o hendidura estrecha de una proteína diana y, por lo tanto, puede servir en una capacidad que se asemeja más a la función de un fármaco clásico de bajo peso molecular que a la de un anticuerpo clásico.

El bajo peso molecular y el tamaño compacto provocan además que los nanocuerpos de camélido sean extremadamente termoestables, estables a pH extremo y a digestión proteolítica y poco antigenicos. Otra consecuencia es que los nanocuerpos de camélido se mueven fácilmente desde el sistema circulatorio a los tejidos e incluso cruzan la barrera hematoencefálica y pueden tratar trastornos que afectan al tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar 5 adicionalmente el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Véase la solicitud de patente de EE.UU. 20040161738 publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad para los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas pueden expresarse totalmente en células procariotas tales como *E. coli* y se expresan como proteínas de fusión con bacteriófagos y son funcionales.

10 Un anticuerpo o nanocuerpo de camélido puede tener una alta afinidad por LRP6. En determinadas realizaciones del presente documento, el anticuerpo o nanocuerpo de camélido se produce de forma natural en el animal camélido, es decir, es producido por el camélido después de la inmunización con LRP6 o un fragmento peptídico del mismo, utilizando 15 técnicas descritas en el presente documento para otros anticuerpos. Como alternativa, el nanocuerpo de camélido contra LRP6 se genomanipula, es decir, se produce mediante la selección, por ejemplo, de una biblioteca de fagos que presentan proteínas de nanocuerpos de camélidos mutagenizados apropiadamente utilizando procedimientos de selección con LRP6 como diana, como se describe en los ejemplos del presente documento. Los nanocuerpos genomanipulados pueden personalizarse adicionalmente mediante ingeniería genética para que tengan una semivida en un sujeto receptor de 45 minutos a dos semanas. En una realización específica, el anticuerpo o nanocuerpo de camélido se obtiene 20 injertando las secuencias de las CDR de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos en secuencias marco del nanocuerpo o anticuerpo de dominio único, como se describe, por ejemplo, en el documento WO/1994/004678.

Anticuerpos multivalentes

25 Los anticuerpos multivalentes (por ejemplo, anticuerpos biparatópicos, biespecíficos) pueden comprender al menos dos dominios de unión al receptor para dos sitios de unión diferentes en uno o más receptores diana. Pueden proporcionarse beneficios clínicos mediante la unión de dos o más especificidades de unión dentro de un anticuerpo (Morrison *et al.*, (1997) *Nature Biotech.* 15:159-163; Alt *et al.* (1999) *FEBS Letters* 454: 90-94; Zuo *et al.*, (2000) *Protein Engineering* 13:361-367; Lu *et al.*, (2004) *JBC* 279:2856-2865; Lu *et al.*, (2005) *JBC* 280:19665-19672; Marvin *et al.*, (2005) *Acta Pharmacologica Sinica* 26:649-658; Marvin *et al.*, (2006) *Curr Opin Drug Disc Develop* 9:184-193; Shen *et al.*, (2007) *J 30 Immun Methods* 218:65-74; Wu *et al.*, (2007) *Nat Biotechnol.* 11: 1290-1297; Dimasi *et al.*, (2009) *J. Mol Biol.* 393:672-692; y Michaelson *et al.*, (2009) *mAbs* 1:128-141.

35 La presente invención se basa en el descubrimiento de que los anticuerpos multivalentes (por ejemplo, un único anticuerpo biparatópico o biespecífico contra LRP6) tienen la capacidad de inhibir la señalización mediada por ligando tanto del propulsor 1 (por ejemplo, Wnt1) como del propulsor 3 (por ejemplo, Wnt3). Además, e inesperadamente, los anticuerpos multivalentes (por ejemplo, un único anticuerpo biparatópico o biespecífico contra LRP6) no muestran una potenciación significativa de una señal de Wnt. Los anticuerpos multivalentes se unen a distintas regiones de propulsor β de LRP6. Los anticuerpos contra Propulsor 1 se unen al dominio propulsor β 1 y bloquean Wnt dependientes de propulsor1 tales como 40 Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt9, Wnt10A, Wnt10B e inhiben una vía de transducción de señales de Wnt 1. Los anticuerpos contra Propulsor 3 se unen al dominio propulsor β 3 y bloquean las Wnt dependientes de Propulsor3, tales como Wnt3a y Wnt3, e inhiben una vía de transducción de señales de Wnt3. Los anticuerpos contra LRP6 diferencian los ligandos de propulsor 1 y propulsor 3 en dos clases separadas y se unen a distintos epítopos del receptor diana LRP6. La conversión de fragmentos de los anticuerpos contra LRP6 (por ejemplo, Fab) en anticuerpos IgG de longitud completa 45 da como resultado un anticuerpo que potencia (mejora) una señal de Wnt en presencia de otra proteína, tal como un ligando Wnt 1 o Wnt 3.

50 Los anticuerpos multivalentes proporcionan ventajas sobre los anticuerpos tradicionales, por ejemplo, amplían el repertorio de dianas, teniendo nuevas especificidades de unión, potencia aumentada y ninguna potenciación de señal. Un único anticuerpo multivalente contra LRP6 se puede unir a múltiples regiones de propulsor en un único receptor diana LRP6 en la misma célula e inhibir la señalización de Wnt. Un anticuerpo multivalente se puede unir a cualquier combinación de regiones de propulsor β seleccionadas del grupo que consiste en propulsor 1, propulsor 2, propulsor 3 y propulsor 4. Un anticuerpo multivalente se puede unir a los dominios propulsor 1 y propulsor 3 de LRP6. Por lo tanto, un único anticuerpo multivalente contra LRP6 tiene una potencia de acción aumentada mediante la unión a múltiples regiones de propulsor β y la inhibición de la señalización de Wnt mediada por cada dominio. Por ejemplo, un único anticuerpo 55 multivalente contra LRP6 inhibe la señalización de Wnt mediada tanto por el propulsor 1 como el propulsor 3 mediante la unión a los dominios propulsor 1 y propulsor 3, respectivamente. La potencia de acción aumentada se puede deber a una avidez aumentada o a una unión mejor del anticuerpo multivalente contra LRP6.

60 En una realización, los anticuerpos se producen uniendo un scFv a un anticuerpo IgG. Los dominios VH y VL utilizados para fabricar un scFv pueden derivar del mismo o de diferentes anticuerpos. El scFv comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR.

65 La región Fc del anticuerpo IgG y el fragmento scFv se pueden unir entre sí en muchas orientaciones diferentes. En una realización, el scFv está unido al extremo C de la región Fc. En otras realizaciones, el scFv está unido al extremo N de la región Fc. En otras realizaciones, los scFv están unidos tanto al extremo N como al extremo C de la región Fc. En otra

realización, el scFv se puede unir a una cadena ligera de un anticuerpo. Los anticuerpos multivalentes se pueden unir a múltiples sitios de unión de un receptor diana simultáneamente. Los dominios de unión al receptor de anticuerpos multivalentes se pueden unir al menos a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más sitios de unión. Cada dominio de unión al receptor puede ser específico para el mismo sitio de unión. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender uno o más dominios de unión al receptor que son específicos para distintos epítopos en el mismo receptor diana, por ejemplo, el dominio propulsor β 1 o el dominio propulsor β 3 de LRP6. Como alternativa, los anticuerpos multivalentes pueden comprender uno o más dominios de unión al receptor que son específicos para epítopos en diferentes receptores diana, por ejemplo, LRP6 y un receptor que no es LRP6, tal como los receptores Erb, cmet, IGFR1, Smoothened y Notch.

5 10 Cada dominio de unión al receptor dentro de los anticuerpos multivalentes también puede tener una afinidad diferente (es decir, mayor o menor) por el antígeno en comparación con los anticuerpos tradicionales.

En la invención, los anticuerpos multivalentes son anticuerpos biparatópicos que comprenden dos fracciones de unión a antígeno, en donde la primera fracción de unión a antígeno se une al dominio propulsor 1 de LRP6 y la segunda fracción de unión a antígeno se une al dominio propulsor 3 de LRP6, en donde dicho anticuerpo biparatópico inhibe la señalización de LRP6 mediada tanto por propulsor 1 como por propulsor 3 y no potencia la señalización de Wnt1 y Wnt3, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que expresa LRP6.

15 20 Los anticuerpos multivalentes pueden comprender al menos una CDR de un anticuerpo, al menos dos CDR de un anticuerpo dado, o al menos tres CDR de un anticuerpo dado, al menos cuatro CDR de un anticuerpo dado, al menos cinco CDR de un anticuerpo dado, o al menos seis CDR de un anticuerpo dado. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender al menos un dominio VH de un anticuerpo, al menos un dominio VL de un anticuerpo dado o al menos un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo. Las moléculas de ScFv se pueden construir en una orientación VH-enlazador-VL o en una orientación VL-enlazador-VH.

25 30 35 En algunas realizaciones, la estabilidad de las moléculas de scFv o de las proteínas de fusión que las comprenden se puede evaluar con referencia a las propiedades biofísicas (por ejemplo, estabilidad térmica) de una molécula de scFv de control convencional o un anticuerpo de longitud completa. En una realización, los anticuerpos tienen una estabilidad térmica que es superior a aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,75, aproximadamente 1, aproximadamente 1,25, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,75, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10 grados, aproximadamente 11 grados, aproximadamente 12 grados, aproximadamente 13 grados, aproximadamente 14 grados o aproximadamente 15 grados Celsius que una molécula de unión de control (por ejemplo, una molécula de scFv convencional).

40 45 Las moléculas de scFv comprenden un enlazador de scFv con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizada. En algunas realizaciones, los enlazadores de scFv preferidos mejoran la estabilidad térmica en al menos aproximadamente 2 °C o 3 °C en comparación con un anticuerpo convencional. En una realización, el anticuerpo tiene una estabilidad térmica mejorada en 1 °C en comparación con un anticuerpo convencional. En otra realización, el anticuerpo tiene una estabilidad térmica mejorada de 2 °C en comparación con un anticuerpo convencional. En otra realización, el anticuerpo tiene una estabilidad térmica mejorada a 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 °C en comparación con un anticuerpo convencional. En algunas realizaciones, se pueden hacer comparaciones, por ejemplo, entre las moléculas de scFv y las moléculas de scFv fabricadas utilizando métodos de la técnica anterior o entre las moléculas de scFv y los fragmentos Fab de un anticuerpo del que derivaron los VH y VL de scFv. La estabilidad térmica se puede medir utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, se puede medir la Tm. Más adelante se describen en más detalle métodos para medir la Tm y otros métodos para determinar la estabilidad proteica.

50 55 60 En una realización, el enlazador de scFv consiste en la secuencia de aminoácidos (Gly₄Ser)₃ o comprende una secuencia (Gly₄Ser)₄. Otros enlazadores ilustrativos comprenden o consisten en secuencias ((Gly₄Ser)₅ y (Gly₄Ser)₆). En algunas realizaciones, los enlazadores de scFv pueden tener longitudes variables. En una realización, un enlazador de scFv tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos. En otra realización, un enlazador de scFv tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 aminoácidos. En otra realización, un enlazador de scFv tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. En otra realización, un enlazador de scFv tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 aminoácidos. La variación en la longitud del enlazador puede conservar o mejorar la actividad, dando lugar a una eficacia superior en los estudios de actividad. Los enlazadores de scFv se pueden introducir en secuencias polipeptídicas utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar mutagénesis por PCR. Las modificaciones se pueden confirmar mediante análisis de secuencia de ADN. Se puede usar ADN plasmídico para transformar células hospedadoras para la producción estable de los polipéptidos producidos.

65 En una realización, una molécula de scFv comprende un enlazador de scFv que tiene la secuencia de aminoácidos de (Gly₄Ser)₃ o (Gly₄Ser)₄ interpuesta entre un dominio VH y un dominio VL, en donde los dominios VH y VL están unidos por un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, las moléculas de scFv pueden comprender además al menos un enlace disulfuro que une un aminoácido en el dominio VL con un aminoácido en el dominio VH. Son necesarios restos de cisteína para proporcionar enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, los enlaces disulfuro se pueden incluir en una molécula de scFv, por ejemplo, para conectar FR4 de VL y FR2 de VH o para conectar FR2 de VL y FR4 de VH. Las posiciones ilustrativas para el enlace disulfuro incluyen: 43, 44, 45, 46, 47, 103, 104, 105 y 106 de VH, y 42, 43, 44, 45, 46, 98, 99, 100 y 101 de VL, numeración de Kabat. Las modificaciones de los genes que codifican los dominios VH y VL se pueden lograr utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio.

5 Las mutaciones en scFv alteran la estabilidad del scFv y mejoran la estabilidad global del anticuerpo multivalente que comprende el scFv mutado en comparación con un anticuerpo multivalente sin el scFv mutado. Las mutaciones del scFv se pueden generar como se muestra en los Ejemplos. La estabilidad del scFv mutado se compara con la del scFv sin mutar utilizando mediciones tales como Tm, temperatura de desnaturalización y temperatura de agregación como se describe en los Ejemplos. La capacidad de unión de los scFv mutantes se puede determinar utilizando ensayos tales como ELISA.

10 15 En una realización, el anticuerpo comprende al menos una mutación en un scFv de modo que el scFv mutado confiere una estabilidad mejorada al anticuerpo multivalente. En otra realización, el anticuerpo comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones en un scFv de modo que el scFv mutado confiere una estabilidad mejorada al anticuerpo multivalente. En otra realización, el anticuerpo comprende una combinación de mutaciones en un scFv de modo que el scFv mutado confiere una estabilidad mejorada al anticuerpo multivalente.

20 25 En el presente documento se describen anticuerpos multivalentes, tales como anticuerpos biparatópicos para su uso de acuerdo con la invención. Estos anticuerpos biparatópicos se unen a uno o más epítopos de LRP6. Los ScFv se unen a una región Fc, por ejemplo, en la región bisagra, utilizando enlazadores tales como enlazadores de GlySer. En una realización, el fragmento de unión al anticuerpo o antígeno que se une al dominio propulsor β 1 de LRP6 unido a un scFv que se une al dominio propulsor β 3 de LRP6 utilizando un enlazador de (GlyGlySer)₂ alineado con la región CH3 del Fc. En una realización, se usa un anticuerpo IgG de longitud completa que se une al dominio propulsor β 1 de LRP6 para unir un fragmento de scFv de un anticuerpo que se une al dominio propulsor β 3 de LRP6.

30 35 Se pueden construir anticuerpos multivalentes, tales como anticuerpos biparatópicos para su uso de acuerdo con la invención, utilizando cualquier combinación de secuencias de cadenas pesada y ligera que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Construcciones biparatópicas para su uso de acuerdo con la invención

Construcción	Cadena pesada SEQ ID NO:	Cadena ligera SEQ ID NO:
BiPa	166, 171, 173, 175, 195, 201, y 207	170, 193, 199, y 205
Propulsor 1		
scFv de IgG/Propulsor 3 unido a Fc		
BiPa alternativa	177	181
Propulsor 1		
scFv de IgG/Propulsor 3 unido a cadena ligera		
BiPa inversa	187, y 189	185
Propulsor 3		
scFv de IgG/Propulsor 1 unido a Fc		

35 40 En algunas realizaciones, los anticuerpos biparatópicos se construyen utilizando un anticuerpo IgG contra Propulsor 1 y un scFv de Propulsor 3. En una realización, el anticuerpo biparatópico se construye utilizando cualquier secuencia de cadenas pesadas seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 166, 171, 173, 175, 195, 201 y 207; y cualquier secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 170, 193, 199 y 205. En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende secuencias de cadenas pesada y ligera seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 166/170, 171/170, 173/170, 175/170, 201/199, 207/205 y 195/193.

45 En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende la cadena pesada SEQ ID NO: 166 y la cadena ligera SEQ ID NO: 170. En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende la cadena pesada SEQ ID NO: 171 y la cadena ligera SEQ ID NO: 170. En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende la cadena pesada SEQ ID NO: 173 y la cadena ligera SEQ ID NO: 170. En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende la cadena pesada SEQ ID NO: 175 y la cadena ligera SEQ ID NO: 170. En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende la cadena pesada SEQ ID NO: 201 y la cadena ligera SEQ ID NO: 199. En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende la cadena pesada SEQ

ID NO: 207 y la cadena ligera SEQ ID NO: 205. En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende la cadena pesada SEQ ID NO: 195 y la cadena ligera SEQ ID NO: 193.

5 En otra realización, el anticuerpo biparatópico es un "anticuerpo biparatópico alternativo" por el que el scFv se une a la cadena ligera de IgG. En una realización, el anticuerpo biparatópico comprende la cadena pesada SEQ ID NO: 177 y la cadena ligera SEQ ID NO: 181.

10 En otra realización, se usa un anticuerpo IgG de longitud completa que se une al dominio propulsor β 3 de LPR6 para unir un fragmento de scFv de un anticuerpo que se une al dominio propulsor β 1 de LRP6, denominado "biparatópico inverso".

15 En una realización, los anticuerpos biparatópicos inversos para su uso de acuerdo con la invención se construyen utilizando un anticuerpo IgG contra Propulsor 3 y un scFv de Propulsor 1. En una realización, un anticuerpo biparatópico inverso se construye utilizando cualquier secuencia de cadenas pesadas seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 187 y 189; y una secuencia de cadena ligera SEQ ID NO: 185. En una realización, el anticuerpo biparatópico inverso comprende la pesada SEQ ID NO: 187 y la cadena ligera SEQ ID NO: 185. En una realización, el anticuerpo biparatópico inverso comprende la cadena pesada SEQ ID NO: 189 y la cadena ligera SEQ ID NO: 185.

20 En algunas realizaciones, los anticuerpos biparatópicos tienen una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 1, 21 y 47, secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 2, 22 y 48, secuencias de CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 3, 23 y 49, respectivamente; una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 4, 24 y 50, secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 5, 25 y 51, secuencias de CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 6, 26 y 52; combinadas con una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 69, 93 y 115, secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 70, 94 y 116, secuencias de CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 71, 95 y 117, respectivamente; una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 72, 96 y 118, secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 73, 97 y 119, secuencias de CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en 74, 98 y 120; el anticuerpo se une a LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero) e inhibe la actividad biológica de LRP6 que se puede medir en un ensayo de gen indicador de Wnt o cualquier otra medida de señalización dirigida por Wnt (por ejemplo, fosforilación de LRP6, estabilización de catenina β y translocación nuclear, proliferación/supervivencia celular) como se describe en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos, murinos, químéricos y humanizados.

40 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se preparan conjugando los dominios de unión al receptor constituyentes, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada dominio de unión al receptor del anticuerpo multivalente se puede generar por separado y después se puede conjugar entre sí. Cuando los dominios de unión al receptor son proteínas o péptidos, se puede usar una diversidad de agentes de acoplamiento o de entrecruzamiento para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky *et al.*, (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* N.º 78:118-132; Brennan *et al.*, (1985) *Science* 229:81-83) y Glennie *et al.*, (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

50 Cuando los dominios de unión al receptor son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlaces sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particular, la región bisagra se modifica para que contenga un número impar de restos de sulfhidrilo, por ejemplo uno, antes de la conjugación.

55 Como alternativa, los dominios de unión al receptor pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil cuando el anticuerpo multivalente es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Número 5.260.203; Patente de EE.UU. Número 5.455.030; Patente de EE.UU. Número 4.881.175; Patente de EE.UU. Número 5.132.405; Patente de EE.UU. Número 5.091.513; Patente de EE.UU. Número 5.476.786; Patente de EE.UU. Número 5.013.653; Patente de EE.UU. Número 5.258.498; y Patente de EE.UU. Número 5.482.858.

60 La unión de los anticuerpos multivalentes a sus dianas se puede confirmar, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis por FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos en general detecta la presencia

de complejos de proteína-anticuerpo de interés especial empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

5 Los anticuerpos multivalentes pueden comprender al menos dos dominios de unión al receptor diferentes que se unen a LRP6. Los dominios de unión al receptor se pueden unir entre sí a través de fusión de proteínas o unión covalente o no covalente. Se pueden obtener anticuerpos tetravalentes, por ejemplo, entrecruzando un anticuerpo con otro anticuerpo que se une a las regiones constantes del primer anticuerpo, por ejemplo, la región Fc o bisagra.

Orientación de anticuerpos multivalentes

10 Los anticuerpos multivalentes pueden tener múltiples dominios de unión al receptor ("RBD"), que incluyen, por ejemplo, regiones variables de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab), scFvs, diacuerpos monocatenarios o anticuerpos IgG. Son ejemplos de RBD los componentes de un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Los RBD también son componentes de anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, unicuerpos, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) *Nature Biotechnology* 23: 20 1126-1136.

En algunas realizaciones, los anticuerpos se generan en cualquier orientación utilizando al menos un dominio de unión al receptor (por ejemplo, un scFv, un diacuerpo monocatenario, una región variable de anticuerpo) siempre que los anticuerpos multivalentes resultantes conserven la actividad funcional (por ejemplo, inhibiendo la señalización de Wnt).

25 25 Se debe entender que se puede añadir cualquier número de dominios de unión al receptor al extremo C y/o al extremo N del Fc siempre que los anticuerpos multivalentes resultantes conserven la actividad funcional (por ejemplo, inhibiendo la señalización de Wnt). En una realización, se unen uno, dos, tres o más dominios de unión al receptor al extremo C de la región Fc. En otras realizaciones, se unen uno, dos, tres o más dominios de unión al receptor al extremo N de la región Fc. En otras realizaciones, se unen uno, dos, tres o más dominios de unión al receptor al extremo N y el extremo C de la 30 30 región Fc. En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden más de un dominio de unión al receptor del mismo tipo unido al extremo C y/o al extremo N de una región Fc, por ejemplo, scFv-scFv-Fc-IgG. En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden más de un dominio de unión al receptor de un tipo diferente unido al extremo C y/o al extremo N de la región Fc, por ejemplo, scFv-diacuerpo-Fc-IgG. En otra realización, se unen uno, dos, tres o más dominios de unión al receptor (por ejemplo, scFv) al extremo C de una IgG. En otra realización, se unen uno, dos, tres o más dominios 35 35 de unión al receptor (por ejemplo, scFv) al extremo N de una IgG. En otra realización, se unen uno, dos, tres o más dominios de unión al receptor (por ejemplo, scFv) al extremo N y al extremo C de una IgG.

40 En otras realizaciones, los anticuerpos se generan utilizando más de un dominio de unión al receptor de un tipo diferente unido al extremo C, por ejemplo, scFv-diacuerpo-Fc-IgG; diacuerpo-scFv-Fc-IgG; scFv-scFv-diacuerpo-Fc-IgG; scFv-diacuerpo-scFv-Fc-IgG; diacuerpo-scFv-scFv-Fc-IgG; región variable de anticuerpo-scFv-diacuerpo-Fc-IgG; y similares. Se pueden generar anticuerpos multivalentes con cualquier número de permutaciones de dominios de unión al receptor. La funcionalidad de estos anticuerpos multivalentes se puede probar utilizando los métodos y ensayos descritos en el presente documento.

45 45 En otras realizaciones, los anticuerpos se generan utilizando más de un dominio de unión al receptor de un tipo diferente unido al extremo N, por ejemplo, IgG-Fc-scFv-diacuerpo; IgG-Fc-diacuerpo-scFv; IgG-Fc-scFv-scFv-diacuerpo; IgG-Fc-scFv-diacuerpo-scFv; IgG-Fc-diacuerpo-scFv-scFv; IgG-Fc-región variable de anticuerpo-scFv-diacuerpo; y similares.

50 50 En otras realizaciones más, se generan anticuerpos utilizando un único dominio de unión al receptor (por ejemplo, un scFv, un diacuerpo monocatenario, una región variable de anticuerpo) unido al extremo C y al extremo N de la región Fc. En otra realización, se unen múltiples dominios de unión al receptor al extremo N de la región Fc, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más dominios de unión al receptor unidos al extremo C y al extremo N de la región Fc. Por ejemplo, los anticuerpos multivalentes pueden comprender uno o más scFv unidos al extremo C y al extremo N de la región Fc, por ejemplo, scFv-Fc-scFv-scFv; -scFv-scFv-Fc-scFv-scFv y similares. En otras realizaciones, los anticuerpos se generan 55 55 utilizando más de un dominio de unión al receptor de un tipo diferente unido al extremo N, por ejemplo, scFv-Fc-scFv-diacuerpo; scFv-Fc-diacuerpo-scFv; scFv-Fc-scFv-scFv-diacuerpo; scFv-Fc-scFv-diacuerpo-scFv; scFv-Fc-región variable de anticuerpo-scFv-diacuerpo; y similares. Se pueden generar anticuerpos multivalentes con cualquier número de permutaciones de dominios de unión al receptor. La funcionalidad de estos anticuerpos multivalentes se puede probar utilizando los métodos y ensayos descritos en el presente documento.

Longitud del enlazador

60 Se sabe que la longitud del enlazador puede afectar en gran medida a cómo se pliegan e interactúan las regiones variables de un scFv. De hecho, si se emplea un enlazador corto (por ejemplo, entre 5-10 aminoácidos; entre 5-20 aminoácidos), 65 65 se evita el plegamiento intracatenario y se requiere el plegamiento intercatenario para unir las dos regiones variables y

formar un sitio de unión al epítopo funcional. Para consultar ejemplos de orientación y tamaño del enlazador, véase, por ejemplo, Hollinger *et al.* 1993 *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448, Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, y Publicaciones PCT N.º WO2006/020258 y WO2007/024715.

5 También se entiende que los dominios de unión al receptor pueden estar separados por regiones enlazadoras de diversas longitudes. Los dominios de unión al receptor se pueden separar entre sí, Ckappa/lambda, CH1, Bisagra, CH2, CH3 o la región Fc completa mediante una secuencia enlazadora. Dicha secuencia enlazadora puede comprender una variedad aleatoria de aminoácidos o un conjunto restringido de aminoácidos. Dicha secuencia enlazadora puede ser flexible o rígida.

10 En algunas realizaciones, los anticuerpos multivalentes comprenden una secuencia enlazadora de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 o más restos de aminoácidos entre uno o más de sus dominios de unión al receptor, dominios Ckappa/lambda, dominios CH1, región Bisagra, dominios CH2, dominios CH3 o regiones Fc. La secuencia enlazadora puede estar compuesta por cualquier aminoácido natural. En algunas realizaciones, los aminoácidos glicina y serina comprenden los aminoácidos dentro de la secuencia enlazadora. En otra realización, la orientación de la región enlazadora comprende conjuntos de repeticiones de glicina (Gly_nSer)_n, donde n es un número entero positivo igual o superior a 1.

En una realización, los enlazadores incluyen, pero sin limitación, (Gly₄ Ser)₄ o (Gly₄ Ser)₃. En otra realización, los restos de Glu y Lys de los enlazadores se pueden intercalar dentro de los enlazadores de Gly-Ser para una mejor solubilidad.

20 En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly₂Ser), (GlySer) o (Gly₃Ser). En otra realización, los enlazadores incluyen combinaciones y múltiplos de (Gly₃Ser)+(Gly₄Ser)+(GlySer). En otra realización, Ser puede reemplazarse por Ala, por ejemplo, (Gly₄Ala) o (Gly₃Ala). En otra realización más, el enlazador comprende el motivo (GluAlaAlaAlaLys)_n, donde n es un número entero positivo igual o superior a 1.

25 Región bisagra

En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden la totalidad o al menos una parte de una región bisagra del anticuerpo. La región bisagra o parte de la misma se puede conectar directamente a un dominio de unión al receptor, un CH1, un Ckappa/lambda, un CH2 o un CH3. En una realización, la región bisagra, o parte de la misma, se puede conectar a través de una región enlazadora de longitud variable a un dominio de unión al receptor, un CH1, un Ckappa/lambda, un CH2 o un CH3.

30 En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más regiones bisagra o partes de las mismas. Las regiones bisagra o partes de las mismas pueden ser idénticas o diferentes. En una realización, los anticuerpos comprenden una región bisagra o una parte de la misma de una molécula de IgG1 humana. En realizaciones adicionales, la región Bisagra o parte de la misma se puede genomanipular para eliminar un resto de cisteína de origen natural, introducir un resto de cisteína de origen no natural o sustituir un resto de cisteína de origen no natural por un resto de origen natural. En algunas realizaciones, los anticuerpos contienen al menos una región bisagra o una parte de la misma que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos que comprende: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 211) o EPKSC (SEQ ID NO: 212). En algunas realizaciones, al menos una región Bisagra o parte de la misma se genomanipula para sustituir al menos un resto de cisteína de origen natural con otro resto de aminoácido. En algunas realizaciones, al menos un resto de cisteína natural se sustituye por serina.

35 En algunas realizaciones, los restos de cisteína de origen no natural útiles para la conjugación específica de sitio se pueden genomanipular en los anticuerpos. Dichos enfoques, composiciones y métodos se ejemplifican en la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. con N.º de serie 61/022.073 presentada el 18 de enero de 2008, titulada "Cysteine Engineered Antibodies for Site-Specific Conjugation" (Publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20110033378) y Publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20070092940, presentada el 22 de septiembre de 2005.

40 50 Métodos de evaluación de la estabilidad de las proteínas

Para evaluar la estabilidad de los anticuerpos multivalentes, se predice la estabilidad del dominio menos estable de una proteína multidominio utilizando los métodos que se describen a continuación.

45 55 Dichos métodos permiten la determinación de múltiples transiciones de desdoblamiento térmico donde el dominio menos estable se despliega en primer lugar o limita el umbral de estabilidad global de una unidad de múltiples dominios que se despliega cooperativamente (es decir, una proteína de múltiples dominios que muestra una única transición de desdoblamiento). El dominio menos estable se puede identificar de varias maneras adicionales. Se puede realizar mutagénesis para estudiar qué dominio limita la estabilidad global. Adicionalmente, la resistencia a la proteasa de una proteína multidominio se puede realizar en condiciones en las que se sabe que el dominio menos estable está intrínsecamente desplegado a través de DSC u otros métodos espectroscópicos (Fontana, *et al.*, (1997) *Fold. Des.*, 2: R17-26; Dimasi *et al.* (2009) *J. Mol. Biol.* 393: 672-692). Una vez que se identifica el dominio menos estable, la secuencia que codifica este dominio (o una parte del mismo) se puede emplear como secuencia de prueba en los métodos descritos.

60 65 a) Estabilidad Térmica

La estabilidad térmica de las composiciones se puede analizar utilizando una serie de técnicas biofísicas o bioquímicas no limitantes conocidas en la técnica. En determinadas realizaciones, la estabilidad térmica se evalúa mediante espectroscopia analítica.

5 Un método ilustrativo de espectroscopia analítica es la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). La DSC emplea un calorímetro que es sensible a las absorbancias de calor que acompañan el despliegamiento de la mayoría de las proteínas o dominios de proteínas (véase, por ejemplo, Sanchez-Ruiz, *et al.*, *Biochemistry*, 27: 1648-52, 1988). Para determinar la estabilidad térmica de una proteína, se inserta una muestra de la proteína en el calorímetro y 10 se eleva la temperatura hasta que se despliega el Fab o scFv. La temperatura a la que se despliega la proteína es indicativa de la estabilidad global de la proteína.

Otro método ilustrativo de espectroscopia analítica es la espectroscopia de dicroísmo circular (DC). La espectrometría de 15 DC mide la actividad óptica de una composición en función de una temperatura creciente. La espectroscopia de dicroísmo circular (DC) mide las diferencias en la absorción de la luz polarizada a la izquierda frente a la luz polarizada a la derecha que surgen debido a la asimetría estructural. Una estructura desordenada o despliegada da lugar a un espectro de DC muy diferente al de una estructura ordenada o plegada. El espectro de DC refleja la sensibilidad de las proteínas a los efectos desnaturalizantes de la temperatura creciente y, por lo tanto, es indicativo de la estabilidad térmica de una proteína (véase van Mierlo y Steemsma, *J. Biotechnol.*, 79 (3): 281-98, 2000).

20 Otro método ilustrativo de espectroscopia analítica para medir la estabilidad térmica es la espectroscopia de emisión de fluorescencia (véase van Mierlo y Steemsma, citado anteriormente). Otro método ilustrativo más de espectroscopia analítica para medir la estabilidad térmica es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) (véase, por ejemplo, van Mierlo y Steemsma, citado anteriormente).

25 La estabilidad térmica de una composición se puede medir por medios bioquímicos. Un método bioquímico ilustrativo para evaluar la estabilidad térmica es un ensayo de exposición térmica. En un "ensayo de exposición térmica", se somete una composición a un intervalo de temperaturas elevadas durante un período de tiempo establecido. Por ejemplo, en una realización, las moléculas de scFv de prueba o las moléculas que comprenden moléculas de scFv se someten a un intervalo de temperaturas crecientes, por ejemplo, durante 1-1,5 horas. La actividad de la proteína se somete a ensayo a 30 continuación con un ensayo bioquímico relevante. Por ejemplo, si la proteína es una proteína de unión (por ejemplo, un scFv o un polipéptido que contiene scFv), la actividad de unión de la proteína de unión se puede determinar mediante un ELISA funcional o cuantitativo.

35 Un ensayo de este tipo se puede realizar en un formato de alto rendimiento y en aquellos divulgados en los Ejemplos utilizando *E. coli* y cribado de alto rendimiento. Se puede crear una biblioteca de variantes de scFv utilizando métodos conocidos en la técnica. Se puede introducir expresión de scFv y los scFv se pueden someter a exposición térmica. Las muestras de prueba desafiadas se pueden someter a ensayo para determinar la unión y aquellos scFv que son estables se pueden aumentar a escala y caracterizar adicionalmente.

40 La estabilidad térmica se evalúa midiendo la temperatura de fusión (Tm) de una composición utilizando cualquiera de las técnicas anteriores (por ejemplo, técnicas de espectroscopia analítica). La temperatura de fusión es la temperatura en el punto medio de una curva de transición térmica en donde el 50 % de las moléculas de una composición están en estado plegado (véase, por ejemplo, Dimasi *et al.* (2009) *J. Mol Biol.* 393: 672-692). En una realización, los valores de Tm para 45 un scFv son de aproximadamente 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C, 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C. En una realización, los valores de Tm para una IgG son de aproximadamente 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C, 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C. En una realización, los valores de Tm para un anticuerpo multivalente son de aproximadamente 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C, 50 °C, 51 °C, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, 75 °C, 76 °C, 77 °C, 78 °C, 79 °C, 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C. 55 La estabilidad térmica también se evalúa midiendo el calor específico o la capacidad calorífica (Cp) de una composición utilizando una técnica calorimétrica analítica (por ejemplo, DSC). El calor específico de una composición es la energía (por ejemplo, en kcal/mol) necesaria para elevar en 1 °C la temperatura de 1 mol de agua. Ya que una Cp grande es un rasgo característico de una composición proteica desnaturalizada o inactiva. El cambio en la capacidad calorífica (Δ Cp) de una composición se mide determinando el calor específico de una composición antes y después de su transición térmica. La estabilidad térmica también se puede evaluar midiendo o determinando otros parámetros de estabilidad

termodinámica, incluida la energía libre de Gibbs de despliegamiento (ΔG), la entalpía de despliegamiento (ΔH) o la entropía de despliegamiento (ΔS).

5 Uno o más de los ensayos bioquímicos anteriores (por ejemplo, un ensayo de exposición térmica) se usa para determinar la temperatura (es decir, el valor de T_c) en el que el 50 % de la composición conserva su actividad (por ejemplo, actividad de unión).

10 Además, las mutaciones en el scFv alteran la estabilidad térmica del scFv en comparación con el scFv sin mutar. Cuando el scFv mutado se incorpora a un anticuerpo multivalente, el scFv mutado confiere estabilidad térmica al anticuerpo multivalente global. En una realización, el scFv comprende una única mutación que confiere estabilidad térmica al scFv. En otra realización, el scFv comprende múltiples mutaciones que confieren estabilidad térmica al scFv. En una realización, las mutaciones múltiples en el scFv tienen un efecto aditivo sobre la estabilidad térmica del scFv.

15 **b) % de agregación**

La estabilidad de una composición se puede determinar midiendo su propensión a agregarse. La agregación se puede medir mediante varias técnicas bioquímicas o biofísicas no limitantes. Por ejemplo, la agregación de una composición se puede evaluar mediante cromatografía, por ejemplo, Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La SEC separa moléculas en función del tamaño. Una columna se llena con perlas semisólidas de un gel polimérico que admitirá iones y 20 moléculas pequeñas en su interior, pero no grandes. Cuando se aplica una composición proteica en la parte superior de la columna, las proteínas plegadas compactas (es decir, las proteínas no agregadas) se distribuyen a través de un volumen mayor de disolvente que el que está disponible para los agregados de proteínas grandes. Por consiguiente, los agregados grandes se mueven con mayor rapidez a través de la columna, y de esta manera la mezcla se puede separar o fraccionar en sus componentes. Cada una de las fracciones se puede cuantificar por separado (por ejemplo, mediante 25 dispersión de la luz) a medida que se eluye del gel. En consecuencia, el % de agregación de una composición se puede determinar comparando la concentración de una fracción con la concentración total de proteína aplicada al gel. Las composiciones estables eluyen de la columna como esencialmente una fracción única y aparecen esencialmente como un pico único en el perfil de elución o cromatograma.

30 **c) Afinidad de unión**

La estabilidad de una composición se puede evaluar determinando su afinidad de unión por la diana. En la técnica se conocen una amplia diversidad de métodos para determinar la afinidad de unión. Un método ilustrativo para determinar la afinidad de unión emplea resonancia de plasmones superficiales. La resonancia por plasmones superficiales es un 35 fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo, utilizando el sistema BIACore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para consultar descripciones adicionales, véase Jonsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., *i* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; y Johnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

40 Anticuerpos con semivida prolongada

En algunas realizaciones, los anticuerpos tienen una semivida prolongada *in vivo*. Muchos factores pueden afectar a la semivida de una proteína *in vivo*. Por ejemplo, la filtración renal, el metabolismo en el hígado, la degradación por enzimas 45 proteolíticas (proteasas) y las respuestas inmunógenas (por ejemplo, neutralización de proteínas por anticuerpos y captación por macrófagos y células dendríticas). Se puede usar una diversidad de estrategias para prolongar la semivida de los anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, mediante enlace químico con polietilenglicol (PEG), reCODE PEG, armazón de anticuerpos, ácido polisiálico (PSA), hidroxietilalmidón (HES), ligandos 50 de unión a albúmina y protectores de carbohidratos; por fusión genética a proteínas que se unen a proteínas del suero, tales como albúmina, IgG, FcRn y transferrina; mediante acoplamiento (genética o químicamente) a otras fracciones de unión que se unen a proteínas del suero, tales como nanocuerpos, Fab, DARPin, avímeros, aficuerpos y anticalinas; por fusión genética con rPEG, albúmina, dominio de albúmina, proteínas de unión a albúmina y Fc; o por incorporación en nanoportadores, formulaciones de liberación lenta o dispositivos médicos.

55 Para prolongar la circulación sérica de anticuerpos *in vivo*, se pueden fijar moléculas poliméricas inertes, tales como PEG de alto peso molecular a los anticuerpos o un fragmento de los mismos con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C de los anticuerpos o mediante grupos épsilon-amino presentes en los restos de lisina. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado aldehído de PEG, en condiciones en las 60 que uno o más grupos de PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede realizar mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono alcoxi o ariloxi (C1-C10)-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglucosilado. Se usará derivatización de polímero lineal o ramificado que provoque pérdida mínima de actividad biológica.

El grado de conjugación se puede controlar estrechamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la conjugación adecuada de moléculas de PEG con los anticuerpos. El PEG que no ha reaccionado puede separarse de los conjugados de anticuerpo-PEG por cromatografía de exclusión de tamaño o de intercambio iónico. Pueden someterse a ensayo anticuerpos derivatizados con PEG para determinar la actividad de unión así como la eficacia *in vivo* utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante inmunoensayos descritos en el presente documento. Se conocen en la técnica métodos para pegilar proteínas y se pueden aplicar a los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura *et al.* y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa *et al.*

5 Otras tecnologías de pegilación modificadas incluyen la reconstitución de la tecnología de ingeniería dirigida químicamente ortogonal (ReCODE PEG), que incorpora cadenas laterales químicamente especificadas en proteínas biosintéticas a través de un sistema reconstituido que incluye ARNt sintetasa y ARNt. Esta tecnología permite la incorporación de más de 30 aminoácidos nuevos en proteínas biosintéticas en *E. coli*, levaduras y células de mamífero. El ARNt incorpora un aminoácido no nativo en cualquier lugar en donde se ubica un codón ámbar, convirtiendo el codón ámbar de uno de parada en uno que señala la incorporación del aminoácido químicamente especificado.

10 También se puede usar tecnología de pegilación recombinante (rPEG) para prolongar la semivida en suero. Esta tecnología implica fusionar genéticamente una cola de proteína no estructurada de 300-600 aminoácidos a una proteína farmacéutica existente. Debido a que el peso molecular aparente de una cadena de proteína no estructurada de este tipo es aproximadamente 15 veces más grande que su peso molecular real, la semivida en suero de la proteína aumenta en gran medida. A diferencia de la PEGilación tradicional, que requiere conjugación química y repurificación, el proceso de fabricación se simplifica en gran medida y el producto es homogéneo.

15 La polisialización es otra tecnología, que usa el polímero natural ácido polisálico (PSA) para prolongar la vida activa y mejorar la estabilidad de péptidos y proteínas terapéuticos. El PSA es un polímero de ácido siálico (un azúcar). Cuando se usa para la administración de proteínas y péptidos terapéuticos, el ácido polisálico proporciona un microentorno protector en la conjugación. Esto aumenta la vida activa de la proteína terapéutica en la circulación y evita que sea reconocida por el sistema inmunitario. El polímero de PSA se encuentra de forma natural en el cuerpo humano. Lo adoptaron determinadas bacterias que evolucionaron durante millones de años para recubrir sus paredes con el mismo.

20 30 Estas bacterias polisialiladas de forma natural pudieron, en virtud de la imitación molecular, frustrar el sistema de defensa del cuerpo. El PSA, la última tecnología furtiva de la naturaleza, se puede producir fácilmente a partir de dichas bacterias en grandes cantidades y con características físicas predeterminadas. El PSA bacteriano es completamente no inmunogénico, incluso cuando está acoplado a proteínas, ya que es químicamente idéntico al PSA en el cuerpo humano.

35 40 Otra tecnología incluye el uso de derivados de hidroxietilalmidón ("HES") unidos a anticuerpos. El HES es un polímero natural modificado derivado del almidón de maíz ceroso y puede ser metabolizado por las enzimas del cuerpo. Habitualmente se administran soluciones de HES para sustituir un volumen de sangre insuficiente y para mejorar las propiedades reológicas de la sangre. La hesilación de un anticuerpo posibilita la prolongación de la semivida en circulación aumentando la estabilidad de la molécula, así como reduciendo el aclaramiento renal, provocando una actividad biológica aumentada. Variando diferentes parámetros, tales como el peso molecular de HES, puede personalizarse una amplia gama de conjugados de HES y anticuerpo.

45 También se pueden generar anticuerpos que tienen una semivida aumentada *in vivo* introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o supresiones) en un dominio constante de IgG, o un fragmento de unión a FcRn del mismo (preferentemente un fragmento de dominio Fc o Fc bisagra). Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 98/23289; la Publicación Internacional N.º WO 97/34631; y la patente de EE.UU. N.º 6.277.375.

50 Además, los anticuerpos se pueden conjugar con albúmina para hacer que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo sea más estable *in vivo* o tenga una semivida más larga *in vivo*. Las técnicas son bien conocidas en la técnica, véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales N.º WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y la Patente europea N.º EP 413.622.

55 60 El anticuerpo contra LRP6 o un fragmento del mismo también se puede fusionar con uno o más polipéptidos de albúmina sérica humana (HSA), o una parte de la misma. HSA, una proteína de 585 aminoácidos en su forma madura, es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también actúa como portador de ligandos endógenos y exógenos. El papel de la albúmina como molécula portadora y su naturaleza inerte son propiedades deseables para su uso como portador y transportador de polipéptidos *in vivo*. En los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y EP 413 622 se ha sugerido el uso de albúmina como componente de una proteína de fusión de albúmina como portador para diversas proteínas. También se ha propuesto el uso de fragmentos N-terminales de HSA para fusiones con polipéptidos (documento EP 399 666). En consecuencia, al fusionar o conjugar genética o químicamente los anticuerpos o fragmentos de los mismos con albúmina, se puede estabilizar o prolongar la vida útil y/o conservar la actividad de la molécula durante largos períodos de tiempo, *in vitro* y/o *in vivo*.

La fusión de la albúmina a otra proteína se puede lograr mediante manipulación genética, de modo que el ADN que codifica HSA, o un fragmento del mismo, se une al ADN que codifica la proteína. Despues se transforma o transfecta un hospedador adecuado con las secuencias de nucleótidos fusionadas, dispuestas de un modo en un plásmido adecuado como para expresar un polipéptido de fusión. La expresión se puede efectuar *in vitro* a partir de, por ejemplo, células procariotas o eucariotas, o *in vivo*, por ejemplo de un organismo transgénico. Se pueden encontrar métodos adicionales relacionados con las fusiones de HSA, por ejemplo, en los documentos WO 2001077137 y WO 200306007. En una realización específica, la expresión de la proteína de fusión se realiza en estípites celulares de mamíferos, por ejemplo, estípites celulares CHO.

10 Conjugados de anticuerpos

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se fusionan o conjugan químicamente (incluyendo las conjugaciones covalentes y no covalentes) con una proteína o polipéptido heterólogo (o un fragmento del mismo, preferentemente con un polipéptido de 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 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En realizaciones particulares, las proteínas de fusión comprenden un fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento (por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento F(ab)2, un dominio VH, una CDR de VH, un dominio VL o una CDR de VL) y una proteína, polipéptido o péptido heterólogos. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugar proteínas, polipéptidos o péptidos con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; las Patentes europeas N.º EP 307.434 y EP 367.166; las Publicaciones internacionales N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539; Zheng *et al.*, (1995) *J. Immunol.* 154:5590-5600; y Vil *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11337-11341.

25 Se pueden generar proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de redistribución de genes, redistribución de motivos, redistribución de exones y/o redistribución de codones (a los que se hace referencia colectivamente como "redistribución de ADN"). Se puede emplear la redistribución aleatoria de ADN para alterar las actividades de anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades más altas y tasas de disociación más bajas). Véanse, en general, las patentes de EE.UU. N.º 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458; Patten *et al.*, (1997) *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, (1998) *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82; Hansson *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, (1998) *Biotechniques* 24(2):308-313. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, se pueden alterar sometiéndolos a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína LRP6 puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

40 Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tal como un péptido, para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (Wilson *et al.*, (1984) *Cell* 37:767) y el marcador "flag".

45 En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos anticuerpos pueden ser útiles para controlar o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de prueba clínica, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección se pueden lograr acoplando el anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitación, diversas enzimas, tales como, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero sin limitación, umbelíferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aecuorina; materiales radiactivos, tales como, pero sin limitación, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I e ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In e ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Ti), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn y ¹¹⁷Estadio; y metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías por emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

50 Un anticuerpo o fragmento del mismo se puede conjugar con una fracción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo, por ejemplo, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células.

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo se puede conjugar con una fracción terapéutica o fracción de fármaco que modifique una respuesta biológica dada. Las fracciones terapéuticas o fracciones de fármaco no deben interpretarse estando limitadas a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina colérica o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón α, interferón β, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador tisular del plasminógeno, un agente apoptótico, un agente anti-angiogénico; o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina. Un anticuerpo anti-LRP6, o un fragmento del mismo, se puede conjugar con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina.

Dichos conjugados se denominan en el presente documento "inmunoconjungados". Los inmunoconjungados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, mate) las células. Los ejemplos incluyen taxon, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, t. colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoesteroides, procaína, tetracaina, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes de ablación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa cloranbucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). (Véase, por ejemplo, el documento US20090304721 de Seattle Genetics).

En algunas realizaciones, los ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar con un anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo con caliqueamicina está disponible en el mercado (Mylotarg TM; Wyeth-Ayerst).

En algunas realizaciones, las citoxinas se pueden conjugar con anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención utilizando la tecnología de enlazadores disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han utilizado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Se puede elegir un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para un análisis adicional de los tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito, G. et al., (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail et al., (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan y Kreitman, (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter y Springer, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

En algunas realizaciones, los anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención también se pueden conjugar con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjungados. Los ejemplos de isótopos radioactivos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, litio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Se establecen en la técnica métodos para preparar radioinmunoconjungados. Hay disponibles en el mercado ejemplos de radioinmunoconjungados disponibles en el mercado, incluyendo Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjungados utilizando anticuerpos. En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N""-tetraacético (DOTA) que se puede unir al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Dichas moléculas conectoras son conocidas comúnmente en la técnica y se describen en Denardo et al., (1998) *Clin Cancer Res.* 4(10):2483-90; Peterson et al., (1999) *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7; y Zimmerman et al., (1999) *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50.

Se conocen bien técnicas para conjugar fracciones terapéuticas de este tipo con anticuerpos, véanse, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2^a Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-58.

Los anticuerpos también pueden fijarse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Métodos de producción de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención**(i) Ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos**

5 Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos pueden comprender segmentos o dominios de las cadenas de anticuerpos contra LRP6 descritos anteriormente. Algunos de los ácidos nucleicos pueden comprender la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo contra Propulsor 1 que se muestra en SEQ ID NO: 14, 34 y 60, y/o la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 13, 33 y 59. En una realización específica, las moléculas de ácido nucleico son aquellas identificadas en la Tabla 1. Algunos de los ácidos nucleicos pueden comprender la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo contra Propulsor 3 que se muestra en SEQ ID NO: 82, 106 y 128, y/o la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 81, 105 y 127. Algunas otras moléculas de ácido nucleico pueden comprender secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos un 65, 80 %, 95 % o 99 %) a las secuencias de nucleótidos de aquellas identificadas en la Tabla 1. Cuando se expresan a partir de vectores de expresión apropiados, los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos son capaces de presentar capacidad de unión al antígeno LRP6.

20 Los polinucleótidos pueden codificar al menos una región CDR y normalmente las tres regiones CDR de la cadena pesada o ligera del anticuerpo contra LRP6 expuesto anteriormente. Algunos otros polinucleótidos codifican toda o sustancialmente toda la secuencia de la región variable de cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo contra LRP6 expuesto anteriormente. Debido a la degeneración del código, una diversidad de secuencias de ácidos nucleicos codificará cada una de las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina.

25 Las moléculas de ácido nucleico pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de ácidos nucleicos pueden comprender nucleótidos que codifican una secuencia de región variable de cadena pesada madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos un 80 %, 90 % o 99 %) a la secuencia de región variable de cadena pesada madura de un anticuerpo contra Propulsor 1 expuesto en SEQ ID NO: 14, 34 y 60. Algunas otras secuencias de ácidos nucleicos que comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de región variable de cadena ligera madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos un 80 %, 90 % o 99 %) a la secuencia de región variable de cadena ligera madura de un anticuerpo contra Propulsor 1 expuesta en SEQ ID NO: 13, 33 y 59.

30 Las moléculas de ácido nucleico pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de ácidos nucleicos pueden comprender nucleótidos que codifican una secuencia de región variable de cadena pesada madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos un 80 %, 90 % o 99 %) a la secuencia de región variable de cadena pesada madura de un anticuerpo contra Propulsor 3 expuesto en SEQ ID NO: 82, 106 y 128. Algunas otras secuencias de ácidos nucleicos que comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de región variable de cadena ligera madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos un 80 %, 90 % o 99 %) a la secuencia de región variable de cadena ligera madura de un anticuerpo contra Propulsor 3 expuesta en SEQ ID NO: 81, 105 y 127.

35 Las secuencias de polinucleótidos se pueden producir mediante síntesis de ADN en fase sólida *de novo* o mediante mutagénesis por PCR de una secuencia existente (por ejemplo, secuencias como se describen en los Ejemplos a continuación) que codifican un anticuerpo contra LRP6 o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como el método del fosfotriéster de Narang *et al.*, (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; el método del fosfodiéster de Brown *et al.*, (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109; el método de la diethylfosforamidita de Beaucage *et al.*, (1981) *Tetra. Lett.*, 22:1859; y el método de soporte sólido de la Patente de EE.UU. N.º 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia polinucleotídica por PCR se puede realizar como se describe en, por ejemplo, *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila *et al.*, (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:967; y Eckert *et al.*, (1991) *PCR Methods and Applications* 1:17.

40 Se pueden usar vectores de expresión y células hospedadoras para producir los anticuerpos contra LRP6 descritos anteriormente. Se pueden emplear diversos vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos contra LRP6 o los fragmentos de unión. Se pueden usar vectores de expresión basados en virus y no víricos para producir los anticuerpos en una célula hospedadora de mamífero. Los sistemas y vectores no víricos incluyen plásmidos, vectores episómicos, normalmente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas humanos artificiales (véase, por ejemplo, Harrington *et al.*, (1997) *Nat Genet* 15:345). Por ejemplo, los vectores no víricos útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos de LRP6 en células de mamíferos (por ejemplo, seres humanos) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV y muchos otros vectores conocidos en la técnica para expresar otras proteínas. Los vectores víricos útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores del virus vaccinia y virus del Bosque Semliki (SFV). Véanse, Brent *et al.*, (1995) citado anteriormente; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807; y Rosenfeld *et al.*, (1992) *Cell* 68:143.

La elección del vector de expresión depende de las células hospedadoras previstas en las que se ha de expresar el vector. Normalmente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (es decir, potenciadores) que están unidos operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena o fragmento de anticuerpo contra LRP6.

5 En algunas realizaciones, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas excepto en condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Se pueden expandir cultivos de organismos transformados en condiciones no inductoras sin sesgar la población para codificar secuencias, cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células hospedadoras. Además de los promotores, también se pueden requerir o desechar otros elementos reguladores para la

10 expresión eficaz de una cadena o fragmento de anticuerpo contra LRP6. Estos elementos normalmente incluyen un codón de iniciación ATG y un sitio de unión al ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf *et al.*, (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125; y Bittner *et al.*, (1987) *Meth. Enzymol.*, 153:516). Por ejemplo, se pueden usar el potenciador SV40 o el potenciador CMV para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

15 Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpo contra LRP6 insertadas. Más a menudo, las secuencias de anticuerpos contra LRP6 insertadas se unen a secuencias señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se han de usar para recibir secuencias que codifican dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo contra LRP6 a veces también codifican regiones constantes o partes de las mismas. Dichos vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes, conduciendo de este modo a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Normalmente, dichas regiones constantes son humanas.

20 25 Las células hospedadoras para albergar y expresar las cadenas de anticuerpos contra LRP6 pueden ser procariotas o eucariotas. *E. coli* es un hospedador procariota útil para clonar y expresar los polinucleótidos. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariotas también se pueden producir vectores de expresión, que normalmente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores normalmente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. También se pueden emplear otros microbios, tales como levaduras, para expresar polipéptidos de LRP6. También se pueden usar células de insecto en combinación con vectores de baculovirus.

30 35 Pueden usarse células hospedadoras de mamífero para expresar y producir los anticuerpos contra LRP6. Por ejemplo, pueden ser una estirpe celular de hibridoma que exprese genes de inmunoglobulina endógenos (por ejemplo, el clon de hibridoma de mieloma 1D6.C9 como se describe en los Ejemplos) o una estirpe celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógeno (por ejemplo, las células de mieloma SP2/0 que se ejemplifican a continuación). Estos incluyen cualquier célula humana o animal mortal normal o inmortal normal o anormal. Por ejemplo, se han desarrollado varias estirpes de células hospedadoras adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluyendo las estirpes celulares CHO, diversas estirpes celulares Cos, células HeLa, estirpes celulares de mieloma, células β transformadas e hibridomas. El uso de cultivos de células de tejidos de mamíferos para expresar polipéptidos se analiza generalmente, por ejemplo, en Winnacker, *FROM GENES TO CLONES*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Los vectores de expresión para células hospedadoras de mamíferos pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen *et al.*, (1986) *Immunol. Rev.* 89:49-68), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Estos vectores de expresión por lo general contienen promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos del tipo celular, específicos de fase y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, pero sin limitación, el promotor de la metalotioneína, el promotor tardío principal constitutivo de adenovirus, el promotor inducible por dexametasona de MMTV, el promotor de SV40, el promotor de polIII de MRP, el promotor constitutivo de MPSV, el promotor inducible por tetraciclina de CMV (tal como el promotor temprano inmediato del CMV humano), el promotor constitutivo de CMV y combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

40 45 50 55 Los métodos para introducir vectores de expresión que contengan las secuencias polinucleotídicas de interés varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, se usa normalmente transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que se puede usar tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros hospedadores celulares. (Véase en general Sambrook, *et al.*, citado anteriormente). Otros métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de policación:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión con la proteína estructural del virus del herpes VP22 (Elliot y O'Hare, (1997) *Cell* 88:223), captación de ADN potenciada por agentes y transducción *ex vivo*. Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas

recombinantes, a menudo se deseará una expresión estable. Por ejemplo, se pueden preparar estirpes celulares que expresan de forma estable cadenas de anticuerpos contra LRP6 o fragmentos de unión utilizando vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Despues de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido 5 antes de cambiarlas a un medio selectivo. El fin del marcador de selección es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas en medio selectivo. Las células resistentes, transfectadas de forma estable se pueden hacer proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo celular.

10 **(ii) Generación de anticuerpos monoclonales**

Se pueden producir anticuerpos monoclonales (mAb) mediante una diversidad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, (1975) *Nature* 256: 495. Se pueden emplear muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales, 15 por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células 20 de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

Se pueden preparar anticuerpos químéricos o humanizados basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener del hibridoma murino de interés y se puede modificar por ingeniería genética para que contenga 25 secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo químérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 4.816.567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en un marco humano utilizando 30 métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5225539 de Winter y las Patentes de EE.UU. N.º 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen *et al.*

35 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra LRP6 se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcomosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcomosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones de Ig humana".

40 El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) humana no reorganizadas y de cadena ligera κ , junto con mutaciones específicas que inactivan los loci de cadenas μ y κ endógenos (véase, por ejemplo, Lonberg, *et al.*, (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). En consecuencia, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena ligera y pesada humana introducidos experimentan un cambio de clase y una mutación somática para generar IgG κ monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg *et al.*, (1994) citado anteriormente; revisado en Lonberg, (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg y Huszar, (1995) *Intern. Rev. 45 Immunol.* 13: 65-93 y Harding y Lonberg, (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb y las modificaciones genómicas que portan dichos ratones, se describen adicionalmente en Taylor *et al.*, (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen *et al.*, (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724; Choi *et al.*, (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12:821-830; Tuailon *et al.*, (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor *et al.*, (1994) *International Immunology* 579-591; y 50 Fishwild *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse además las Patentes de EE.UU. N.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la Patente de EE.UU. N.º 5.545.807 de Surani *et al.*; las Publicaciones PCT N.º WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la Publicación PCT N.º WO 01/14424 de Korman *et al.*

55 En otra realización, los anticuerpos humanos se generan utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcomosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcomosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en el presente documento "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*

60 Aún más, hay disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y se pueden usar para generar anticuerpos contra LRP6. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.). Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati *et al.*

Además, hay disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y se pueden usar para generar anticuerpos contra LRP6. Por ejemplo, se pueden usar ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; dichos ratones se describen en Tomizuka *et al.*, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera (Kuroiwa *et al.*, (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y se pueden utilizar para generar anticuerpos contra LRP6.

5 También se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos utilizando métodos de presentación en fagos para rastrear bibliotecas de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de presentación en fagos de este tipo para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica o se describen en los ejemplos a continuación. Véanse, por ejemplo: las Patentes de EE.UU. N.º 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner *et al.*; las Patentes de EE.UU. N.º 5.427.908 y 5.580.717 de Dower *et al.*; Patentes de EE.UU. N.º 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty *et al.*; y las Patentes de EE.UU. N.º 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths *et al.*

10 15 Los anticuerpos monoclonales humanos también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de modo que se pueda generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N.º 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson *et al.*

20 **(iii) Genomanipulación del marco o de Fc**

Los anticuerpos modificados pueden incluir aquellos en los que se han realizado modificaciones en los restos del marco dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, dichas modificaciones del marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retromutar" uno o más restos del marco a la secuencia de la estirpe germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener restos del marco que difieren de la secuencia de la estirpe germinal de la que deriva el anticuerpo. Dichos restos pueden identificarse comparando las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de la estirpe germinal de las que deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de la estirpe germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de la estirpe germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio. En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos "retromutados".

35 Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más restos dentro de la región del marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítopos de los linfocitos T y reducir con ello la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. A este enfoque también se le alude como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 20030153043 de Carr *et al.*

40 En algunas realizaciones, además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro del marco o las regiones CDR, los anticuerpos se genomanipulan para incluir modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo se modifica químicamente (por ejemplo, se pueden unir una o más fracciones químicas al anticuerpo) o se modifica para alterar su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con mayor detalle a continuación. La numeración de los restos en la región Fc es la de Kabat (citado anteriormente).

45 En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de modo que el número de restos de cisteína en la región bisagra se altere, por ejemplo, aumente o disminuya. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de EE.UU. N.º 5.677.425 de Bodmer *et al.* El número de restos de cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

50 En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra Fc de tal manera que el anticuerpo tiene la unión de proteína A estafilocócica (SpA) alterada con respecto a la unión de SpA del dominio bisagra Fc nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. N.º 6.165.745 de Ward *et al.*

55 60 En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden reemplazarse por un resto de aminoácido diferente, de tal manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las Patentes de EE.UU. N.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter *et al.*

En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados de restos de aminoácidos pueden reemplazarse por un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga la unión de C1q alterada y/o reduzca o anule la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. N.º 6.194.551 de Idusogie *et al.*

5

En otra realización, se alteran uno o más restos de aminoácidos para alterar con ello la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

10 En otra realización más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han cartografiado los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields *et al.*, (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604).

15 En otra realización más, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de 20 la región flanqueante de la región variable para eliminar de esta manera la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe con más detalle en las Patentes de EE.UU. N.º 5.714.350 y 6.350.861 de Co *et al.*

25 Adicionalmente o como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNAc bisectantes aumentadas. Se ha demostrado que patrones de glucosilación alterados de este tipo aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Pueden lograrse modificaciones de carbohidratos de este tipo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Se han descrito en la técnica células con maquinaria de glucosilación alterada y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar 30 anticuerpos recombinantes para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang *et al.* describe una estirpe celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en una estirpe celular de este tipo presentan hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una estirpe celular CHO variante, células Lecl3, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos unidos a Asn (297), que también da como resultado la 35 hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La Publicación PCT WO 99/54342 de Umana *et al.* describe estirpes celulares genomanipuladas para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las estirpes celulares genomanipuladas presenten un aumento de las estructuras GlcNAc que se bisectan, lo que da como resultado un aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos 40 (véase también Umana *et al.*, (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 6.277.375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítopo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las Patentes de EE.UU. N.º 5.869.046 y 6.121.022 de Presta *et al.*

(iv) Métodos de genomanipulación de anticuerpos alterados

50

Como se ha analizado anteriormente, los anticuerpos contra LRP6 que tienen secuencias de VH y VL o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa que se muestran en el presente documento se pueden usar para crear nuevos anticuerpos contra LRP6 modificando secuencias de cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa, secuencias VH y/o VL, o la región o regiones constantes fijadas a las mismas. Las características estructurales de los 55 anticuerpos contra LRP6 se pueden usar para crear anticuerpos contra LRP6 estructuralmente relacionados que conserven al menos una propiedad funcional de los anticuerpos, tal como la unión a LRP6 humana y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de LRP6. Por ejemplo, una o más regiones CDR de los anticuerpos, o mutaciones de las mismas, se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco conservadas conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos contra LRP6 adicionales, genomanipulados de forma recombinante, como se ha analizado anteriormente. Otro tipo de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de genomanipulación es una o más de las secuencias VH y/o VL proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo genomanipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias VH y/o VL proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la secuencia o secuencias se usa como material de partida para crear una secuencia o secuencias de "segunda generación" derivadas

de la secuencia o secuencias originales y después la secuencia o secuencias de "segunda generación" se preparan y se expresan como una proteína.

5 Un método para preparar un anticuerpo contra propulsor 1 LRP6 puede consistir en: una secuencia de anticuerpo de
región variable de cadena pesada que tiene una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1,
21 y 47, una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22 y 48, y/o una secuencia CDR3
seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 23 y 49; y una secuencia de anticuerpo de región variable de
cadena ligera que tiene una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 24 y 50, una
secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 25 y 51, y/o una secuencia CDR3 seleccionada
10 del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 26 y 52; alterar al menos un resto de aminoácido dentro de la secuencia de
anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera para
crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

15 Un método para preparar un anticuerpo contra propulsor 3 LRP6 puede consistir en: una secuencia de anticuerpo de
región variable de cadena pesada que tiene una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:
69, 93 y 115, una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 70, 94 y 116, y/o una secuencia
CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 71, 95 y 117; y una secuencia de anticuerpo de región variable
20 de cadena ligera que tiene una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 91, 107 y 118, una
secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73, 97 y 121, y/o una secuencia CDR3
seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, 98 y 120; alterar al menos un resto de aminoácido dentro de la
secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena
ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresar la secuencia de anticuerpo alterada como
una proteína.

25 La secuencia de anticuerpo alterada también puede prepararse cribando colecciones de anticuerpos que tienen
secuencias de CDR3 fijas o determinantes de unión esenciales mínimos como se describe en el documento
US20050255552 y diversidad en las secuencias de CDR1 y CDR2. El cribado se puede realizar de acuerdo con cualquier
30 tecnología de cribado apropiada para cribar anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos, tal como la tecnología de
presentación en fagos.

30 Pueden usarse técnicas convencionales de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo
alterada. El anticuerpo codificado por la secuencia o secuencias de anticuerpo alteradas es uno que conserva una,
algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos contra LRP6 descritos en el presente documento, cuyas
35 propiedades funcionales incluyen, pero sin limitación, la unión específica a LRP6 humana y/o de macaco cangrejero; el
anticuerpo se une a LRP6 e inhibe la actividad biológica de LRP6 mediante la inhibición de la actividad de señalización
de Wnt canónica en un ensayo de gen indicador de Wnt.

40 Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse utilizando ensayos convencionales
disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento, tales como aquellos expuestos en los Ejemplos (por
ejemplo, ELISA).

45 Se pueden introducir mutaciones de forma aleatoria o selectiva a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante
del anticuerpo contra LRP6 y los anticuerpos contra LRP6 modificados resultantes se pueden cribar por su actividad de
unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en el presente documento. Se han descrito métodos para crear y
rastrear mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis de saturación, ensamblaje de ligadura sintético o una
combinación de los mismos. Como alternativa, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar *et al.* describe métodos de
uso de métodos de cribado informatizados para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

50 Caracterización de los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención

55 Los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se pueden caracterizar mediante diversos ensayos funcionales.
Por ejemplo, se pueden caracterizar por su capacidad para inhibir la actividad biológica mediante la inhibición de la
señalización de Wnt canónica en un ensayo del gen Wnt como se describe en el presente documento, su afinidad por una
proteína LRP6 (por ejemplo, LRP6 humana y/o de macaco cangrejero), el agrupamiento (caracterización y clasificación)
de epítitos, su resistencia a la proteólisis y su capacidad para bloquear la vía de Wnt. Además, los anticuerpos se
60 caracterizan por la capacidad de potenciar una señal de Wnt en presencia de un ligando Wnt. Se pueden usar diversos
métodos para medir la señalización de Wnt mediada por LRP6. Por ejemplo, la vía de señalización de Wnt se puede
controlar mediante (i) la medición de la abundancia y localización de catenina β ; y (ii) la medición de la fosforilación de
LRP6 u otras proteínas de señalización de Wnt corriente abajo (por ejemplo, DVL), y (iii) la medición de distintivos genéticos
específicos o dianas génicas (por ejemplo, c-myc, Ciclina D, Axina2).

65 La capacidad de un anticuerpo para unirse a LRP6 se puede detectar marcando directamente el anticuerpo de interés, o
el anticuerpo puede no marcarse y detectarse la unión indirectamente utilizando diversos formatos de ensayo sándwich
conocidos en la técnica.

Los anticuerpos contra LRP6 pueden bloquear o competir con la unión de un anticuerpo contra LRP6 de referencia a un polipéptido de LRP6. Estos pueden ser anticuerpos contra LRP6 totalmente humanos descritos anteriormente. También pueden ser otros anticuerpos contra LRP6 de ratón, químéricos o humanizados que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. La capacidad de bloquear o competir con la unión del anticuerpo de referencia indica que un anticuerpo contra LRP6 bajo prueba se une al mismo epítipo o similar al definido por el anticuerpo de referencia, o a un epítipo que es lo suficientemente próximo al epítipo al que esté unido el anticuerpo contra LRP6 de referencia. Es especialmente probable que dichos anticuerpos comparten las propiedades ventajosas identificadas para el anticuerpo de referencia. La capacidad para bloquear o competir con el anticuerpo de referencia se puede determinar mediante, por ejemplo, un ensayo de unión competitiva. Con un ensayo de unión competitiva, se examina la capacidad del anticuerpo bajo prueba para inhibir la unión específica del anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como un polipéptido de LRP6. Un anticuerpo de prueba compite con el anticuerpo de referencia por la unión específica al antígeno si un exceso del anticuerpo de prueba inhibe sustancialmente la unión del anticuerpo de referencia. La inhibición sustancial significa que el anticuerpo de prueba reduce la unión específica del anticuerpo de referencia generalmente en al menos un 10 %, 15 %, 50 %, 75 % o 90 %.

Existe una serie de ensayos de unión competitiva conocidos que se pueden usar para evaluar la competencia de un anticuerpo contra LRP6 con el anticuerpo contra LRP6 de referencia para unirse a una proteína LRP6. Estos incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), enzimoinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competencia sándwich (véase Stahli *et al.*, (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland *et al.*, (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619); ensayo directo en fase sólida con marcaje, ensayo sándwich directo en fase sólida con marcaje (véase Harlow y Lane, citado anteriormente); RIA directo en fase sólida con marcaje usando el marcador 1-125 (véase Morel *et al.*, (1988) *Molec. Immunol.* 25:7-15); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung *et al.*, (1990) *Virology* 176:546-552); y RIA de marcaje directo (Moldenhauer *et al.*, (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Por lo general, un ensayo de este tipo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, un anticuerpo contra LRP6 de prueba sin marcar y un anticuerpo de referencia marcado. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia del anticuerpo de prueba. Habitualmente, el anticuerpo de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo de competencia (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo al que está unido el anticuerpo de referencia para que se produzca impedimento estérico.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales contra LRP6 seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo se puede biotinilar utilizando reactivos disponibles en el mercado (por ejemplo, reactivos de Pierce, Rockford, IL). Se pueden realizar estudios de competencia que usan anticuerpos monoclonales sin marcar y anticuerpos monoclonales biotinilados utilizando placas de ELISA recubiertas con polipéptido de LRP6. La unión de MAb biotinilado se puede detectar con una sonda de fosfatasa alcalina de estrepto-avidina. Para determinar el isotipo de un anticuerpo contra LRP6 purificado, se pueden realizar ELISA de isotipo. Por ejemplo, se pueden recubrir pocillos de las placas de microtitulación con 1 µg/ml de anticuerpo contra IgG humana durante la noche a 4 °C. Después de bloquear con BSA al 1 %, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos del anticuerpo monoclonal contra LRP6 o controles de isotype purificados, a temperatura ambiente durante una o dos horas. Después, los pocillos se pueden hacer reaccionar con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específica de IgG1 humana o IgM humana. Después, las placas se revelan y analizan para poder determinar el isotype del anticuerpo purificado.

Para demostrar la unión de anticuerpos monoclonales contra LRP6 a células vivas que expresan un polipéptido de LRP6, se puede usar citometría de flujo. Brevemente, se pueden mezclar estirpes celulares que expresan LRP6 (cultivadas en condiciones de crecimiento convencionales) con diversas concentraciones de un anticuerpo contra LRP6 en PBS que contiene BSA al 0,1 % y suero de ternera fetal al 10 %, e incubar a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo anti-IgG humana marcado con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar con el instrumento FACScan utilizando propiedades de dispersión de la luz y lateral para sincronizar las células individuales. Se puede utilizar un ensayo alternativo que utiliza microscopía de fluorescencia (además o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener una sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

Los anticuerpos contra LRP6 se pueden probar adicionalmente para determinar su reactividad con un polipéptido de LRP6 o un fragmento antigénico mediante transferencia Western. En resumen, se pueden preparar polipéptidos LRP6 purificados o proteínas de fusión o extractos celulares de las células que expresan LRP6 y someter a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternera fetal al 10 % y se sondan con los anticuerpos monoclonales que se han de probar. La unión de IgG humana se puede detectar utilizando fosfatasa alcalina anti-IgG humana y revelar con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., San Luis, MO). También se describen ejemplos de ensayos funcionales en la sección Ejemplos a continuación.

Usos profilácticos y terapéuticos

5 La presente invención proporciona un anticuerpo biparatópico que comprende dos fracciones de unión a antígeno, en donde la primera fracción de unión a antígeno se une al dominio propulsor 1 de LRP6 y la segunda fracción de unión a antígeno se une al dominio propulsor 3 de LRP6, en donde dicho anticuerpo biparatópico inhibe la señalización de LRP6 mediada tanto por propulsor 1 como por propulsor 3 y no potencia la señalización de Wnt1 y Wnt3, para su uso en un método de tratamiento de un

10 cáncer que expresa LRP6. En una realización específica, los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención son para su uso en un método para tratar un cáncer de mama, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas y melanoma que expresan LRP6.

15 Los anticuerpos contra LRP6 también se pueden usar para tratar o prevenir otros trastornos asociados a la señalización de Wnt aberrante o defectuosa, incluyendo, pero sin limitación, osteoporosis, osteoartritis, poliquistosis renal, diabetes, esquizofrenia, enfermedad vascular, enfermedad cardíaca, enfermedades proliferativas no oncológicas, fibrosis y enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer. La vía de señalización de Wnt desempeña una función fundamental en la reparación y regeneración de tejidos. Se pueden usar agentes que sensibilizan las células 20 a la señalización de Wnt para promover la regeneración de tejidos para muchas afecciones, tales como enfermedades óseas, mucositis, lesión renal aguda y crónica, y otras.

Los agentes adecuados para el tratamiento de combinación con anticuerpos contra LRP6 incluyen agentes de tratamiento de referencia conocidos en la técnica que pueden modular las actividades de la vía de señalización de Wnt canónica (por ejemplo, agentes de PI3 cinasa).

Usos diagnósticos

30 Se pueden usar anticuerpos para ensayos de diagnóstico para determinar la expresión de proteína LRP6 y/o ácido nucleico, así como la función de la proteína LRP6, en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, células, tejido) o de un individuo afectado por cáncer, o que está en riesgo de desarrollar cáncer.

35 Los ensayos de diagnóstico, tales como los ensayos competitivos, se basan en la capacidad de un análogo marcado (el "indicador") para competir con el analito de la muestra de prueba por un número limitado de sitios de unión en un compañero de unión común. El compañero de unión generalmente se insolubiliza antes o después de la competencia y después el indicador y el analito unidos al compañero de unión se separan del indicador y el analito no unidos. Esta separación se logra por decantación (cuando el compañero de unión se preinsolubilizó) o por centrifugación (cuando el compañero de unión se precipitó después de la reacción competitiva). La cantidad de analito de la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de indicador unido medida por la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan 40 curvas de dosis-respuesta con cantidades conocidas de analito y se comparan con los resultados de la prueba para determinar cuantitativamente la cantidad de analito presente en la muestra de prueba. Estos ensayos se denominan sistemas ELISA cuando se utilizan enzimas como marcadores detectables. En un ensayo de esta forma, la unión competitiva entre anticuerpos y anticuerpos contra LRP6 da como resultado que la proteína LRP6 unida, preferentemente los epítopos de LRP6, sean una medida de anticuerpos en la muestra de suero, más particularmente, anticuerpos inhibidores en la muestra de suero.

45 Una ventaja significativa del ensayo es que la medición se realiza directamente inhibiendo los anticuerpos (es decir, aquellos que interfieren con la unión de la proteína LRP6, específicamente, los epítopos). Un ensayo de este tipo, particularmente en forma de una prueba ELISA, tiene considerables aplicaciones en el ambiente clínico y en el análisis de sangre de rutina.

50 Pueden usarse ensayos de pronóstico (o predictivos) para determinar si un individuo tiene riesgo de desarrollar un trastorno asociado a la desregulación de la actividad de la vía del complemento. Por ejemplo, se pueden someter a ensayo mutaciones en un gen de LRP6 en una muestra biológica. Dichos ensayos se pueden usar con fines pronósticos o predictivos para tratar profilácticamente a un individuo antes de la aparición de un trastorno caracterizado o asociado a la expresión del ácido nucleico o la actividad de la proteína LRP6.

55 Se pueden usar métodos para determinar la expresión del ácido nucleico de LRP6 o la actividad de la proteína LRP6 en un individuo para seleccionar agentes terapéuticos o profilácticos apropiados para ese individuo (denominados en el presente documento "farmacogenómica"). La farmacogenómica permite la selección de agentes (por ejemplo, fármacos) para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo basado en el genotipo del individuo (por ejemplo, el genotipo del individuo se examina para determinar la capacidad del individuo para responder a un agente particular).

60 Los ensayos clínicos pueden implicar el seguimiento de la influencia de los agentes (por ejemplo, fármacos) sobre la expresión o actividad de la proteína LRP6.

Composiciones farmacéuticas

5 Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen anticuerpos contra LRP6 (fragmentos intactos o unidos), los anticuerpos contra LRP6 (fragmentos intactos o unidos) se mezclan con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más agentes terapéuticos que son adecuados para tratar o prevenir el cáncer (cáncer de mama, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas y melanoma).

10 10 Se pueden preparar formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico mezclando con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones densas, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (véase, por ejemplo, Hardman, *et al.* (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Nueva York, N.Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.).

15 20 La selección de una pauta de administración para un agente terapéutico depende de varios factores, que incluyen la tasa de recambio de tejido o suero de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En determinadas realizaciones, una pauta de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente compatible con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de agente biológico administrado depende en parte de la entidad particular y de la gravedad 25 de la afección que se esté tratando. Se dispone de directrices para seleccionar las dosis apropiadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert *et al.*, (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom *et al.*, (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; 30 Slamon *et al.*, (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz *et al.*, (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh *et al.*, (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky *et al.*, (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

35 30 La determinación de la dosis apropiada la realiza el médico, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o de los que se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o que se prevé que afecten al tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y después se aumenta en pequeños aumentos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas, por ejemplo, de la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas.

40 40 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o 45 materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares conocidos en las técnicas médicas.

50 50 Se pueden proporcionar composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención mediante infusión continua o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1-7 veces por semana. Las dosis se pueden administrar por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía intramuscular, por vía intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosificación específico es uno que implica la dosis o frecuencia de dosis máximas que evita efectos secundarios no deseables significativos. Una dosis semanal total puede ser de al menos 0,05 µg/kg de peso corporal, al menos 0,2 µg/kg, al menos 0,5 µg/kg, al menos 1 µg/kg, al menos 10 µg/kg, al menos 100 µg/kg, al menos 0,2 mg/kg, al menos 1,0 mg/kg, al menos 2,0 mg/kg, al menos 10 mg/kg, al menos 25 mg/kg o al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144). La dosis deseada de anticuerpos o fragmentos de estos es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o polipéptido en moles/kg de peso corporal. 55 La concentración plasmática deseada de los anticuerpos o fragmentos de estos es aproximadamente, en moles/kg de peso corporal. La dosis puede ser de al menos 15 µg, al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 35 µg, al menos 40 µg, al menos 45 µg, al menos 50 µg, al menos 55 µg, al menos 60 µg, al menos 65 µg, al menos 70 µg, al menos 75 µg, al menos 80 µg, al menos 85 µg, al menos 90 µg, al menos 95 µg o al menos 100 µg. Las dosis administradas a un sujeto pueden ser al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o más.

60 65

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención, la dosis administrada a un paciente puede ser de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis puede ser de entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, de 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, de 0,0001 a 0,15 mg/kg, de 0,0001 a 0,10 mg/kg, de 0,001 a 0,5 mg/kg, de 0,01 a 0,25 mg/kg o de 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente.

En algunas realizaciones, la dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención se puede calcular utilizando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis que se ha de administrar en mg/kg. En algunas realizaciones, la dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención puede ser de 150 µg/kg o menos, 125 µg/kg o menos, 100 µg/kg o menos, 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 2,5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1,5 µg/kg o menos, 1 µg/kg o menos, 0,5 µg/kg o menos o 0,5 µg/kg o menos del peso corporal de un paciente.

En algunas realizaciones, la dosis unitaria de los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención puede ser de 0,1 mg a 20 mg, de 0,1 mg a 15 mg, de 0,1 mg a 12 mg, de 0,1 mg a 10 mg, de 0,1 mg a 8 mg, de 0,1 mg a 7 mg, de 0,1 mg a 5 mg, de 0,1 a 2,5 mg, de 0,25 mg a 20 mg, de 0,25 a 15 mg, de 0,25 a 12 mg, de 0,25 a 10 mg, de 0,25 a 8 mg, de 0,25 mg a 7 mg, de 0,25 mg a 5 mg, de 0,5 mg a 2,5 mg, de 1 mg a 20 mg, de 1 mg a 15 mg, de 1 mg a 12 mg, de 1 mg a 10 mg, de 1 mg a 8 mg, de 1 mg a 7 mg, de 1 mg a 5 mg o de 1 mg a 2,5 mg.

En algunas realizaciones, la dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención puede lograr un título en suero de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml o al menos 400 µg/ml en un sujeto. Como alternativa, en algunas realizaciones, la dosificación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención puede lograr un título en suero de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml o al menos 400 µg/ml en el sujeto.

En algunas realizaciones, las dosis de anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención se pueden repetir y las administraciones pueden estar separadas por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o al menos 6 meses.

Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se esté tratando, el estado general de salud del paciente, la vía del método y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard *et al.*, (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Ratón, Fla.; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

La vía de administración puede ser, por ejemplo, aplicación cutánea, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional o mediante sistemas de liberación sostenida o un implante (véase, por ejemplo, Sidman *et al.* (1983) *Biopolymers* 22:547-556; Langer, *et al.* (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277; Langer (1982) *Chem. Tech.* 12:98-105; Epstein, *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; Hwang, *et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030-4034; las Patentes de EE.UU. N.º 6.350.466 y 6.316.024). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Además, también se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las Publicaciones PCT N.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903.

Una composición también se puede administrar a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En algunas realizaciones, las vías de administración seleccionadas para anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraoperatoria, intracapsular, intraorbital, intracardíaca,

5 intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, una composición se puede administrar a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o en la mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, por vía vaginal, por vía rectal, por vía sublingual o por vía tópica. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención se administran por infusión. En otra realización, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención se administra por vía subcutánea.

10 En algunas realizaciones, si los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención se administran en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida, se puede usar una bomba para lograr la liberación controlada o sostenida (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En algunas realizaciones, se 15 pueden usar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida del anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención (véase, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véanse también Levy *et al.*, (1985) *Science* 228:190; During *et al.*, (1989) *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105); la Patente de EE.UU. N.º 5.679.377, la Patente de EE.UU. N.º 5.916.597, la Patente de EE.UU. N.º 5.912.015, la Patente de EE.UU. N.º 5.989.463, la Patente de EE.UU. N.º 5.128.326; la Publicación PCT N.º WO 99/15154; y la Publicación PCT N.º WO 20 25 99/20253. Los ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, polí(metacrilato de 2-hidroxi etilo), polí(metacrilato de metilo), polí(ácido acrílico), polí(etileno-co-acetato de vinilo), polí(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, polietilenglicol, polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolídos) (PLGA) y poliortoésteres. En una realización, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está exento de impurezas lixiviables, es estable en el almacenamiento, estéril y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida se puede colocar en la 25 proximidad de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo de este modo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

30 Se analizan sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). En algunas realizaciones, se puede usar cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprendan uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 4.526.938, la publicación PCT WO 91/05548, la publicación PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, y Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760.

40 En algunas realizaciones, si los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención se administran por vía tópica, se pueden formular en forma de pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión, u otra forma bien conocida por un experto en la materia. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19^a ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas farmacéuticas de administración tópica no pulverizables, se emplean habitualmente formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con la aplicación 45 tópica y que tienen una viscosidad dinámica, en algunos casos, mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamos y similares, que, si se desea, se esterilizan o se mezclan con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas farmacéuticas tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en donde el principio activo, en 50 algunos casos, en combinación con un portador inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un componente volátil presurizado (por ejemplo, un propelador gaseoso, tal como freón) o en un frasco expirable. Si se desea, también se pueden añadir hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas. Se conocen bien en la técnica ejemplos de dichos ingredientes adicionales.

55 Si las composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos se administran por vía intranasal, se pueden formular en forma de aerosol, pulverización, niebla o en forma de gotas. Se conocen en la técnica métodos para la coadministración o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citocina, esteroide, agente quimioterápico, antibiótico o radiación (véase, por ejemplo, Hardman, *et al.* (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10^a ed., McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapy for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa.; Chabner 60 y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa.). Una cantidad eficaz de tratamiento puede disminuir los síntomas en al menos un 10%; en al menos un 20%; al menos aproximadamente un 30%; al menos un 40%, o al menos un 50%.

Se pueden administrar terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), que se pueden administrar en combinación con los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención, con menos de 5 minutos de diferencia, con menos de 30 minutos de diferencia, 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de diferencia, con aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, con aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, con aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, con aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, con aproximadamente 12 horas a 18 horas de diferencia, de 18 horas a 24 horas de diferencia, de 24 horas a 36 horas de diferencia, de 36 horas a 48 horas de diferencia, de 48 horas a 52 horas de diferencia, de 52 horas a 60 horas de diferencia, de 60 horas a 72 horas de diferencia, de 72 horas a 84 horas de diferencia, de 84 horas a 96 horas de diferencia o de 96 horas a 120 horas de diferencia con respecto a los anticuerpos o fragmentos de los mismos. Las dos o más terapias se pueden administrar dentro de una misma visita del paciente.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención y las otras terapias se pueden administrar cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguida de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, opcionalmente, seguida de la administración de una tercera terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y así sucesivamente, y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias, para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso de acuerdo con la invención se pueden formular para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. En algunas realizaciones, para garantizar que los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención crucen la BHE (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para consultar métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que se transportan de forma selectiva a células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida de fármacos (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Las fracciones de direccionamiento ilustrativas incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); pág. 120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Se divultan protocolos para la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos solos o en combinación con otras terapias a un sujeto que lo necesite. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación se pueden administrar de forma concomitante o secuencial a un sujeto. La terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación también se puede administrar de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguida de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y la repetición esta administración secuencial, es decir, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (por ejemplo, agentes) para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (por ejemplo, agentes) y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación se pueden administrar a un sujeto simultáneamente. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que significa que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos se administra a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de modo que los anticuerpos puedan actuar junto con la otra terapia o terapias para proporcionar un mayor beneficio que si se administrasen de otro modo. Por ejemplo, cada terapia se puede administrar a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia se puede administrar a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto con menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, con aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, con aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, con aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con

aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, con aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, 24 horas de diferencia, 48 horas de diferencia, 72 horas de diferencia o 1 semana de diferencia. Se administran dos o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) dentro de la misma visita del paciente.

5

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación se pueden administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Como alternativa, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación se pueden administrar simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por las mismas vías de administración o diferentes.

10

Ejemplos

Métodos y materiales

15 **1: Selecciones, identificación y caracterización de anticuerpos**

(a) Selección

(i) Selecciones HuCAL GOLD®

20 Para la selección de anticuerpos que reconocen LRP6 humana se aplicaron varias estrategias de selección. Se generaron anticuerpos terapéuticos contra la proteína LRP6 humana mediante la selección de clones que tenían altas afinidades de unión, utilizando como fuente de proteínas variantes de anticuerpos una biblioteca de presentación de fagos disponible en el mercado, la biblioteca MorphoSys HuCAL GOLD®.

25

La biblioteca de fagémidos se basa en el concepto HuCAL® (Knappik *et al.*, (2000) *J Mol Biol* 296:57-86) y emplea la tecnología CysDisplay™ para presentar el Fab en la superficie del fago (documento WO01/05950 de Lohning).

30

En detalle, la biblioteca HuCAL GOLD® utilizada en el proyecto actual se describe en (Rothe *et al.*, (2007) *J Mol Biol*) Se usaron fagémidos producidos con el fago auxiliar VCSM13 o producidos con Hyperphage (Rondot *et al.*, (2001) *Nat Biotechnol* 19:75-78) para la selección de anticuerpos anti-LRP6.

(ii) Selección de células enteras contra LRP6

35

Para las selecciones de células enteras, se usó la estirpe celular HEK293-hLRP6ΔC-eGFP que expresa el fragmento amino terminal (aminoácido 1-1482) de LRP6 fusionado con eGFP. Se eluyeron fagémidos de anticuerpos HuCAL GOLD® específicos después de la incubación en la estirpe celular que expresa LRP6 seguido de la adsorción posterior a las células HEK293-LRP5/6-ARNhp. El sobrenadante que contenía el fago HuCAL resultante se tituló en células de *E. coli* TG1 y se rescató después de la infección de células *E. coli* TG1 utilizando fago auxiliar. La producción de fagos policoniales amplificados se tituló nuevamente y se usó en etapas de selección consecutivas.

40

(iii) Selección de captura de Fc contra LRP6

45

Para las selecciones de captura de Fc, se incubaron fagos bloqueados con LRP6-Fc capturado con Fc y los fagos inespecíficos se eliminaron por lavado utilizando diferentes concentraciones de PBST y PBS en diferentes momentos.

Los fagos restantes se eluyeron y se usaron inmediatamente para la infección de bacterias *E. coli* TG1. La amplificación, la producción de fagos y la determinación del título de salida se realizaron como se ha descrito anteriormente en la selección de células enteras contra LRP6.

50

(iv) Selección diferencial de células enteras contra LRP6

55

Se realizaron selecciones diferenciales de células enteras con selección de anticuerpos en células HEK293-hLRP6ΔC-eGFP y selección en LRP6-Fc humano recombinante como se ha descrito anteriormente para selecciones de células enteras y selecciones de captura de Fc.

Durante el proceso de selección, se eliminaron fagos inespecíficos utilizando diferentes concentraciones de PBS y PBST durante diferentes períodos de tiempo.

60

La infección por fagos de *E. coli* TG1, la amplificación, la producción de fagos y la determinación del título de salida se realizaron como se ha descrito anteriormente en la selección de células enteras contra LRP6.

(v) Selección en semisolución contra LRP6

Para selecciones en semisolución, se unieron covalentemente LRP6-Fc humano recombinante y BSA a M-280-Dynabeads tosilactivadas.

5 Los fagos preclarados se incubaron con perlas recubiertas con LRP6 en un rotador. Después se recogieron las perlas utilizando un separador magnético y se lavaron con PBST y PBS. Los fagos unidos a perlas se eluyeron y se usaron inmediatamente para la infección de bacterias *E. coli* TG1. La infección por fagos, la amplificación, la producción de fagos y la determinación del título de salida se realizaron como se ha descrito anteriormente en la selección de células enteras contra LRP6.

10 **(b) Subclonación y microexpresión de fragmentos Fab seleccionados**

Para facilitar la expresión rápida de Fab soluble, los insertos codificantes de Fab del fago HuCAL GOLD® seleccionado se subclonaron en un vector de expresión pMORPH®X9_FH o pMORPH®X9_FS. Después de la transformación de un único clón de TG1-F se realizaron la expresión y la preparación de extractos periplásmicos que contenían HuCAL®-fragmentos Fab como se ha descrito anteriormente (Rauchenberger *et al.*, (2003)).

15 **2: Cribado**

20 **(i) Cribado por FACS en células HEK293-hLRP6ΔC-eGFP**

25 Los clones seleccionados mediante las estrategias de selección de células enteras, selección diferencial de células enteras y selección en semisolución se examinaron mediante citometría de flujo en células HEK293-hLRP6ΔC-eGFP y células HEK293-LRP5/6-ARNhp para el contracribado. Los aciertos primarios de la estrategia de selección de captura de Fc como se ha descrito anteriormente también se probaron mediante citometría de flujo.

30 25 Las células se recogieron con una confluencia del 70 al 80 %, se resuspendieron en tampón de FACS y se tiñeron con lisados de células bacterianas en placas de microtitulación con fondo en U de 96 pocillos. La unión del anticuerpo se reveló con anticuerpos de detección conjugados con fluorocromo. Las células teñidas se lavaron dos veces y la intensidad de fluorescencia media se midió y analizó utilizando un instrumento FACSArray (BectonDickinson).

35 **(ii) Cribado de captura de Fc en LRP6-Fc humano recombinante**

30 Se cribaron clones seleccionados en la selección de captura de Fc en una configuración de ELISA de captura de Fc.

40 35 Se recubrieron placas de 384 pocillos Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, EE.UU.) con anticuerpo específico de fragmento Fc anti-IgG humana de cabra. Después de lavar con PBST y bloquear los pocillos, se añadió LRP6-Fc humano recombinante. Después de lavar las placas recubiertas, se añadieron lisados celulares y se detectaron los fragmentos Fab unidos utilizando F(ab')₂ anti-IgG humana de IgG de cabra conjugada con AP con el sustrato AttoPhos. Se leyó la fluorescencia a 535 nm utilizando un lector de placas Tecan.

45 **3: Expresión y purificación de anticuerpos contra HuCAL®-Fab en *E. coli***

40 Se indujo la expresión de fragmentos Fab codificados por pMORPH®X9_Fab_FH o pMORPH®X11_Fab_FH en células TG-1 mediante la adición de IPTG. Las células se rompieron utilizando lisozima y fragmentos Fab aislados mediante cromatografía Ni-NTA (BioRad, Alemania). Las concentraciones de proteínas se determinaron por espectrofotometría UV. La pureza de los fragmentos Fab se analizó en estado reducido desnaturizado utilizando SDS-PAGE y en estado nativo mediante HP-SEC.

50 **4: Determinación de afinidad**

50 **(i) Mediciones de resonancia de plasmones superficiales**

55 Para la determinación de valores de K_D , se aplicó la tecnología de resonancia de plasmones superficiales. Se usó un chip CM5 de captura de Fc antihumano (Biacore, Suecia) para capturar LRP6-Fc-Fusión seguido de inyección de ligando (Fab) a diferentes concentraciones.

60 **(ii) Método de titulación de equilibrio de solución (SET) para la determinación de K_D utilizando Sector Imager 6000 (MSD)**

Para la determinación de K_D por titulación de equilibrio de solución (SET) se usaron fracciones de monómero de proteína de anticuerpo (al menos un 90 % de contenido de monómero, analizado por SEC analítica; Superdex75 (Amersham Pharmacia) para Fab, o Tosoh G3000SWXI, (Tosoh Bioscience) para IgG, respectivamente).

La determinación de la afinidad en solución se realizó básicamente como se describe en la bibliografía (Friguet *et al.*, (1985) *J Immunol Methods* 77:305-319). Con el fin de mejorar la sensibilidad y precisión del método de SET, se transfirió de ELISA clásico a tecnología basada en ECL (Haenel *et al.*, (2005) *Anal Biochem*. 339:182-184).

5 Los datos se evaluaron con el software XLfit (IDBS) aplicando modelos de ajuste personalizados. Para la determinación de K_D de moléculas de Fab se utilizó el modelo de ajuste (de acuerdo con Haenel *et al.*), modificado de acuerdo con Abraham *et al.* (1996) *Journal of Molecular Recognition* 9:456-461.

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

10 [Fab]_t: concentración de Fab total aplicada
 x: concentración total de antígeno soluble aplicado (sitios de unión)
 15 B_{\max} : señal máxima de Fab sin antígeno
 K_D : afinidad

5: Cribado después de la maduración por afinidad

Determinación de CE₅₀ en células HEK293T/17

Se determinaron los valores de CE₅₀ en células parentales HEK293T/17 en mediciones de FACS. Una curva de titulación de anticuerpos típica contenía de diez a doce diluciones de anticuerpos diferentes y las titulaciones comenzaron a concentraciones de aprox. 150 a 200 µg/ml (concentración final). Las células se recogieron con Accutase, se resuspendieron en tampón de FACS, se distribuyeron en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se tiñeron con diluciones de anticuerpos. Se determinaron los valores de CE₅₀ con el programa GraphPad Prism utilizando análisis de regresión no lineal.

30 6: Conversión en IgG

Con el fin de expresar IgG de longitud completa, se subclonaron fragmentos de dominio variable de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de vectores de expresión de Fab en vectores pMORPH[®]_hlg apropiados para IgG2 humana, IgG4 humana, IgG4_Pro humana e IgG1f LALA humana.

35 7: Expresión transitoria y purificación de IgG humana

Se transfectaron células HKB 11 eucariotas con cantidades iguales de vector de expresión de cadena pesada y ligera de IgG (pMORPH2) o ADN de vector de expresión que codificaba cadenas pesadas y ligeras de IgG (pMORPH4). Después de la esterilización por filtración, la solución se sometió a cromatografía de afinidad de proteína A convencional (MabSelect SURE, GE Healthcare). Las concentraciones de proteínas se determinaron por espectrofotometría UV. La pureza de la IgG se analizó en condiciones desnaturizantes, reductoras y no reductoras en SDS-PAGE o utilizando Agilent BioAnalyzer y en estado nativo mediante HP-SEC.

45 8: Ensayo de gen indicador de Wnt

La capacidad de los anticuerpos anti-LRP6 para inhibir la señalización de Wnt se probó en un ensayo de gen indicador de luciferasa sensible a Wnt1 y Wnt3a. Las células se estimularon con medio acondicionado con Wnt3a o mediante cotransfección de Wnt 1, Wnt3a u otros plásmidos de expresión de Wnt.

(i) Ensayo de gen indicador de Wnt3a con medio acondicionado

Se sembraron 10⁴ células HEK293-STF/pocillo se sembraron en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos y las células se incubaron durante la noche a 37 °C/CO₂ al 5 % en 100 µl de medio.

55 Al día siguiente, se prepararon diversas diluciones de anticuerpos anti-LRP6 y diluciones de DKK1 (control positivo) en medio puro o diluido en medio acondicionado con Wnt3a. Se retiraron 60 µl/pocillo del sobrenadante de la placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se reemplazaron por 60 µl/pocillo de las diluciones de medio acondicionado/anticuerpo.

60 Después de la incubación durante 16 a 24 h a 37 °C/CO₂ al 5 %, se añadieron 100 µl de reactivo Luciferasa BrightGlo (Promega) y las placas se incubaron durante 10 min. Para la lectura de luminiscencia (Lector de placas Tecan), los lisados celulares se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos (Costar, n.º de Cat. 3917).

También se puede realizar un ensayo similar utilizando el cocultivo de células que sobreexpresan Wnt3 o Wnt3a (por ejemplo, células CHO-K1, TM3, L o HEK293)

5 **(ii) Ensayo de gen indicador de Wnt1/Wnt3a con células transfectadas transitoriamente**

Se sembraron 3×10^4 células HEK293T/17/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Costar) y las células se incubaron a $37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$ al 5 % en 100 μl de medio como se describe en la Tabla 3. Después de 12 a 16 h, las células se transfectaron con plásmido de expresión de Wnt de vector vacío 1 ng/pocillo; pTA-Luc-10xSTF (construcción de luciferasa de luciérnaga) 50 ng/pocillo; o phRL-SV40 (construcción de luciferasa de *Renilla*) 0,5 ng/pocillo.

10 Se preparó una premezcla de transfección (10 μl /pocillo) que contenía los plásmidos enumerados anteriormente y 0,2 μl de FuGene6/pocillo (Roche). La premezcla de transfección se incubó 15 min a TA y después se distribuyó en los pocillos. La placa se agitó a 400 rpm durante 2 min a TA y después se incubó durante 4 h a $37^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2$ al 5 %. Mientras tanto, se diluyeron anticuerpos en el medio y se añadieron a las células transfectadas (75 μl /pocillo).

15 Después de 18 a 24 h, se añadieron 75 μl /pocillo de reactivo de luciferasa DualGlo (Promega) y la placa se agitó durante 10 min para la lisis celular antes de la lectura de la actividad de la luciferasa de luciérnaga. Después de la lectura de la luminiscencia, se añadieron 75 μl /pocillo del reactivo DualGlo Stop&Glow (Promega) y se volvió a medir la luminiscencia para determinar la actividad de la luciferasa de *Renilla*.

20 Para el análisis, se calculó la relación entre la actividad de la luciferasa de luciérnaga y la actividad de la luciferasa de *Renilla*. Para la determinación de CI_{50} de los anticuerpos anti-LRP6, los valores relativos de luciferasa se analizaron utilizando GraphPad Prism.

25 También se puede realizar un ensayo similar utilizando el cocultivo de Wnt1 u otras células que sobreexpresan el ligando de clase Wnt1 (por ejemplo, células CHO-K1, TM3, L o HEK293).

30 **9: Estudios de reactividad cruzada por FACS**

35 La reactividad de especies cruzadas a LRP6 murina y de macaco cangrejero se determinó en células mediante análisis por FACS. La tinción de FACS se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente. Se usaron células U266 humanas (sin expresión de LRP6) como control negativo.

40 La reactividad cruzada con LRP6 murina se probó en células NIH-3T3 murinas. La reactividad cruzada con LRP6 de macaco cangrejero se probó en la estirpe celular de macaco cangrejero Cynom-K1 y en células HEK293T/17 transfectadas transitoriamente:

45 Para probar la reactividad cruzada con macaco cangrejero en la estirpe celular humana HEK293T/17, las células se transfectaron transitoriamente utilizando Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se transfectaron con una mezcla del plásmido de expresión de LRP6 humana pCMV6_XL4_LRP6 y el plásmido codificante de chaperonas pcDNA3.1-flag_MESD o con una mezcla de pcDNA3.1-nV5-DEST_cynoLRP6 y pcDNA3.1-flag_MESD (sobreexpresión de LRP6 de macaco cangrejero). Se usaron 50 μg de plásmido de expresión LRP6 y 20 μg de plásmido de expresión MESD por matraz T175. Después de 24 h, las células se separaron y se tiñeron con el anticuerpo de control anti-LRP6 humana de cabra (R&D Systems) y con anticuerpos anti-LRP6 HuCAL. Se usaron células HEK293T/17 transfectadas de forma simulada para las tinciones de control negativo (expresión de LRP6 endógena baja).

50 **10: Optimización de aglutinante**

55 **50 Generación de bibliotecas de maduración por afinidad**

Para aumentar la afinidad y la actividad biológica de los fragmentos de anticuerpos seleccionados, las regiones L-CDR3 y HCDR2 se optimizaron en paralelo mediante mutagénesis de casete utilizando mutagénesis dirigida por trinucleótidos, mientras que las regiones marco conservadas se mantuvieron constantes.

60 Las diferentes bibliotecas de maduración por afinidad se generaron mediante procedimientos de clonación convencionales y transformación de los clones diversificados en células de *E. coli* TOP10F electrocompetentes (Invitrogen). La secuenciación de clones escogidos aleatoriamente mostró una diversidad del 100 %. No se encontraron aglutinantes parentales entre los clones escogidos. Por último, se prepararon fagos de todas las bibliotecas por separado.

65 **11: Xenoinjertos de MMTV-Wnt1**

Se hicieron pases de tumores de ratones transgénicos MMTV-Wnt1 como trozos de tumor en la almohadilla de grasa mamaria de ratones FVB durante 5 pases antes de la implantación en la almohadilla de grasa mamaria de ratones atípicos. Once días después del implante, cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 110 mm^3 , los

ratones se aleatorizaron en 3 grupos con 8 ratones por grupo y recibieron dosis cada tres días (DeAlmeida *et al.* (2007); *Cancer Res.* 67:5371-9).

12: Inhibición en ensayos bioquímicos

5 Se cultivaron células HEK293 en D-MEM suplementado con suero fetal bovino al 10 % a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se sembraron células en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Costar) a 3 x 10⁴/pocillo y se transfecaron con 0,1 ng/pocillo de plásmido de expresión de Wnt, 50 ng/pocillo de indicador de STF y 0,5 ng/ml de phRL-SV40 (Promega) mezclados con 0,2 µl/pocillo de FuGene6 (Roche). Cuatro horas después de la transfección, los anticuerpos se diluyeron en PBS y se añadieron a las células transfecadas. Después de 18 horas de incubación, se midieron las actividades de la luciferasa de luciérnaga y de la luciferasa de *Renilla* utilizando el reactivo de luciferasa DualGlo (Promega). Se usó luciferasa de *Renilla* para normalizar la eficiencia de la transfección

10 15 Todos los formatos de IgG probados tienen una inhibición potente y completa de la señal canónica generada por Wnt1 (2, 6, 7A, 7B, 9, 10A, 10B). Todos dan lugar a una curva de potenciación en forma de campana en presencia de una señal generada por Wnt3/3A.

13: Ensayo de competencia basado en FACS

20 25 30 Para el ensayo de competencia basado en FACS, los Fab anti-LRP6 y el control negativo Fab MOR03207 se biotinilaron utilizando el módulo de biotinilación de proteínas ECL (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los Fab biotinilados se usaron para la tinción de FACS en células HEK293-hLRP6ΔC-eGFP a una concentración constante de Fab (concentración final de 20 nM) y compitieron con un exceso molar de 100 veces de Fab sin marcar. Las células se incubaron con las diluciones de Fab durante 1 hora a 4 °C en un agitador de placas. Después de lavar las células 1x con tampón de FACS, se incubaron con estreptavidina conjugada con PE (Dianova) durante 1 hora a 4 °C en un agitador de placas en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con tampón de FACS y se midió la fluorescencia utilizando Matriz de FACS (BD). De manera similar, los Fab anti-LRP6 sin biotinilar compitieron con un exceso molar de 100 veces de la proteína LRP6 SOST y la unión de los Fab a las células se controló mediante anticuerpo anti-IgG humana conjugado con PE (Dianova).

14: Ensayo de inmunotransferencia

35 40 45 Se prepararon lisados celulares totales en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, SDS al 0,1 %, EDTA 1 mM). Los lisados se normalizaron para la concentración de proteínas, se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sondaron con los anticuerpos indicados. El anticuerpo pT1479 LRP6 requiere la generación de extractos de membrana para lograr resultados satisfactorios. Para generar extractos de membrana, se lisaron células en tampón hipotónico (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, KCl 10 mM) realizando cuatro ciclos de congelación y descongelación, y la fracción de membrana insoluble se solubilizó utilizando tampón RIPA. Se añadió cóctel inhibidor de proteasa (Sigma) y 1x cóctel inhibidor de fosfatasa (Upstate) a los tampones de lisis. Los anticuerpos comerciales utilizados en el ensayo de transferencia Western incluyen anticuerpos anti-LRP6 de conejo, anti-pT1479 LRP6 de conejo y anticuerpos anti-pS1490 LRP6 de conejo (Cell Signaling Technology).

Ejemplo 1: Unión específica de anticuerpos anti-LRP6 a LRP6 endógena por FACS

50 55 60 La detección de la expresión de LRP6 en la superficie celular endógena se examinó en una serie de células tumorales utilizando anticuerpos anti-LRP6 y análisis por FACS. Como se muestra en la Fig. 1A, las células PA1 expresan el ARNm de LRP5 y de LRP6, mientras que las células U266 y Daudi no expresan el ARNm de LRP6. Las células PA1, pero no las células U266 y Daudi, muestran una tinción significativa con IgG anti-Propulsor 1 de LRP6. Más importante aún, las células U266 no se tiñen con el anticuerpo anti-LRP6, aunque expresan LRP6, lo que demuestra la especificidad del anticuerpo anti-LRP6. Además, la tinción de anticuerpos anti-LRP6 de las células PA1 se reduce significativamente tras el agotamiento de LRP6 endógena utilizando ARNhP de LRP6, lo que demuestra adicionalmente la especificidad del anticuerpo contra LRP6.

65 En estudios adicionales, la atenuación génica de LRP6 por ARNhP en células PA1 confirma adicionalmente la especificidad de los anticuerpos contra Prop1 y Prop3 para LRP6 (véase la Fig. 1B). La atenuación génica se logró infectando células con lentivirus que codificaban ARN de horquilla pequeño dirigido a LRP6 y seleccionando un conjunto estable de células infectadas. El método de infección por ARNhP utilizado para el estudio se describe en Wiederschain *et al.* en 2009 *Cell Cycle* 8: 498-504. Epub 25 de febrero de 2009.

Ejemplo 2: Inhibición diferencial de ensayos de genes indicadores de Wnt1 y Wnt3a por Fab anti-Propulsor 1 y Propulsor 3 de LRP6

65 Se probaron diferentes Fab anti-LRP6 en ensayos de indicador de Wnt *in vitro*. Se expresaron ligandos Wnt1 o Wnt3A transitoriamente en células HEK293T/17 STF (ensayo de indicador génico) y se trataron con concentraciones variables

de fragmentos Fab anti-LRP6. Se realizaron ensayos de STF utilizando los protocolos descritos por Huang *et al.* (2009), *Nature*; 461:614-20. Epub 16 de septiembre de 2009. Como se observa en la Fig. 2A, los Fab anti-Propulsor 1 de LRP6 (MOR08168, MOR08545, MOR06706) redujeron específicamente la señalización dependiente de Wnt1 sin mucho efecto sobre la señalización dependiente de Wnt3A. Por el contrario, como se muestra en la Fig. 2B, los Fab anti-Propulsor 3 de LRP6 (MOR06475, MOR08193, MOR08473) redujeron específicamente la señalización dependiente de Wnt3A sin efectos significativos sobre la señalización dependiente de Wnt1 dependiente de Wnt1. Los resultados demuestran que las actividades de Wnt1 y Wnt3A se bloquean por separado por fragmentos Fab contra LRP6 diferentes (epitopos).

Ejemplo 3: Unión de anticuerpos anti-LRP6 a LRP6 de diferentes especies.

Para mostrar reactividad cruzada, se trataron células que expresaban LRP6 endógena de origen humano (HEK293T/17) y de ratón (NIH 3T3), o células HEK293/T17 transfectadas transitoriamente que expresaban LRP6 de macaco cangrejero, y se sometieron a citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. La Fig. 3 resume los resultados de los hallazgos de los resultados y muestra que todos los anticuerpos anti-LRP6 se unen a LRP6 humana, de ratón y de macaco cangrejero.

Ejemplo 4: Clasificación de Wnt basándose en su sensibilidad a los anticuerpos anti-Propulsor 1 y Propulsor 3 de LRP6.

Para evaluar los Wnt basándose en su sensibilidad a los anticuerpos anti-Propulsor 1 y Propulsor 3 de LRP6, se expresaron transitoriamente diversos ligandos Wnt en células HEK293T/17 STF (ensayo de indicador génico) y se trataron con anticuerpos anti-Propulsor 1 o Propulsor 3 de LRP6. Se realizaron ensayos de STF utilizando los protocolos descritos por Huang *et al.* (2009), *Nature*; 461:614-20. Epub 16 de septiembre de 2009. Los resultados se muestran en la Fig. 4, que representa la inhibición de la actividad de Wnt particulares basándose en la unión/bloqueo por anticuerpos a regiones de propulsor específicas de LRP6. La Fig. 4 muestra que la señalización inducida por Wnt1, Wnt2, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt9, Wnt10A, Wnt10B puede inhibirse específicamente con los Fab anti-Propulsor 1 de LRP6, mientras que la señalización inducida por Wnt3 y Wnt3A puede inhibirse específicamente con los Fab anti-Propulsor 3 de LRP6.

Ejemplo 5: La conversión de anticuerpos contra LRP6 de fragmentos Fab a IgG potencia la señalización de Wnt inducida por la otra clase de Wnt.

En una observación bastante inesperada, la conversión de anticuerpos contra LRP6 de fragmentos Fab a IgG potencia la señalización de WNT. La IgG anti-Propulsor 1 de LRP6 inhibe la señalización dependiente de Wnt1 y potencia la señalización dependiente de Wnt3A en un ensayo de indicador 293T/17 STF. De manera similar, la IgG anti-Propulsor 3 de LRP6 inhibe la señalización dependiente de Wnt3A y potencia la dependiente de Wnt1, como se muestra en la Fig. 5. Este hallazgo sugiere que la vía de señalización de Wnt puede modificarse o "afinarse" utilizando anticuerpos contra Propulsor 1 y Propulsor 3. Se observaron efectos similares en ensayos de indicadores STF en otros entornos celulares (por ejemplo, células MDA-MB231, MDA-MB435, PA-1, TM3 y 3t3; datos no mostrados)

Ejemplo 6: Los Fab anti-Propulsor 1 o Propulsor 3 de LRP6 inhiben específicamente la fosforilación de LRP6 inducida por Wnt1 o Wnt3A.

Se transfecaron células HEK293T/17 transitoriamente con plásmidos de expresión de Wnt1 o Wnt3A y se trataron con Fab anti-Propulsor 1 o Propulsor 3 de LRP6. Como se observa en la Fig. 6, el Fab anti-Propulsor 1 de LRP6 inhibe específicamente la fosforilación de LRP6 inducida por Wnt1, por ejemplo, los sitios T1479 y S1490 y los anticuerpos contra Propulsor 3 no lo hacen. Por el contrario, el anti-Propulsor 3 de LRP6 inhibe específicamente la fosforilación de LRP6 inducida por Wnt3A y los anticuerpos contra Propulsor 1 no lo hacen. Estos resultados respaldan que los anticuerpos se unen a distintos dominios propulsor de LRP6 y bloquean ligandos Wnt específicos.

Ejemplo 7: Inhibición de la expresión del gen diana de Wnt en un modelo de xenoinjerto tumoral MMTV-Wnt1 utilizando una IgG anti-Propulsor 1 de LRP6.

Los anticuerpos contra LRP6 se caracterizaron adicionalmente *in vivo* en un modelo en ratón genomanipulado reconocido en la técnica conocido como MMTV-Wnt1. Se realizaron experimentos para determinar si los anticuerpos anti-LRP6 en formato de IgG podrían inhibir la señalización de Wnt y el crecimiento tumoral *in vivo*. Los tumores mamarios derivados de ratones transgénicos MMTV-Wnt1 son dependientes de Wnt1; desactivar la expresión de Wnt1 utilizando un sistema regulado por tetraciclina (Gunther *et al.* (2003), citado anteriormente) o bloquear la actividad de Wnt utilizando Fz8CRDFc (DeAlmeida *et al.* (2007) *Cancer Research* 67:5371-5379) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*. Para medir el efecto de los anticuerpos anti-LRP6 sobre la señalización de Wnt en tumores MMTV-Wnt1, a ratones implantados con tumores MMTV-Wnt1 se les administró una dosis única i.v. de 5 mg/kg de anticuerpo anti-LRP6 antagonista específico de la clase Wnt1. Las concentraciones séricas del anticuerpo, así como la expresión del ARNm del gen diana Axina2 de la catenina β , se analizaron durante un período de dos semanas. La semivida de la fase β terminal del anticuerpo contra LRP6 fue de aproximadamente 108 horas. En correspondencia con la inyección de anticuerpos, se observó una disminución significativa de la expresión del ARNm de Axina2 en los tumores, y la expresión de Axina2 se recuperó gradualmente una semana después de la inyección de anticuerpos cuando disminuyó el nivel de anticuerpos en el suero. Estos resultados

5 sugieren que el anticuerpo anti-LRP6 específico de la clase Wnt1 suprime la señalización de Wnt en xenoinjertos MMTV-Wnt1 y esta supresión se correlaciona con la concentración de anticuerpo contra LRP6 en suero. Para probar el efecto de los anticuerpos anti-LRP6 sobre el crecimiento tumoral, se administró a los ratones anticuerpos anti-LRP6 específicos de Propulsor 1, Propulsor 3 o anticuerpos de control emparejados por isotipo. A los ratones se les administró una dosis inicial i.v. de 20 mg/kg, seguida cada tercer día de 10 mg/kg. En este experimento, el anticuerpo anti-LRP6 específico de Propulsor 1, pero no el de Propulsor 3, provocó la regresión tumoral. Juntos, estos resultados demuestran que el anticuerpo anti-LRP6 específico de Propulsor 1 induce la regresión de xenoinjertos MMTV-Wnt1,

10 los xenoinjertos de tumor MMTV-Wnt1 en ratones atípicos se trataron con MOR08168, una IgG anti-Propulsor 1 de LRP6 en diferentes puntos temporales que variaron de 1 hora a 14 días. La Fig. 7 muestra una correlación inversa con la concentración sérica FC del anticuerpo y la expresión de ARNm del gen diana Axina2 de Wnt. Los niveles de expresión del gen de Axina2 en los tumores se inhiben con el tratamiento con MOR08168 y regresan a medida que el anticuerpo se aclara del suero.

15 20 25 Además de la Axina2, se evaluó el efecto de MOR08168 sobre la expresión de genes adicionales. Se utilizaron matrices Affymetrix Mouse430 2.0 para perfilar un experimento de evolución temporal de tumores de aloinjerto MMTV-Wnt1 más o menos una dosis única de MOR08168 (5 mg/kg). Hubo seis puntos temporales en total (0, 1, 3, 8, 24, 336 horas) y hubo tres repeticiones por punto temporal. Basándose en los datos que demuestran la inhibición máxima de Axina tras el tratamiento con el anticuerpo, se eligieron las 8 h como el mejor momento representativo para determinar los genes expresados diferencialmente que supuestamente responden a la inhibición de la vía de Wnt. Se utilizó el marco R/Bioconductor y se empleó el paquete Limma para determinar genes expresados diferencialmente entre el punto temporal de 0 horas y el punto temporal de 8 horas. Se utilizó un valor P ajustado de 0,05 como umbral para determinar el conjunto de genes expresados diferencialmente. Basándose en este límite, hay 1270 conjuntos de sondas denominados diferencialmente expresados cartografiados a 972 genes. La Fig. 8A es una tabla que muestra los genes que se regularon positivamente >2 veces con un valor P ajustado de <0,01 y la Fig. 8B es una tabla que muestra los genes que se regularon negativamente >2 veces con un valor P ajustado de < 0,01.

Ejemplo 8: Actividades antitumorales de los anticuerpos anti-Propulsor 1 y Propulsor 3 de LRP6 en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt1.

30 Se evaluó la actividad antitumoral de los anticuerpos contra Propulsor 1 y 3 de LRP6 en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt1. Se implantaron fragmentos de tumor MMTV-Wnt1 por vía subcutánea (s.c.) en ratones atípicos hembra. 11 días después de la implantación, los ratones portadores de tumores MMTV-Wnt1 (n=8, promedio de 121 mm³; intervalo: 100-147 mm³) se trataron con vehículo de IgG (10 mg/kg, por vía intravenosa (i.v.), cada tercer día (c.3.d.), Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 (10 mg/kg, iv, c.3.d.), o Ab contra LRP6-Propulsor 3 MOR06475 (10 mg/kg, iv, c.3.d.), y los tumores se calibraron cada tercer día. El Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 indujo regresiones tumorales de forma dependiente de la dosis (-55 %, p<0,05) (véase la Fig. 9).

Ejemplo 9: Actividades antitumorales de los anticuerpos anti-Propulsor 1 y Propulsor 3 de LRP6 en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt3.

40 45 Se evaluó la actividad antitumoral de los anticuerpos contra Propulsor 1 y 3 de LRP6 en el modelo de aloinjerto MMTV-Wnt3. Se implantaron fragmentos de tumor MMTV-Wnt3 por vía subcutánea (s.c.) en ratones atípicos hembra. 15 días después de la implantación, los ratones portadores de tumores MMTV-Wnt3 (n=6, promedio de 209 mm³; intervalo: 113-337 mm³) se trataron con vehículo de IgG (10 mg/kg, por vía intravenosa (i.v.), dos veces cada semana (2 c.s.), Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 (3 mg/kg, i.v., c.s.) o Ab contra LRP6-Propulsor 3 MOR06475 (10 mg/kg, i.v., 2 c.s.) y los tumores se calibraron dos veces por semana. El Ab contra LRP6-Propulsor 3 MOR06475 demostró actividad antitumoral (T/C=34 %, p<0,05) (Véase la Fig. 10).

50 Ejemplo 10: Evaluación de la capacidad de los anticuerpos anti-Propulsor 1 y 3 de LRP6 para inhibir Wnt3A in vivo

55 60 La capacidad de los anticuerpos contra LRP6-Propulsor 1 y 3 para inhibir la señalización de Wnt de clase Wnt3 in vivo se probó en un sistema de coimplante que consistía en células indicadoras PA1-STF coimplantadas con células L secretoras de Wnt3A. A ratones atípicos hembra se les implantaron por vía subcutánea 10 × 10e6 células PA1-STF y 0,5 × 10e6 células L-Wnt3A y se aleatorizaron en grupos de 5. 24 horas más tarde, los ratones recibieron una dosis intravenosa única de vehículo, Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 (10 mg/kg) o Ab contra LRP6-Propulsor 3 MOR06475 (10 mg/kg) y se les tomaron imágenes con Xenogen 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 168 horas después. MOR06475 fue capaz de inhibir la señalización inducida por Wnt3A durante al menos 72 horas, mientras que Mor08168 aumentó la señalización inducida por Wnt3A (Fig. 11).

Ejemplo 11: Cartografiado de epítopos de PD3/4 de LRP6 y su complejo de anticuerpos mediante HDx MS

65 Para identificar los sitios de unión de anticuerpos dentro de la región YWTD-EGF del Propulsor 3, se empleó espectrometría de masas (MS) de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx). Los dominios Propulsor 3-4 (PD3/4) de LRP6

5 tienen 12 cisteínas y 4 sitios de glucosilación unidos a N. Los 4 sitios de glucosilación unidos a N están posicionados en el dominio Propulsor 3 (631-932). Mediante HDx MS, se cartografió una cobertura cercana al 100 % (cantidad de proteína de la que fue posible obtener información estructural) en el dominio Propulsor 4, y una cobertura de aproximadamente el 70 % en el dominio Propulsor 3. Las regiones que rodean inmediatamente a los 4 sitios glucosilados permanecen sin detectar (Fig. 12A). En presencia de Fab 06745, se encontraron 2 péptidos débilmente protegidos con disolvente en Propulsor 3 (Phe⁶³⁶-Leu⁶⁴⁷, Tyr⁸⁴⁴-Glu⁸⁵⁶; Fig. 11A). Esto sugiere que los restos o una fracción de los restos responsables del epítopo están en los péptidos protegidos o espacialmente cerca. Basándose en la estructura cristalina de PD34 de LRP6, las regiones protegidas con disolvente corresponden a la superficie cóncava entre la pala 1 y 6 de Prop 3.

10 **Mutaciones que interrumpen la interacción de ScFv06475 con PD34 de LRP6**

15 Para confirmar que el borde de las palas 1 y 6 es responsable de la inhibición mediada por anticuerpos de la señalización de Wnt3a, se construyeron una serie de mutaciones de superficie de LRP6 (R638A, W767A, Y706A/E708A, W850A/S851A, R852/R853A y D874A/Y875A) que también cubrían aproximadamente la región implicada mediante HDx en la unión. Para garantizar que las proteínas mutantes se pliegan correctamente, se realizó un ensayo de fusión térmica de dispersión de luz estática diferencial (DSLS). El experimento de desnaturación por temperatura mostró que la temperatura de agregación, T_{agr} , (la temperatura a la que se desnaturiza el 50 % de la proteína) de las proteínas de tipo silvestre y mutantes fue similar. Por lo tanto, las mutaciones no tuvieron efecto sobre el plegamiento o la estabilidad de la proteína.

20 25 La capacidad de unión de la LRP6 mutante a scFv MOR06475 se determinó mediante ELISA. La mutación de restos (R638, W850/S851 y R852/R853) que están ubicados en péptidos que mostraron protección con disolvente en experimentos de HDx MS también mostró una disminución drástica en la unión de anticuerpos (véase la Fig. 12B). La mutación de restos (Y706/E708) que están ubicados en péptidos que no muestran protección con disolvente en HDx tampoco mostró cambios en la capacidad de unión de anticuerpos (Fig. 11B). Por lo tanto, los datos del ensayo de unión concuerdan bien con la interfaz de unión cartografiada mediante HDx MS, lo que sugiere que los restos R638, W850, S851, R852 y R853 participan directamente en el epítopo.

30 35 En conjunto, estos resultados muestran que diferentes proteínas Wnt requieren diferentes regiones Propulsor de LRP6 para la señalización. La clase Wnt 1 de proteínas Wnt (Wnt1, 1, 2, 6, 7A, 7B, 9,10A, 10B) requiere Propulsor 1 de LRP6 para la señalización de Wnt1, y pueden ser inhibidas por anticuerpos anti-LRP6 específicos de Propulsor 1. La clase Wnt 3A de proteínas Wnt (Wnt3 y Wnt3a) requiere Propulsor 3 de LRP6 para la señalización de Wnt3, y pueden ser inhibidas por anticuerpos anti-LRP6 específicos de Propulsor 3 (Fig. 13). Otro hallazgo inesperado fue la actividad potenciadora de Wnt de los anticuerpos en formato de IgG bivalente en presencia de ligandos Wnt. Todos los anticuerpos probados en formato de IgG mejoraron la señalización de Wnt1 o Wnt3A en el ensayo de gen indicador STF Luc. Curiosamente, la mayoría de los Fab que inhibieron Wnt1 y estaban inactivos en el ensayo de Wnt3A, todavía inhibieron Wnt1 como IgG, pero potenciaron la señalización de Wnt3A y viceversa. La mayoría de los Fab que inhibieron Wnt3A potenciaron la actividad de Wnt1 en forma de IgG. El efecto fue independiente del formato de IgG, ya que se probaron varios formatos (IgG1LALA, IgG2, IgG4, IgG4_Pro). Estos datos muestran que diferentes proteínas Wnt se unen a diferentes Propulsores de LRP6 para la señalización. La dimerización de LRP6 utilizando anticuerpos bivalentes de LRP6 no es suficiente para estimular la señalización de Wnt por sí misma, pero puede potenciar la señalización de Wnt iniciada por la otra clase de proteínas Wnt. Estos hallazgos demuestran que diferentes ligandos Wnt canónicos usan distintos sitios de unión en LRP6 y que todos los anticuerpos bivalentes mejoran la actividad de Wnt en formato de IgG en presencia de Fab Wnt no bloqueado (anticuerpos monocatenarios, unicuerpos). Las estructuras monovalentes de cualquier tipo como formato final eluden la potenciación de Wnt. Como alternativa, la construcción de una IgG biespecífica o una molécula similar a IgG que porta la actividad inhibidora tanto de Wnt1 como de Wnt3A elude la potenciación. Por lo tanto, las construcciones de anticuerpos contra LRP6 se pueden diseñar para controlar y "afinar" la vía de Wnt

40 45 ***Ejemplo 12: Generación de un anticuerpo contra LRP6 biparatópico***

50 55 Este ejemplo describe la producción y caracterización de anticuerpos biparatópicos IgG-scFv anti-LRP6. Se expresaron, se purificaron y se caracterizaron inicialmente diversos scFv anti-LRP6 que contenían diferentes orientaciones de dominio (por ejemplo, VH-VL o VL-VH) y diferentes longitudes de enlazador (por ejemplo, (Gly₄Ser)₃ o (Gly₄Ser)₄). Basándose en los resultados del estudio de scFv, se prepararon y evaluaron adicionalmente diferentes IgG-scFv anti-LRP6 biparatópicos. El scFv se puede colocar en diversas posiciones dentro de la IgG, incluyendo el extremo C de CH3 o CL y el extremo N de VH o VL. Además, se pueden usar diversos enlazadores para conectar el scFv a la IgG, incluyendo Gly₄Ser y (GlyGlySer)₂.

60 ***(a) Materiales y Métodos***

(i) Generación de scFv anti-LRP6

65 Se sintetizaron genes que codificaban para todas las variantes de scFv fueron sintetizados por Geneart. Se clonaron directamente fragmentos de ADN que codificaban scFv en ambas orientaciones (VH-VL y VL-VH, separados por dos enlazadores diferentes: (Gly₄Ser)₃ y (Gly₄Ser)₄, con secuencia de señal N-terminal y marcador 6xHis C-terminal) a partir

de vectores Geneart a través de NdeI/XbaI en el vector pFAB15-FkpA, las construcciones resultantes se denominaron pFab15-MOR06475-VH-(Gly₄Ser)₃-VL, pFab15-MOR06475-VH-(Gly₄Ser)₄-VL, pFab15-MOR06475-VL-(Gly₄Ser)₃-VH, pFab15-MOR06475-VL-(Gly₄Ser)₄-VH, pFab15-MOR08168-VH-(Gly₄Ser)₃-VL, pFab15-MOR08168-VH-(Gly₄Ser)₄-VL, pFab15-MOR08168-VL-(Gly₄Ser)₃-VH, pFab15-MOR08168-VL-(Gly₄Ser)₄-VH, pFab15-MOR08545-VH-(Gly₄Ser)₃-VL, pFab15-MOR08545-VH-(Gly₄Ser)₄-VL, pFab15-MOR08545-VL-(Gly₄Ser)₃-VH y pFab15-MOR08545-VL-(Gly₄Ser)₄-VH.

5 **(ii) Generación de IgG-scFv anti-LRP6 biparatópico**

10 MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv anti-LRP6

Se usó el vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA que contenía la secuencia VH optimizada por codones (sintetizada por Geneart) como fuente para la generación de la construcción biparatópica. Inicialmente, se introdujo el sitio Afel mediante mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene) en el extremo 3' de la secuencia que codifica hlgG1LALA (cebador n.º 1: 5'-agcgtgatgcacgaaggcgctgcacaaccactac-3' (SEQ ID NO: 213) y cebador n.º 2: 5'-gtagtgggtgcagcgcttcgtgcacgcgtc-3' (SEQ ID NO: 214)). Geneart sintetizó el gen que codificaba MOR06475scFv (orientación VL-VH, separados por (Gly₄Ser)₄-enlazador). Se usaron el cebador 5' que contenía el sitio Afel y la secuencia que codificaba (Gly₄Ser)₂-enlazador así como cebador 3' que contenía el sitio Ascl para la amplificación del gen MOR06475-scFv completo (cebador n.º 3):

20 5'-tgcgtcacaaggcgctgcacaaccactacaccagaaggcctgagcctgtccccggcaag ggccgcctccggcgaaaggcgatatc-3' (SEQ ID NO: 215) y cebador n.º 4: 5'-gagcggccgcccggcgcc tcatacgctggacactgtcaccagg-3' (SEQ ID NO: 216)). Despues, el producto de PCR se clonó a través de Afel/Ascl en el vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA dando como resultado la construcción final pRS5a MOR08168 hlgG1LALA-6475sc-fv. Geneart sintetizó el gen que codificaba el VL optimizado por codones de MOR08168. Se usaron el cebador 5' que contenía el sitio Agel y el cebador 3' que contenía el sitio HindIII para la amplificación de los genes MOR08168-VL completos (cebador n.º 5: (5'-gcttcggacaccaccgg gacatcgagctgaccaggc-3' SEQ ID NO: 217) y cebador n.º 6: 5'-cagcacggtaagct ggtgcctccggcaacaccag-3' (SEQ ID NO: 218)). Despues, el producto de PCR se clonó a través de Agel/HindIII en el vector pRS5a-hlambda dando como resultado la construcción final pRS5a MOR08168 hlambda.

30 anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv sin Lys (K)

Se usó el vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA-6475scFv (SEQ ID NO: 165) como ADN molde para la eliminación de la lisina C-terminal en CH3. Se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change XL (Stratagene) en combinación con los siguientes cebadores:

35 5'-ctgtccccggcgccggctccggc-3' (SEQ ID NO: 219)

5'-gccggagccgcccggggacag-3' (SEQ ID NO: 220)

40 La mutagénesis dirigida al sitio se realizó de acuerdo con el protocolo de Stratagene; la nueva construcción resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR08168opt 6475 scFv K.

45 Se usó el vector pRS5a MOR08168 hlambda (generación descrita para anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv) que contenía una secuencia de VL optimizado por codones (sintetizada por Geneart) sin ninguna modificación para la expresión de LC.

anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv_AspPro a AspAla (DP a DA)

50 Se usó el vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA-6475scFv (SEQ ID NO: 165) como ADN molde para la sustitución de DP por DA en VH de scFv. Se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change XL (Stratagene) en combinación con los siguientes cebadores:

55 5'-ccatgaccaacatggacgcgtggacaccgccacc-3' (SEQ ID NO: 221)

5'-ggtggcggtgtccacggcgatgtggatgg-3' (SEQ ID NO: 222)

La mutagénesis dirigida al sitio se realizó de acuerdo con el protocolo de Stratagene; la nueva construcción resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR08168opt 6475 scFv DP a DA.

60 Se usó el vector pRS5a MOR08168 hlambda (generación descrita para anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv) que contenía una secuencia de VL optimizado por codones (sintetizada por Geneart) sin ninguna modificación para la expresión de LC.

anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv_AspPro a ThrAla (DP a TA)

Se usó el vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA-6475scFv (SEQ ID NO: 165) como ADN molde para la sustitución de DP por TA en VH de scFv. Se usó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change XL (Stratagene) en combinación con los siguientes cebadores:

5 5'-caccatgaccaacatgaccgcccgtggacaccgcccacc-3' (SEQ ID NO: 223)
 5'-ggggcggtgtccacggcggtcatgttgtcatggtg-3' (SEQ ID NO: 224)

10 La mutagénesis dirigida al sitio se realizó de acuerdo con el protocolo de Stratagene; la nueva construcción resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR08168opt 6475 scFv DP a TA.

15 Se usó el vector pRS5a MOR08168 hlambda (generación descrita para anti-LRP6_MOR08168 hlgG1LALA_6475scFv) que contenía una secuencia de VL optimizado por codones (sintetizada por Geneart) sin ninguna modificación para la expresión de LC.

15 anti-LRP6_MORQ8168hlgG1_LALA_6475scFv_en_ValLeu (VL)

20 Se usó el vector pRS5a MOR08168 hlgG1LALA que contenía la secuencia de VH optimizado por codones (sintetizada por Geneart) sin ninguna modificación para la expresión de HC.

25 Se sintetizó el gen que codificaba MOR06475scFv y MOR08168-VL optimizados por codones mediante DNA2.0 y se clonó a través de Agel/HindIII en el vector pRS5a hlambda MOR08168. El vector resultante se denominó pRS5a hlambda MOR08168 6475scFv en VL.

30 anti-LRP6_MORQ6475hlgG1_LALA_8168scfv (VH-3-VL), donde 3 representa un enlazador de aminoácidos (Gly₄Ser)₃ entre las cadenas VH y VL.

Se amplificó MOR06475-VH a partir del vector pM2 hlgG1LALA MOR06475 con los siguientes cebadores:

30 5'-gttcctggtcgcgatcctggaaggggtgcactgccagggtcaattgaaagaaagcg-3' (SEQ ID NO: 225)
 5'-cttggaggctgagctaac-3' (SEQ ID NO: 226)

35 El producto de PCR se clonó a través de NruI/BpI en el vector pRS5a hlgG1LALA MOR08168 6475scFv, el vector resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR06475 6475scFv.

40 Se amplificó MOR08168scFv a partir del vector pRS5a MOR08168 scFv (VH-3-VL) con los siguientes cebadores:

45 5'-gcacgaagcgctgcacaaccactacacccagaagagcctgagcctgtccccggcaagggcggtccggcggaagc
 caggttcaattgggtgaaagc-3' (SEQ ID NO: 227)

50 5'-ggccctctagaggcgcccccggcgccctcatcacagaacggtaagctgggcc-3' (SEQ ID NO: 228). El producto de PCR se clonó a través de Afel/XbaI en el vector pRS5a hlgG1LALA MOR06475 6475scFv, el vector final resultante se denominó pRS5a hlgG1LALA MOR06475 8168scFv (VH-3-VL).

55 Se amplificó MOR06475-VL a partir del vector pM2 hkappa MOR06475 con los siguientes cebadores:

55 5'-gacaccaccgggtatatcgctgaccagac-3' (SEQ ID NO: 229)
 5'-gcagccaccgtacgttaattcaac-3' (SEQ ID NO: 230)

60 El producto de PCR se clonó en el vector pRS5a hkappa MOR06654 a través de Agel/BsiWI, el vector resultante se denominó pRS5a hkappa MOR06475.

65 anti-LRP6_MOR06475hlgG1_LALA_8168scfv (VH-4-VL), donde 4 representa un enlazador de aminoácidos (Gly₄Ser)₄ entre las cadenas VH y VL.

Se amplificó MOR06475-VH a partir del vector pM2 hlgG1LALA MOR06475 con los siguientes cebadores:

65 5'-gttcctggtcgcgatcctggaaggggtgcactgccagggtcaattgaaagaaagcg-3' (SEQ ID NO: 231)
 5'-cttggaggctgagctaac-3' (SEQ ID NO: 232)

El producto de PCR se clonó a través de NruI/BpI en el vector pRS5a hlgGILALA MOR08168 6475scFv, el vector resultante se denominó pRS5a hlgGILALA MOR06475 6475scFv.

Se amplificó MOR08168scFv a partir del vector pRS5a MOR08168 scFv (VH-4-VL) con los siguientes cebadores:

5' 5'-gcacgaagcgctgcacaaccactacacccagaagagcctgagcctgtccccggcaagggcggtccggcggaagc
cagggtcaattgggtgaaagc-3' (SEQ ID NO: 227)

5'-gggcctctagaggccggccggcgcgcctcatcacagaacgtaagctgggcc-3' (SEQ ID NO: 228). Se amplificó MOR06475-VL a partir del vector pM2 hkappa MOR06475 con los siguientes cebadores:

10 5'-gacaccaccggtagatcgtgctgaccagagc-3' (SEQ ID NO: 229)

5'-gcagccaccgtacgttaattcaac-3' (SEQ ID NO: 230)

15 El producto de PCR se clonó en el vector pRS5a hkappa MOR06654 a través de AgeI/BsiWI, el vector resultante se denominó pRS5a hkappa MOR06475.

(iii) Expresión de anti-LRP6-scFv

20 Se transformó la cepa W3110 de *E. coli* electrocompetente con ADN plasmídico. Se inocularon precultivos (150 ml de medio LB que contenía 12,5 µg de tetraciclina/ml y glucosa al 0,4 %, en un matraz de 500 ml) con una única colonia y se incubaron durante la noche a 37 °C/230 rpm. Se inocularon cultivos de expresión (6x 500 ml de medio SB que contenía 12,5 µg de tetraciclina/ml, en un matraz de 2 l) con precultivos hasta una DO600 de 0,1 y se incubaron a 25 °C/230 rpm hasta una DO600 de aprox. 0,6. Despues se añadió IPTG (Roche) hasta una concentración final de 0,4 mM y los cultivos 25 se incubaron durante la noche a 25 °C/230 rpm. Las células se recogieron por centrifugación (20 min a 4600 rpm, 4 °C) y los sedimentos celulares se congelaron a -20 °C.

(iv) Purificación de anti-LRP6-scFv

30 Se suspendieron sedimentos de 3 l expresiones en 50 ml de tampón de lisis (NaH2PO4 20 mM, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4; 1 comprimido Completo sin EDTA por 50 ml de tampón, Roche n.º 11836170001, MgSO4 10 mM y Benzonase). Las suspensiones celulares se trataron con French Press (2x a 100 MPa (1000 bar)) y se centrifugaron durante 30 min a 16000xg, 4 °C. Se equilibró 1 ml de columna HisTrap HP (GE Helthcare) con 10 ml de tampón de lisis. Los sobrenadantes se filtraron a través de Stericup Filter (Millipore) y se cargaron en una columna equilibrada (1 ml/min). 35 La columna se lavó con tampón de lisis (20 ml) y la proteína unida se eluyó con 3 ml de tampón de elución (como tampón de lisis pero con imidazol 250 mM). El eluato se cargó directamente en una columna Superdex75 (HiLoad 16/60, GE-Healthcare), equilibrada con 130 ml de PBS (1 ml/min). El análisis se realizó con PBS a 1 ml/min, el eluato se recogió en fracciones de 1,5 ml y se analizó en Bis-Tris-Gel al 10 % (NuPage, Invitrogen). Se agruparon las fracciones adecuadas, se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenaron a 4 °C. Todas las proteínas purificadas se analizaron mediante 40 LC-MS (con muestras oxidadas y reducidas) y mediante SEC-MALS (análisis de agregación).

(v) Expresión transitoria de IgG-scFv anti-LRP6 biparatópico

45 Se cultivaron 3,2 l de células HEK293-6E en medio M11V3: Lote n.º D07668B en un BioWave20 en Rocks 10 rpm, ángulo 7°, aireación 25 l/h, Oz 25 %, CO2 6 % a una densidad de 2E6 células viables/ml. Las células se transfecaron transitoriamente con 1,8 l de ADN:PEI-MIX (plásmido: 5 mg de pRS5a MOR08168 hlgG1 LALA-6475sc-Fv + 5 mg de pRS5a MOR08168 hlambda + 20 mg de PEI). 6 horas después de la transfección se añadieron al cultivo 5 l de medio de alimentación (Novartis) con Yeastolate: Lote n.º 09-021. Despues, las células se cultivaron adicionalmente en Rocks 24 rpm, Ángulo: 7°, Aireación 25 l/h, Oz 25 %, CO2 0-6 %. Siete días después de la transfección, las células se retiraron por filtración de flujo cruzado usando filtros Fresenius de 0,2 µm. Posteriormente, el material exento de células se concentró a 1,75 l con filtración de flujo cruzado utilizando un filtro de corte de 10 kDa de Fresenius. Despues de la concentración, el concentrado se filtró en condiciones estériles a través de un filtro stericup (0,22 µm). El sobrenadante estéril se almacenó a 4 °C. Todas las variantes anti-LRP6-scFv biparatópicas descritas se expresaron de manera similar.

(vi) Purificación de IgG-scFv anti-LRP6 biparatópico

55 La purificación de la IgG biparatópica se realizó en un sistema de cromatografía ÄKTA 100 explorer Air a 6 °C en un gabinete de refrigeración, utilizando una columna XK16/20 recién desinfectada (NaOH 0,2 M/isopropanol al 30 %) con 25 ml de resina MabSelect SuRe autoempaquetada (todo de GE Healthcare). Todos los caudales fueron de 3,5 ml/min, excepto para la carga, a un límite de presión de 0,5 MPa (5 bar). La columna se equilibró con 3 VC de PBS (hecho de 10x, Gibco), despues se cargó el sobrenadante de fermentación filtrado estéril y concentrado (1,35 l) a 2,0 ml/min durante la noche. La columna se lavó con 8 VC de PBS. Despues, la IgG se eluyó con un gradiente de pH, comenzando con citrato 50 mM, NaCl 70 mM, pH 4,5, descendiendo linealmente en 12 VC hasta citrato 50 mM, NaCl 70 mM, pH 2,5,

seguido de un paso constante de 2 VC del mismo tampón de pH 2,5. La IgG biparatópica eluyó durante el gradiente en un único pico simétrico de aproximadamente pH 3,8 y se recogió en fracciones de 4 ml. Las fracciones se agruparon en tres grupos, pendiente izquierda, pico principal y pendiente derecha. Los conjuntos se titularon inmediatamente a pH 7,0, lentamente y con agitación, utilizando Tris 2 M, pH 9,0. Los grupos se esterilizaron por filtración (Millipore Steriflip, 0,22 µm), se midió la DO 280 nm en un espectrómetro Lambda 35 (Perkin Elmer) y se calculó la concentración de proteína basándose en los datos de secuencia. Los grupos se analizaron por separado para determinar la agregación (SEC-MALS) y la pureza (SDS-PAGE y MS) y, basándose en los resultados, sólo se utilizó el grupo central (35 ml a 2,55 mg/ml de proteína). Todas las variantes anti-LRP6-scFv biparatópicas descritas se purificaron de manera similar.

10 **(vii) Análisis de reactividad cruzada mediante micromatrices de proteínas**

Las micromatrices eran chips de proteína de alta densidad personalizados fabricados por Protagen AG (UNIchip® AV-VAR-EP) y contenía 384 proteínas humanas predefinidas y purificadas impresas por cuadruplicado en un portaobjetos de vidrio recubierto de nitrocelulosa. Las proteínas se clasifican como proteínas extracelulares o secretoras basándose en la ontología génica y se expresan como una proteína de fusión de marcador His N-terminal utilizando *Escherichia coli*, y se purificaron utilizando cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC). La hibridación del anticuerpo se realizó utilizando la Estación de Hibridación TECAN HS400Pro, programada con un protocolo desarrollado por Protagen AG. Los anticuerpos primarios se probaron a una concentración final de 5 µg/ml. El anticuerpo marcado secundario, un F(ab')₂ anti-hsIgG de cabra AffiniPure conjugado con Cy5, específico de fragmento (Jackson Immunoresearch, código n.º 109-175-097), se utilizó a una concentración final de 7,5 µg/ml. La obtención de imágenes de micromatrices se realizó utilizando un escáner de micromatrices de fluorescencia GenePix Professional 4200A (Axon Instruments, CA) equipado con un láser rojo (635 nm). El análisis de imágenes se realizó utilizando el software GenePix Pro v6.0. El análisis de datos se realizó utilizando la Herramienta de análisis de datos Protagen UNIchip® v1.8. Para determinar la reactividad cruzada inespecífica derivada de la unión del anticuerpo secundario directamente a los antígenos impresos, el anticuerpo secundario también se incubó en el UNIchip® sin el uso del anticuerpo primario. Para la determinación del nivel de reactividad cruzada normalizada al antígeno correspondiente, el valor de intensidad de la señal fluorescente a una concentración saturada (20 fmol/mancha) se fijó en 100 %. Todas las intensidades de señales para una proteína determinada, que superaban el 4 % de la señal del antígeno, se consideraron aciertos positivos, siempre que no se encontraran también en el control respectivo con solamente el anticuerpo secundario marcado.

30 **(viii) Estabilidad conformacional medida mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La DSC se midió utilizando un microcalorímetro de células capilares VP-DSC de Microcal, equipado con un automuestreador de placa de pocillos profundos. Los datos se analizaron con el software Origin 7.5. Las muestras (400 µl) se añadieron a placas de pocillos profundos de 2 ml de Nunc™. Las muestras en PBS pH 7,0 se analizaron a 1 mg/ml. La muestra de referencia contenía 400 µl del mismo tampón que el analito, habitualmente PBS. El cambio de calor asociado a la desnaturización térmica se midió entre 20 °C y 100 °C, con una velocidad de calentamiento de 3,3 °C min⁻¹. La temperatura de fusión aparente (Tm), correspondió al punto medio de transición térmica, donde se despliega el 50 % del analito.

40 **(ix) Estudios de estabilidad de suero**

Se disolvieron proteínas purificadas en 35 µl de suero de rata o de ratón (Gene Tex) dando como resultado una concentración final de 0,3 mg/ml. Las muestras se incubaron a 37 °C en un incubador de placas. Se tomaron 4 µl de cada muestra en diferentes momentos, se añadieron 10 µl de tampón de muestra (4x, NuPage, Invitrogen) y 26 µl de agua y las muestras se congelaron a -20 °C. Se cargaron 12 µl de cada muestra en Bis-Tris-Gel al 12 % (NuPage, Invitrogen), se realizó una electroforesis a 200 V durante 35 min. Se realizó una transferencia de proteínas a la membrana de PVDF (Invitrogen) en tampón de borato (borato 50 mM, Tris 50 mM) a 30 V durante 1 h. Las membranas se lavaron brevemente en TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween80 al 0,1 %) y después se incubaron durante 2 h a TA/agitador en TBST que contenía leche en polvo al 5 %. Las membranas se lavaron brevemente en TBST y después se incubaron durante 1 h a TA/agitador en TBST que contenía anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugada con POD, específico de fragmento Fab (Dianova), diluido 1:10,000 o anti-His POD (Roche) diluido 1:500. Las membranas se lavaron tres veces durante 5 min a TA/agitador en TBST. La detección de señales se realizó utilizando sustrato BM Blue POD (Roche) o ECL/ECL Plus (GE-Healthcare).

55 **(b) Resultados**

(i) Expresión, purificación y caracterización de scFv-anti-LRP6

60 Todos los scFv se expresaron satisfactoriamente en *E. coli* W3110 y se purificó mediante cromatografía de afinidad seguida de cromatografía de exclusión por tamaño. Se confirmó el tamaño esperado (MOR06475 (Gly₄Ser)₃)/(Gly₄Ser)₄: 26,74 y 27,06 kDa respectivamente, MOR08168 (Gly₄Ser)₃)/(Gly₄Ser)₄: 26,5 y 26,85 kDa respectivamente, MOR08545 (Gly₄Ser)₃)/(Gly₄Ser)₄: 25,99 y 26,31 kDa respectivamente para todas las muestras purificadas mediante análisis por LC-MS realizado con muestras reducidas y oxidadas y mediante SDS PAGE. Se obtuvieron purezas > 95 %. La Fig. 14 muestra los resultados del análisis por SDS-PAGE en el que se cargaron 1,5 µg de cada proteína purificada en gel Bis-

5 Tris al 10 % (NuPage, Invitrogen) M: Marcador See Blue Plus2 (Invitrogen); (1): MOR06475-VH-(Gly₄Ser)₄-VL; (2) MOR06475-VL-(Gly₄Ser)₄-VH; (3) MOR08168-VH-(Gly₄Ser)₄-VL; (4) MOR08168-VL-(Gly₄Ser)₄-VH; (5) MOR08545-VH-(Gly₄Ser)₄-VL; (6) MOR08545-VL-(Gly₄Ser)₄-VH (7) MOR06475-VH-(Gly₄Ser)₃-VL; (8) MOR06475-VL-(Gly₄Ser)₃-VH (9) MOR08168-VH-(Gly₄Ser)₃-VL; (10) MOR08168-VL-(Gly₄Ser)₃-VH; (11) MOR08545-VH-(Gly₄Ser)₃-VL; (12) MOR08545-VL-(Gly₄Ser)₃-VH.

10 La estabilidad térmica se comparó para todos los ScFv mediante DSC. La temperatura de fusión (T_m) fue significativamente mayor para las variantes de MOR06475. La T_m más alta (64,7 °C) se observó para MOR06475-VL-(Gly₄Ser)₄-VH, por lo tanto, se cree que esta molécula es potencialmente más estable que las otras construcciones producidas.

15 La actividad de las construcciones scFv y Fab MOR06475, MOR08168 y MOR08545, así como varios formatos biparatópicos, se evaluó en el ensayo HEK293 STF (Fig. 17 y 18). En conjunto, los datos muestran que IgG contra Propulsor 1 (MOR08168) inhibe los ligandos de Propulsor 1 tales como Wnt1, mientras que potencia los ligandos de Propulsor 3 tales como Wnt3 en el ensayo de STF. scFv6475 contra Propulsor 3 inhibe los ligandos de Propulsor 3 tales como Wnt3, mientras que no tiene actividad sobre los ligandos de Propulsor 1 tales como Wnt1. Además, los anticuerpos biparatópicos MOR08168/6475 tienen actividad contra los ligandos de Propulsor 1 y Propulsor 3, y no tienen actividad potenciadora en ninguna de las concentraciones aplicadas en el ensayo HEK293 Wnt STF.

20 **(ii) Expresión, purificación y caracterización de IgG-scFv anti-LPP6 biparatópico**

En la Fig. 15 se presenta una representación esquemática del formato biparatópico Ig-scFv anti-LRP6 producido en este estudio. La Fig. 15A representa un scFv scFv unido al extremo C de una IgG; 15B scFv scFv unido al extremo N de un Fc; 15C representa un scFv scFv unido al extremo C de un Fc; y 15D representa un scFv scFv unido a los extremos N y 25 C de un Fc.

30 El anticuerpo biparatópico en el experimento actual es la IgG completa biparatópica con scFv fusionado al extremo C de hIgG1 LALA CH3. En este estudio particular, el scFv estaba separado por un (GlyGlySer)₂-enlazador de la IgG completa. El scFv consiste en una orientación VL-VH con un enlazador (Gly₄Ser)₄.

35 Se expresaron transitoriamente IgG-scFv anti-LRP6 biparatópicos en células HEK293-6E y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con elución en gradiente de pH 4,5 a 2,5. El tamaño esperado de 197,4 kDa se determinó mediante análisis por LC-MS y SDS-PAGE con una pureza superior al 97 %. La agregación, determinada mediante SEC MALS, fue inferior al 5 %. La Fig. 16 es un análisis por SDS-PAGE de IgG-scFv anti-LRP biparatópico purificado. Las 40 muestras se cargaron en gel Bis-Tris al 12 % (NuPage, Invitrogen). Marcador: Invitrogen Mark12; (1): No reducido; (2): Reducido

45 IgG scFv anti-LRP6 biparatópico e IgG anti-LRP6 parental se unieron a FcRn humano a pH 6,0 con una K_d de 0,021 y 0,023 μM respectivamente, determinado por Biacore. Ambos formatos demostraron un nivel bajo de unión a FcRn humano a pH 7,4, por lo que se espera que este BpAb (del inglés *Biparatopic Ab*, Ab biparatópico) se comporte como una IgG convencional *in vivo* (Características FC similares a IgG1) (Véase la Fig. 19).

50 El scFv IgG anti-LRP6 biparatópico fue estable tanto en suero de ratón como de rata a 37 °C, se probó hasta 336 horas (datos no mostrados) y no mostró unión >4 % cuando se evaluó en un Protagen Unichip personalizado que contenía 384 proteínas secretadas o extracelulares purificadas (datos no mostrados).

55 **(c) Análisis**

50 Inicialmente se caracterizaron diversos scFv anti-LRP6 para permitir la optimización del anticuerpo biparatópico final. Se expresaron ScFv en ambas orientaciones y con dos longitudes de enlazador diferentes en *E. coli*. Se expresaron MOR06475, 8168 y 8545 anti-LRP6 como scFv VH-VL y VL-VH con un enlazador (Gly₄Ser)₃ y (Gly₄Ser)₄. Todas las variantes de MOR06475 y MOR08168 se expresaron y purificaron satisfactoriamente con un nivel bajo (<5 %) de agregados. Se obtuvo proteína correctamente procesada con los tamaños esperados. Los datos de estabilidad térmica mostraron que el formato scFv más estable fue MOR06475-VL-(Gly₄Ser)₄-VH con una T_m de 64,7 °C. Todos los formatos MOR08168 scFv probados mostraron una estabilidad térmica significativamente reducida con una T_m de 50-52 °C.

60 IgG anti-LRP6 biparatópico con scFv en CH3 y VL, así como variantes modificadas (sin Lys C-terminal (K) en CH3, con sustituciones AspPro (DP) a AspAla (DA) y AspPro (DP) a ThrAla (TA) en VH de scFv) se expresaron y purificaron satisfactoriamente con un nivel bajo (<5 %) de agregados del cultivo celular. Se determinaron los tamaños esperados de aproximadamente 197-198 kDa. Las construcciones anti-LRP6 MOR08168_hlgG1LALA_6475scFv y anti-LRP6 MOR08168hlgG1 LALA 6475scFv en VL, así como las construcciones mutadas (supresión de Lys C-terminal (K) en CH3 y las sustituciones AspPro (DP) a AspAla (DA) y AspAla (DP) a ThrAla (TA)) consistían en un scFv con orientación VL-VH y estaban separados por un enlazador (Gly₄Ser)₄. Se usó un enlazador (GlyGlySer)₂ para unir el scFv al dominio CH3 de hIgG1 LALA y a VL de hlambda, respectivamente. Sin embargo, como se ha analizado anteriormente, el scFv también 65 puede consistir en VH-VL separados por enlazadores alternativos, además, el scFv también se puede unir utilizando

enlazadores alternativos a otras posiciones dentro de la IgG, incluido el extremo C de CL y el extremo N de VH. Las construcciones con MOR08168scFv consistieron en un scFv con orientación VH-VL y estaban separadas por un enlazador (Gly₄Ser)₃ y (Gly₄Ser)₄. Se usó un enlazador (GlyGlySer)₂ para unir el scFv al dominio CH3 de hIgG1 LALA.

5 El MOR08168 hIgG1LALA 6475scFv anti-LRP6 biparatópico fue estable en suero (probado hasta 336 horas). El biparatópico se unió como se esperaba a FcRn humano a pH 6,0, se observó un nivel bajo de unión a pH 7,4. El anticuerpo parental se unió con una cinética similar.

10 **Ejemplo 13: Evaluación *in vivo* del anticuerpo biparatópico anti-LRP6**

MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv

La capacidad del anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 para inhibir la señalización de Wnt de clase Wnt3 *in vivo* se probó en un sistema de coimplante que consistía en células indicadoras PA1-STF coimplantadas con células L secretoras de Wnt3A. A ratones atípicos hembra se les implantaron por vía subcutánea 10x10e6 células PA1-STF y 0,5x10e6 células L-Wnt3A y se aleatorizaron en grupos de 5. 24 horas más tarde, los ratones recibieron una dosis única intravenosa de vehículo, Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 (10 mg/kg), Ab contra LRP6-Propulsor 3 MOR06475 (10 mg/kg) o el anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 (1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg) y se tomaron imágenes con Xenogen 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 168 horas más tarde. El anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 mostró una inhibición relacionada con la dosis de la señalización inducida por Wnt3A, mostrando 1 mg/kg una inhibición máxima a las 24 horas, volviendo al valor basal a las 48 horas, y mostrando 3 mg/kg y 10 mg/kg una inhibición sostenida durante al menos 72 horas. El Ab contra LRP6-Propulsor 3 MOR06475 dosificado a 10 mg/kg fue capaz de inhibir la señalización inducida por Wnt3a durante al menos 72 horas, mientras que el Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 dosificado a 10 mg/kg aumentó la señalización inducida por Wnt3a (Fig. 20).

Para medir el efecto del anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6, con respecto a Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168, sobre la señalización de Wnt en tumores MMTV-Wnt1, se administraron dosis i.v. a ratones implantados con MMTV-Wnt1 con una dosis única de 5 mg/kg del anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 o una dosis única de 5 mg/kg del anticuerpo contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168. Las concentraciones séricas del anticuerpo biparatópico y del anticuerpo contra propulsor 1, así como la expresión del ARNm del gen diana Axina2 de la catenina β , se analizaron durante un período de dos semanas. La semivida de la fase β terminal del anticuerpo biparatópico fue de aproximadamente 48 horas, mientras que la del anticuerpo contra LRP6 fue de aproximadamente 72 horas. Se observó una disminución significativa de la expresión del ARNm de Axina2 en tumores obtenidos de ratones que recibieron dosis del anticuerpo biparatópico o del anticuerpo contra Propulsor 1, y la expresión de Axina2 se recuperó gradualmente sin observarse diferencias significativas entre el anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 y el anticuerpo contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 (Fig. 21).

40 Se evaluó la actividad antitumoral del anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 en el modelo de aloinjerto de MMTV-Wnt1. Se implantaron fragmentos de tumor MMTV-Wnt1 por vía subcutánea (s.c.) en ratones atípicos hembra. 7 días después de la implantación, los ratones portadores de tumores MMTV-Wnt1 (n=8, promedio de 137 mm³; intervalo: 81-272 mm³) se trataron con vehículo de IgG, Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 (3 mg/kg, i.v., c.s.) o anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 (3 mg/kg, i.v., 2 c.s.) y los tumores se calibraron dos veces por semana. Tanto el Ab contra LRP6-Propulsor 1 MOR08168 como el anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 indujeron regresiones tumorales (-93 %, p<0,05 y -91 %, p<0,05 respectivamente) (véase la Fig. 22). Se evaluó la dependencia de la dosis del anticuerpo biparatópico MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 y se representa en la Fig. 23.

50 La inhibición de la señalización de Wnt en células de cáncer colorrectal por el ARNip de catenina β o el TCF-4 negativo dominante provoca una rápida detención del ciclo celular e induce un programa de diferenciación intestinal (van der Wetering *et al.* (2002), *Cell*, 111, 241-250; van der Wetering *et al.* (2003), *EMBO Reports*, 4, 609-615). Para determinar si la inhibición de la señalización de Wnt por anticuerpos contra LRP6 antagonistas tiene consecuencias similares en tumores mamarios MMTV-Wnt1 murinos, se examinó la diferenciación secretora mediante tinción con Aceite Rojo O para lípidos, un componente principal de la leche. Se trataron ratones portadores de tumores MMTV-Wnt1 con una dosis única de PBS (control) o 5 mg/kg de MOR08168hIgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 24 h, 72 h o 5 días después del tratamiento, se cortaron secciones de aloinjertos de tumores murinos congelados a 5 μ m de espesor. Los portaobjetos se secaron al aire durante 30-60 minutos a temperatura ambiente y después se fijaron en formol al 10 % helado durante 5-10 minutos. Los portaobjetos se aclararon inmediatamente tres veces en dH₂O. La tinción con Aceite Rojo O se realizó utilizando un kit de tinción con Aceite Rojo O (Poly Scientific R&D, n.º de Cat. k043). Los portaobjetos se escanearon con el escáner ScanScope CS/GL (Aperio Technologies) y las secciones de tejido se analizaron con el software ImageScope v10.2.1.2315 (Aperio Technologies), utilizando el algoritmo de deconvolución de color IHC con un recuento de píxeles positivos. Se muestran imágenes representativas de la tinción con Aceite Rojo O en la Fig. 24A y la cuantificación en la Fig. 24B. El gráfico representa valores de media \pm ETM. n=4 en el grupo de 72 horas, n=3 en el grupo de 24 horas, n=2 en el grupo de 5 días y n=1 para PBS (control) y demuestran un aumento en la tinción con Aceite Rojo O durante el curso temporal del experimento. Juntos, estos resultados sugieren que la inhibición de la señalización de Wnt en células

tumorales mamarias puede conducir a la detención del ciclo celular y a la inducción de un programa de diferenciación secretora.

5 La actividad antitumoral del anticuerpo biparatópico MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 se evaluó adicionalmente en el modelo de xenoinjerto de mama MDA-MB-231. Se implantaron subcutáneamente (s.c.) 5x10⁶ células MDA-MB-231 en matrigel al 50 % en ratones atípicos hembra. 31 días después de la implantación, los ratones portadores de tumores MDA-MB-231 (n=7, promedio de 165 mm³; intervalo 99-238 mm³) se trataron con vehículo o anticuerpo biparatópico MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 (3 mg/kg, i.v., c.s.) y los tumores se calibraron dos veces por semana. El anticuerpo biparatópico MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 dosificado a 3 mg/kg semanalmente, 10 retrasó significativamente el crecimiento tumoral (T/C=23 %, p<0,05) (Véase la Fig. 25).

Ejemplo 14: Evaluación *in vivo* de anticuerpos biparatópicos adicionales en el modelo de MMTV-Wnt1

15 Como se describe en el Ejemplo 10, se generaron anticuerpos biparatópicos inversos anti-LRP6 adicionales que consistían en los dominios anticuerpo contra propulsor 3 MOR06475 y scfv contra propulsor 1 MOR08168. La capacidad de estos anticuerpos biparatópicos (MOR06475hlgG1_LALA_8168scfv_(VH-3-VL) y MOR06475hlgG1_LALA_8168scfv_(VH-4-VL) para inhibir la señalización de Wnt1 *in vivo*, con respecto a MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv, se determinó en el modelo de MMTV-Wnt1. A los ratones implantados con tumores MMTV-Wnt1 se les administró i.v. una dosis única de 5 mg/kg de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. Se analizaron concentraciones séricas 20 de cada anticuerpo (Mor08168higg1lala 6475 SCFV, MOR06475HIGG1_LALA_8168SCFV_(VH-3-VL) y MOR06475HIGG1_LALA_8168SCFV_(VH-4-VL), así como la expresión de ARNm del gen diana de β catenina Axina2 durante un período de 5 días (los puntos temporales evaluados fueron 0, 2, 7, 24, 72 y 120 h). Ambos anticuerpos biparatópicos inversos mostraron una disminución significativa en la expresión de ARNm de axina2 en el mismo grado 25 máximo que MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv. Sin embargo, la duración de la disminución de la expresión del ARNm de axina2 fue más corta que la observada con MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv, y la señal volvió al valor basal en el punto temporal de 24 h para ambas moléculas biparatópicas inversas. Esto fue coherente con la disminución de la exposición de 30 estas moléculas, con niveles en suero que cayeron por debajo de 5 μ g/ml a las 24 h en comparación con 120 h para MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv.

Ejemplo 15: Afinidad de unión de un anticuerpo biparatópico a PD1/2 y PD 3/4 de LRP6 recombinante

35 Se evaluaron las afinidades de unión de MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv, MOR08168 y MOR6475 anti-LRP6 a los dominios Propulsor 1-2 de LRP6 (PD1/2, restos de aminoácidos 19 a 629 del N.º de acceso NP002327) y los dominios Propulsor 3-4 de LRP6 (PD3/4, aminoácidos 631-1246 del N.º de acceso NP002327) mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) utilizando un Biacore T-100 (GE Healthcare). Para las determinaciones de afinidad, se diluyó el anticuerpo específico anti-IgG Fcy humana (N.º 109-005-098, Jackson Immunology) en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 5,0) y después se inmovilizó en el chip CM4 (GE Healthcare, BR-1005-34) para todas las células de 4 flujos a una densidad de ~2000 UR utilizando química de acoplamiento de amina convencional. La superficie de carboximetil dextrano se activó con una inyección de 7 min de una relación 1:1 de EDC 0,4 M (clorhidrato de 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiímidas) y NHS 0,1 M (A-hidroxisuccinimida). Después, los ésteres reactivos en exceso se bloquearon con etanolamina 1 M. Se preparó MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 a 10 μ g/ml en tampón HBS-EP (GE Healthcare) y se capturó en una célula de flujo separada del chip CM4 a una densidad de ~70 UR a un caudal de 10 μ l/min. Se prepararon PD1/2 y PD3/4 como series de concentraciones dobles a partir de 50 nM y se inyectaron a 30 μ l/min durante 1 min. Esto permitió una fase de disociación de 40 min sobre la superficie capturada con 40 MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 y la superficie de control sin ligandos capturados. Después, las superficies 45 se regeneraron dos veces con glicina 10 mM (pH 2,2). Para el análisis de unión doble de MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 a PD1/2 y PD3/4, se capturó MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 en el chip CM4 inmovilizado con anticuerpo específico Fcy anti-IgG humana. Después, se hizo fluir sobre la superficie PD3/4 a una concentración de saturación de 100 nM a un caudal de 30 μ l/min durante 30 min. Inmediatamente después del PD3/4 se inyectó una concentración de saturación de PD1/2 100 nM. Las constantes de disociación (K_D), asociación ($K_{activación}$) y disociación ($K_{desactivación}$) se calcularon a partir de las curvas de unión corregidas restadas del valor basal utilizando el software BIAe Evaluation (GE Healthcare).

55 La unión de MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 (anticuerpo biparatópico) a PD1/2 y PD3/4 se comparó con la de MOR08168 (anticuerpo contra propulsor 1) y MOR6475 (anticuerpo contra propulsor 3). La Fig. 26A muestra las afinidades de las moléculas por los correspondientes dominios del receptor LRP6, PD1/2 y PD3/4. La K_D determinada de MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 para PD1/2 y PD3/4 fue similar a la de MOR08168 a PD1/2 y MOR6475 a PD3/4, respectivamente. La Fig. 26B muestra las fases de asociación y disociación de la unión de MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 a cada una de las proteínas. La velocidad de desactivación para la unión de MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 a PD1/2 es más lenta que la de PD3/4. Estudios adicionales en los que se inyectaron PD1/2 y PD3/4 secuencialmente indicaron que, como se esperaba, MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv anti-LRP6 fue capaz de unirse a 60 ambas construcciones de dominio propulsor (Fig. 26C).

Ejemplo 16: Mutaciones de scFv para mejorar la termoestabilidad de scFv08168 y scFv06475

Este ejemplo describe mutaciones realizadas en los scFv de los anticuerpos contra propulsor 1 y propulsor 3 y el efecto de mutaciones individuales y una combinación de mutaciones en la estabilidad del scFv como se determinó mediante estabilidad térmica. Las mejoras en la estabilidad del scFv pueden traducirse en la estabilidad global de una construcción de anticuerpo que comprende el scFv mutado.

5

Material y métodos

Construcciones

10 Para las moléculas biparatópicas basadas en IgG, scFv06475 se fusionó con el extremo C de MOR08168 IgG1 a través de un enlazador GlyGlySer para fabricar un anticuerpo biparatópico designado "901" en la Fig. 27 (MOR08168IgG1LALA 6475 scfv) o scFv08168 se fusionó con el extremo C de MOR06475 IgG1 a través de un enlazador GGS para fabricar un anticuerpo biparatópico designado "902" en la Fig. 27. Para obtener información detallada, por favor consulte otras partes de la presente memoria descriptiva de patente.

15

Diseño racional de la biblioteca enfocada para scFv06475 y scFv08168

Se usaron dos enfoques para la selección de mutaciones puntuales para estabilizar scFv06475 y scFv08168: análisis de consenso de secuencias y diseño de mutación basado en estructura utilizando modelado por homología en Entorno 20 operativo molecular (MOE).

Para el análisis de consenso de secuencias, las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de scFv06475 y de los dominios VH y VL de scFv08168 se compararon con BLAST contra la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes de NCBI. Después de cada ejecución de BLAST, el programa clustalW alineó la secuencia de consulta y las 25 250 secuencias homólogas principales. Se usó un programa informático interno para contar el aminoácido más común en cada posición de resto entre las secuencias alineadas. En cada posición en la que el aminoácido en la secuencia de consulta difería del aminoácido más común en el conjunto de secuencias alineadas, se diseñó una mutación para mutar el resto de su aminoácido de tipo silvestre al aminoácido más común.

30 Se construyeron en MOE un modelo de homología de scFv06475 y un modelo de homología de scFv08168. Las secuencias se leyeron primero en el módulo "editor de secuencias" de MOE. Se buscaron estructuras de rayos X existentes con secuencias homólogas en el módulo "modelador de anticuerpos" de MOE. El MOE identificó la estructura de rayos X 3L5X y 1W72 como los moldes adecuados para construir los modelos de homología para scFv06475 y scFv08168, respectivamente. Después, el MOE construyó modelos de homología, utilizando el campo de fuerza 35 CHARMM27 para minimizar la energía.

40 Los modelos producidos mediante MOE después se sometieron a cinco fases de minimización de energía y simulación de MD en NAMD. Todos los modelos se minimizaron en energía para 5000 etapas en la primera a la tercera fase, y con restricciones de 30 kcal/mol/A² aplicadas en diferentes conjuntos de átomos. En la primera fase, las restricciones se aplicaron a todos los átomos excepto a los átomos de la cadena lateral en las CDR. En la segunda fase, las restricciones se aplicaron a todos los átomos excepto a los restos en las CDR. En la tercera fase, las restricciones se aplicaron solamente a los átomos de la cadena principal. Después, los modelos se simularon en vacío para 100 ps a 50 K en la cuarta fase, con restricciones de 30 kcal/mol/A² aplicadas en los átomos de la cadena principal. En la quinta y última fase, se minimizó la energía de los modelos para 5000 etapas con restricciones de 30 kcal/mol/A² aplicadas en los átomos de 45 la cadena principal. Los modelos después de estas cinco fases de minimización y simulación de MD se tomaron como modelos de homología para el diseño de mutación basado en la estructura.

50 Los modelos mutantes se construyeron sobre los modelos de homología de tipo silvestre. El comando "mutar" del módulo "psfgen" de VMD se usó para mutar restos a los aminoácidos diseñados (William Humphrey *et al.* (1996) *J. Molecular Graphics*, 14: 33-38). Después, se minimizó la energía de los modelos mutados y se simularon en seis fases. Se realizaron 5000 etapas de minimización de energía en la primera a la cuarta fase. Se aplicaron restricciones de 30 kcal/mol/A² en todos los átomos excepto en la cadena lateral del resto mutado en la primera fase. Se aplicaron restricciones de la misma fuerza en todos los átomos excepto en el resto mutado en la segunda fase. Las restricciones en los átomos de la cadena lateral de los restos dentro de 5 Å del resto mutado se eliminaron en la tercera fase. Las restricciones en los átomos de 55 la cadena principal de los restos dentro de 5 Å del resto mutado también se liberaron en la cuarta fase. Con las mismas restricciones que se aplicaron en la cuarta fase, los modelos mutados se simularon al vacío para 100 ps a 50K. Después, las últimas instantáneas de las trayectorias de simulación se minimizaron de nuevo en energía durante 5000 etapas, con las mismas restricciones que en la cuarta fase. Estos modelos minimizados se tomaron como modelos de homología de los mutantes.

60

Construcción, expresión y purificación de bibliotecas basadas en placas en el sistema de *E. coli*

65 La mutagénesis de alto rendimiento se realizó utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange XL (Stratagene). Los cebadores se diseñaron de acuerdo con el software de diseño de cebadores Mutaprimer y se solicitaron a IDT en un formato de 96 pocillos con concentraciones normalizadas. El volumen de la reacción de síntesis de la cadena mutante se

redujo en escala de 50 a 25 μ l. Las reacciones se realizaron en la placa de PCR de 96 pocillos. Después del ciclado, se añadieron 0,5 μ l de enzima DpnI a cada reacción de amplificación y se incubaron a 37 °C durante 2 h para digerir el ADNbC parental. La transformación se realizó añadiendo 2 μ l de la reacción de mutagénesis digerida con DpnI en 20 μ l de células competentes químicamente de *Acella* en una placa de PCR de 96 pocillos.

5 Se escogieron tres colonias individuales de cada placa de transformación para su expresión y purificación. La expresión se realizó en dos placas de pocillos profundos de 96 pocillos utilizando medios de autoinducción. Se guardaron aliquotas de cultivo bacteriano como soluciones madre de glicerol y se enviaron para análisis de secuenciación. El sedimento bacteriano combinado de las dos placas para cada colonia individual se lisó y se purificó con el sistema de purificación de 10 proteínas MagneHis de Promega. Se configuró el instrumento KingFisher para una purificación de alto rendimiento. Se añadió NaCl 1 M al tampón de lisis y lavado para mejorar la pureza de la proteína. La proteína se eluyó con 100 μ l de imidazol 300 mM en PBS. La cantidad de proteína se verificó brevemente con Coomasie plus (Thermo) para determinar la cantidad óptima de proteína para Fluorimetría diferencial de barrido (DSF).

15 **Detección de mutaciones termoestables mediante DSF y calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Dependiendo de la cantidad de proteína purificada para cada muestra, generalmente se usaron de 10 a 20 μ l de elución para el análisis por DSF. Específicamente, se mezclaron muestras de 10-20 μ l con Sypro Orange (Invitrogen) de una dilución final de 1:1000, en un volumen total de 25 μ l en PBS. Las muestras se ejecutaron con BioRad CFX1000 (25 °C durante 2 min, después se aumentaron 0,5 °C durante 30 segundos, de 25 a 95 °C). Los aciertos se definieron como Tm sobre 2C por encima del scFv de tipo silvestre. La actividad de unión de scFv se determinó mediante ELISA de un punto.

20 **Producción de proteínas en células de mamíferos**

25 Se introdujeron mutaciones en la construcción de mamífero pRS5a que tiene scFv06475 o scFv08168 con marcador His. Las construcciones se expresaron transitoriamente en 50 ml de células en suspensión 293T. Brevemente, se mezcló PEI con 50 μ g de ADN a 1:3 para lograr una eficiencia de transfección óptima. Se usaron células a 1,4 e6 por ml para la transfección. Se recogieron células transfectadas después de seis días de incubación en cámara de CO₂ y agitación de 80 rpm en matraz de papel filtro de 250 ml. El sobrenadante se concentró a aproximadamente 1 ml para una recuperación óptima de proteínas. La proteína se purifica manualmente con el kit MagneHis de acuerdo con las instrucciones del 30 fabricante. La proteína purificada se dializó en PBS durante la noche con cambio de tampones. Se usaron muestras de proteína antes o después de la dialización para el análisis por DSF.

35 **Medición de afinidad para scFv**

35 Se midió la CE₅₀ de unión de scFv contra la proteína LRP6 se mediante ELISA. La placa Maxisorp se recubrió con LRP6-Fc (R&D Systems, N.º de catálogo: 1505-LR) a 3 μ g/ml a 4 °C durante la noche. La placa se bloqueó con 50 μ l de BSA al 2 % durante una hora y se lavó cinco veces con la solución de lavado. Las muestras se diluyeron con BSA al 1 % en consecuencia. La placa se incubó a TA durante 1 h y se lavó 3 veces. La detección se realizó mediante la adición de 50 μ l de pentaHis-HRP (Qiagen Mat. N.º 1014992) a una dilución 1:2000 en BSA al 1 %, se incubó a TA durante 1 h y se lavó 3 veces. Se añadieron 50 μ l de reactivo de sustrato A más B (R&D systems), después se incubaron durante 5-20 min dependiendo del color. La reacción se detuvo añadiendo 25 μ l de la solución de parada, seguido de una lectura de la placa a 450 nm.

45 Se realizaron experimentos de cinética utilizando el biosensor Proteon XPR36 de BioRad. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente utilizando PBST (solución salina tamponada con fosfato con Tween-20 al 0,05 %) como tampón de ejecución. Los seis canales verticales en un chip GLM se activaron durante 5 min a un caudal de 30 μ l/min utilizando una mezcla recién preparada de EDC (400 mM) y sNHS (100 mM). Se diluyó IgG1 anti-His de ratón (R&D systems, n.º de catálogo: MAB050) a 20 μ g/ml en acetato de sodio 10 mM, PH 5,0 y se acopló al chip durante 5 min a lo largo de canales verticales separados a un caudal de 30 μ l/min. Después, se inyectó etanolamina 1 M durante 5 min a 30 μ l/min para desactivar los grupos sNHS sin reaccionar. Después, se inmovilizaron 2 μ g/ml de MOR08168 scFv de tipo silvestre o 2 μ g/ml de MOR08168 D1 mutante en diferentes canales verticales durante 15 segundos a 100 μ l/min, seguido de dos inyecciones de 1 min del tampón de ejecución a 30 μ l/min en la dirección horizontal. El sexto canal vertical se usó como canal de referencia y no se inmovilizó ningún ligando en este canal. Se preparó una serie de diluciones de un 50 antígeno homodímero de 360 KD LRP6-Fc (R&D systems, n.º de catálogo: 1505-LR) a concentraciones finales de 300, 100, 33, 11 y 3,7 nM y se inyectaron a 30 μ l/min a lo largo de cada canal horizontal. La asociación se controló durante 5 min y la disociación se controló durante 20 min. Se inyectó tampón en el sexto canal para que sirviera como referencia de fila para la corrección de la desviación del valor basal en tiempo real. La superficie del chip se regeneró aplicando ácido fosfórico al 0,85 % a 100 μ l/min durante 18 s en dirección horizontal seguido de las mismas condiciones de ejecución en dirección vertical. El análisis cinético en el Proteon se realizó en Proteon Manager v.2.1.1. Cada dato de punto de interacción se restó de una referencia de canal seguido de una referencia de fila para corregir la desviación del valor basal en tiempo real. Los datos procesados se ajustaron globalmente a un modelo de analito bivalente.

65 **Resultados**

*La mutagénesis, la expresión y la purificación basadas en placas en *E. coli* permitieron un cribado más eficiente de bibliotecas enfocadas*

5 Con el fin de lograr un alto rendimiento para facilitar el análisis corriente abajo, se probó el efecto de la secuencia líder sobre la expresión. Se demostró que el líder con *pelB* produjo la mayor cantidad de proteína purificada entre los siete líderes probados, como se muestra en la Fig. 28A. Se analizó la expresión de varias cepas bacterianas, incluyendo BL21 (DE3), XL-1 Blue y W3110, con inducción de IPTG. El nivel de expresión de scFv06475 en BL21 (DE3) fue mayor que en XL-1 blue y ligeramente mayor que en W3110, como se muestra en la Fig. 28B. Con el fin de facilitar la mutagénesis, la clonación, la transformación y la expresión, se utilizó *Acella* (un derivado de BL21) para todos los experimentos posteriores, ya que la clonación y la expresión se pueden realizar en la misma cepa con gran eficacia. La proteína se purificó del lisado celular mediante KingFisher utilizando el kit Magne-His. El rendimiento estimado para scFv08168 fue de aproximadamente 10 µg por muestra de pocillos combinados de una placa de cultivo de pocillos profundos, de los cuales 2 µg se utilizaron para el análisis de termoestabilidad por DSF. El cribado por HTP basado en placas ha reducido significativamente el tiempo a alrededor de una semana desde los cebadores hasta los aciertos con termoestabilidad mejorada.

15 *Mejora de la termoestabilidad de scFv por mutación de un único punto de bibliotecas enfocadas*

20 Un acierto para la termoestabilidad mejorada se definió como una mejora de la *Tm* de al menos 1 °C por encima del tipo silvestre de forma constante. Hubo 9 aciertos de un total de 51 variantes de secuencia confirmadas para scFv06475 y 15 aciertos de un total de 83 variantes de secuencia confirmadas para scFv08168. Los aciertos seleccionados se muestran en la Fig. 28 para scFv06475 y en la Fig. 29 para scFv08168.

25 Se usaron dos enfoques para la selección de mutaciones puntuales para estabilizar scFv06475 y scFv08168: análisis de consenso de secuencias y diseño de mutación basado en estructura. Entre las 250 secuencias homólogas principales al dominio VH de scFv06475, la posición VH: 34 estaba habitualmente ocupada por Met (45 %) o Val (48 %) (todo el sistema de numeración en el texto es del sistema Kabat). Sin embargo, esta posición era un resto de Gly en la secuencia de tipo silvestre de scFv06475. Se diseñaron dos mutantes, VH:G34M y VH:G34V, para mutar el aminoácido de tipo silvestre a los aminoácidos más populares en esta posición. Como se enumera en la Fig. 28, el mutante VH:G34V mostró constantemente una mayor estabilidad que el scFv06475 de tipo silvestre cuando se expresó y purificó mediante dos protocolos diferentes. El mutante VH:G34M no se expresó bien en bacterias, probablemente debido a una secuencia incorrecta provocada por errores en el procedimiento de PCR.

30 Basándose en el mismo análisis de consenso de secuencia, se diseñaron mutaciones de VH:I34M, VH:G50S, VH:W52aG y VH:H58Y para mutar restos en scFv08168 a los aminoácidos de consenso en sus 250 secuencias homólogas principales. Como se muestra en la Fig. 30, estas mutaciones mejoraron la *Tm* de scFv08168 en 7,5 °C, 3,0 °C, 7,0 °C y 3,5 °C, respectivamente.

35 En el enfoque basado en la estructura, en primer lugar se construyó un modelo de homología de scFv06475 y un modelo de homología de scFv08168 con MOE, y después se minimizó en energía con NAMD. Después, estos modelos se inspeccionaron visualmente en busca de posibles mutaciones para mejorar la interacción local. Se diseñaron mutaciones en diversos restos de scFv06475 y scFv08168, basándose en cinco conocimientos biofísicos de la estabilidad de las proteínas.

40 45 El primer enfoque fue aumentar el tamaño de las cadenas laterales en el núcleo de la proteína para mejorar el empaquetamiento. Unos pocos restos hidrófobos con cadenas laterales orientadas hacia el núcleo de la proteína mutaron a cadenas laterales más grandes para mejorar el empaquetamiento alrededor de estos restos. Después de la selección, se encontraron tres mutaciones diseñadas por este enfoque para mejorar la estabilidad de scFv08168. Como se indica en la Fig. 30, las mutaciones VH:I34F, VL:V47L y VL:G64V mejoraron la temperatura de fusión del scFv08168 en 4,0 °C, 2,5 °C y 2,0 °C, respectivamente.

50 55 60 El segundo enfoque fue mutar restos hidrófobos a restos aromáticos para formar una interacción de apilamiento pi-pi. En el modelo de homología de scFv06475 de tipo silvestre, como se muestra en la Fig. 33a, la cadena lateral del resto VH:I37 estaba en vecindad estrecha de dos restos aromáticos de VH:W103 y VL:F98. La distancia más cercana entre cualquier átomo de la cadena lateral no de hidrógeno de VH:I37 y cualquier átomo de la cadena lateral no de hidrógeno de VH:W103 fue de 3,82 Å. La distancia de contraparte entre VH:I37 y VL:F98 fue de 3,77 Å. Como se muestra en la Fig. 33b, se formaron dos interacciones de apilamiento pi-pi perpendiculares cuando se introdujo un resto de Phe en esta región local a través de la mutación VH:I37F: una entre VH:F37 y VH:W103, y la otra entre VH:F37 y VL:F98. La interacción de apilamiento pi-pi recién formada debe ser más fuerte que la interacción hidrófoba original en esta región localizada, ya que esta mutación mejoró la temperatura de fusión de scFv06475 de 61 a 64,5 °C (Fig. 28). La mutación VH:M95F también mejoró la estabilidad de scFv06475 mediante la formación de una interacción de apilamiento pi-pi con VH:W50 y VH:F100 (Fig. 29). La *Tm* mejoró de 61 a 64,5 °C.

65 El tercer enfoque fue mutar restos sin carga a restos con carga para formar un puente salino. El resto VH:K43 de scFv06475 no formó un puente salino con restos vecinos en el modelo de homología. Puesto que la cadena lateral VH:V85 se orientaba directamente a VH:K43 en el modelo de homología de scFv06475 (Fig. 33e), se mutó a carga negativa para

formar un puente salino con VH:K43. Como se muestra en la Figura 33f, la distancia entre los átomos no de hidrógeno de la cadena lateral VH:E85 mutada y los átomos no de hidrógeno de la cadena lateral VH:K43 podría ser tan corta como de 2,61 Å, lo que sugiere que se podría establecer un puente salino entre los dos restos. La estabilidad mejorada de scFv06475 tras la mutación VH:V85E enumerada en la Fig. 29 de hecho respaldó la justificación del diseño en esta posición.

5

El cuarto enfoque fue mutar restos hidrófobos a restos polares para establecer enlaces de hidrógeno. Como se ilustra en la Fig. 33c, el resto hidrófobo VH:V33 estaba cerca de un resto polar VH:N100a en el modelo de homología de scFv08168. Cuando se insertó un resto polar en esta región a través de la mutación VH:V33N, se pudo formar un enlace de hidrógeno adicional entre VH:N33 y VH:N100a. El modelo de homología sugirió que la distancia entre el átomo ND2 de VH:N33 y uno de los átomos OD de VH:N100a podría ser tan corta como de 2,80 Å, que estaba dentro del intervalo de un enlace de hidrógeno, como se muestra en la Fig. 33d. Como se muestra en la Fig. 29, esta mutación VH:V33N mejoró la estabilidad de scFv08168 en 2,0 °C. Asimismo, la mejora de la estabilidad de la mutación VL:D93N en scFv06475 (véase la Fig. 29) podría atribuirse a la geometría mejorada del enlace de hidrógeno con VL:Q27 y VL:Q90.

10

Basándose en la sorprendente observación en el modelo de homología de scFv08168 de que dos restos polares de VL:T78 y VH:S49 estaban rodeados por cadenas laterales puramente hidrófobas, el quinto enfoque se utilizó para mutar los dos restos polares en el entorno por lo demás hidrófobo a restos no polares. Dos restos polares de VL:T78 y VH:S49 estaban ambos rodeados por cadenas laterales puramente hidrófobas. Como se indica en la Fig. 29, las mutaciones VL:T78V y VH:S49A aumentaron la temperatura de fusión de scFv08168 en 2,5 °C y 5,5 °C, respectivamente.

20

Se realizó un ELISA de un punto para evaluar la actividad de unión. Se eliminaron determinados aciertos debido a la reducción o pérdida de la actividad de unión hacia LRP6. Por ejemplo, la mutación VH:W052aG de scFv08168 mejoró la Tm en 7 °C pero mostró una actividad de unión muy reducida en comparación con el scFv08168 de tipo silvestre. Por lo tanto, no se seleccionó para un análisis adicional.

25

La presencia de imidazol 300 mM en el tampón de elución provocó a veces un cambio global de Tm por DSF, como se observa en scFv06475. Pero el efecto no afectó a la clasificación de Tm. También hubo diferencia en la proteína producida en *E. coli* frente a células de mamífero para scFv06475, como se muestra en la Fig. 28. Por el contrario, la presencia de imidazol tiene un efecto mínimo sobre la Tm de scFv08168, como se muestra en la Fig. 30 y la Fig. 31. Además, el valor de Tm permaneció sin cambios para la proteína producida a partir de *E. coli* o de mamíferos para scFv08168, como se muestra en la Fig. 31. Ya sea que haya un cambio en la Tm o no, la clasificación de Tm se mantuvo igual.

30

Para confirmar el efecto de la termoestabilidad en proteínas producidas en células de mamíferos, estas mutaciones se introdujeron en la construcción para el vector de expresión de mamíferos y se expresaron en células 293T en suspensión. Se purificaron mediante perlas MagneHis. Se comprobó la Tm y se confirmaron los aciertos para mejorar la termoestabilidad en proteínas expresadas en células de mamífero como se muestra en la Fig. 31 para scFv08168. La mutación de punto único con mayor mejora de termoestabilidad para scFv08168 es VH:I34M con una mejora de 7,5 °C.

Combinación de mutaciones para mejorar adicionalmente la termoestabilidad

35

Para mejorar adicionalmente la termoestabilidad, se combinaron mutaciones individuales que mejoraron la termoestabilidad del scFv para hacer mutaciones dobles en scFv08168. Como se muestra en la Fig. 31, los efectos aditivos se observaron para la mayoría de los mutantes dobles, incluyendo D1, que mostró una mejora de 12,5 °C mediante la combinación de dos mutaciones de VH:I34M y VH:S49A, mientras que la mutación única condujo a un aumento de 7,5 y 5,5 °C en la Tm, respectivamente.

Mutantes termoestables caracterizados por su actividad funcional y de unión

40

Se realizó una determinación de CE₅₀ por ELISA de análisis de afinidad tanto para scFv08168 como para scFv06475 de tipo silvestre y variantes. Como se muestra en la Fig. 32, para scFv08168, los aciertos mostraron una CE₅₀ en su mayoría comparables con el scFv08168 de tipo silvestre, con algunos mutantes que parecían ser un poco más activos que el tipo silvestre, incluido el mutante doble D1. Esto se confirmó con la medición de la afinidad por Proteon y la actividad del ensayo basado en células STF (realizado como se ha descrito anteriormente en esta memoria descriptiva (Materiales y Métodos, sección 8), como se muestra en la Fig. 32. La clasificación de afinidad por Octeto de las variantes de scFv08168 mostró que eran comparables al tipo silvestre (datos no mostrados). En el análisis de cinética de Proteon, la KD de D1 fue de 2,55 nM, mientras que la KD del tipo silvestre fue de 3,82 nM (Fig. 32).

55

Para scFv06475, hubo dos mutaciones que afectaron a la actividad detectada mediante ELISA y análisis de cinética de Proteon. Específicamente, en ELISA, VH:G34V y VH:I37F mostraron una CE₅₀ de 27 nM y 4,3 nM respectivamente en comparación con el tipo silvestre de 0,76 nM. En el análisis de proteínas, VH:G34V y VH:I39F mostraron una caída significativa en la tasa de desactivación (datos no mostrados).

Termoestabilidad mejorada de moléculas biparatópicas

Para las moléculas de fusión basadas en IgG 902 y la versión mutante 902T, el primer pico de Tm se desplazó de 47 °C a 62 °C. Este pico correspondía al despliegue de scFv08168. El segundo pico se desplazó de 72 °C a 76 °C. Este pico correspondía a Fab06475, como se muestra en la Fig. 34.

5 Análisis

El diseño racional basado en el análisis de secuencias y el modelado por homología han producido mutaciones termoestables para scFv. En los ejemplos actuales, la tasa de aciertos fue de aproximadamente el 18 % tanto para scFv08168 como para scFv06475. La mejora más significativa fue un aumento de 7,5 °C en Tm sobre el tipo silvestre por una mutación de punto único VH: I34M en scFv08168. En la perspectiva de la secuencia, esta posición fue muy conservada para Met. Estructuralmente, una cadena lateral hidrófoba más grande en esta posición podría mejorar el empaquetamiento alrededor de este resto. Otra mutación puntual VH: S49A en la variante de scFv08168 aumentó la Tm en 5 °C. Esta mutación se escogió mediante modelado por homología. Aunque esta posición está más conservada en Ser que en Ala, estructuralmente Ala puede encajar mejor debido a la falta de cadena lateral polar alrededor de este resto.

10 15 Para el diseño de mutación basado en la estructura utilizando modelado por homología, se utilizó una combinación de mecanismos. En scFv06475 y scFv08168, se descubrieron aciertos positivos por cada una de las cinco consideraciones biofísicas: mejora del empaquetamiento, más apilamiento Pi-Pi, más enlaces de hidrógeno, más puentes salinos y eliminación de grupos polares enterrados. Fue por esta combinación de mecanismos que se identificaron un total de 10 20 mutaciones estabilizadoras, como se enumeran en las Fig. 29 y 30.

La combinación de mutaciones identificadas como que mejoran la estabilidad térmica ("mutaciones beneficiosas") mejoran adicionalmente la termoestabilidad si están ubicadas en diferentes áreas. Esto se demostró en el caso de scFv08168. Cuando la mutación beneficiosa VH: I34M y VH: S49A se combinaron, la Tm aumentó adicionalmente a 62,5 °C frente al tipo silvestre a 49 °C. Este fue un aumento de 13,5 °C sobre el tipo silvestre, donde la mutación individual VH I34M y VH: 25 S49A aumentaron cada una la Tm en 7,5 °C y 5 °C, respectivamente. Esta fue una clara indicación del efecto aditivo.

30 I34M estaba muy cerca de CDR1-H de scFv08168, sin embargo, la mutación no afectó a la afinidad de unión como se evidencia en una serie de ensayos. La CDR desempeña una función en la estabilidad global de scFv o del anticuerpo completo. Se puede lograr una mejora significativa a través de la genomanipulación de restos cerca de la región CDR utilizando los métodos desvelados, siempre que la mutación no afecte a la afinidad y especificidad de unión.

35 La mayoría de las mutaciones estabilizadoras se han ubicado en VH. De las 15 mutaciones estabilizadoras enumeradas en las Fig. 29 y 30, 11 eran mutaciones en el dominio VH mientras que solamente 4 estaban en el dominio VL.

40 35 Cuando se incorporaron a IgG u otros formatos (por ejemplo, fusiones de albúmina sérica), el VH y el VL estabilizados condujeron a una mejora drástica en la termoestabilidad de las moléculas. Para la fusión de IgG, la Tm más baja de 47 °C corresponde a la Tm de scFv08168, mientras que el pico más alto a 72,5 °C corresponde a la Tm de CH2 y Fab06475. La incorporación de dos mutaciones VH: I34M y VH: S49A ha mejorado la Tm de scFv08168 de 47 °C a 62 °C, mientras que la incorporación de VH: M95F en 6475 mejoró adicionalmente la Tm de Fab de 72,5 °C a 76 °C. La mejora no sólo se mostró en el propio scFv, sino también en el Fab debido a la estabilidad mejorada de VH y VL. Esto puede proporcionar una estrategia más general para mejorar la estabilidad global de los anticuerpos.

45 50 El diseño racional acoplado a la detección de HTP en el sistema de *E. coli* ha ofrecido un tiempo de recambio muy rápido y una alta tasa de aciertos. La Tm medida con materiales de *E. coli* se correlacionó con la de los mamíferos, o la clasificación permaneció igual. Esto simplificó enormemente el proceso de selección para implementarlo como HTP en *E. coli*. La mutagénesis, la transformación, la expresión y la purificación basadas en placas han acortado el tiempo a menos de una semana. Usando los métodos divulgados en el presente documento, se puede realizar una serie de mutaciones en scFv u otros fragmentos de unión a antígeno y cribarlas por su estabilidad térmica. Estos fragmentos de unión a antígeno o scFv mutados se pueden usar entonces como componentes de construcciones de anticuerpos más grandes, tales como anticuerpos biparatópicos, para conferir dicha estabilidad a la construcción de anticuerpos más grande.

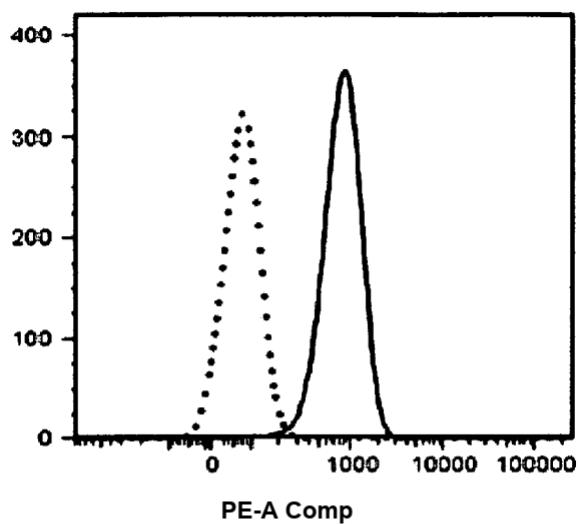
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biparatópico que comprende dos fracciones de unión a antígeno, en donde la primera fracción de unión a antígeno se une al dominio propulsor 1 de LRP6 y la segunda fracción de unión a antígeno se une al dominio propulsor 3 de LRP6, en donde dicho anticuerpo biparatópico inhibe la señalización de LRP6 mediada tanto por propulsor 1 como por propulsor 3 y no potencia la señalización de Wnt1 y Wnt3, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que expresa LRP6.
2. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera y/o segunda fracciones de unión a antígeno son fragmentos Fab, fragmentos F(ab)2, fragmentos Fv, fragmentos dAb, anticuerpos de un único dominio, unicuerpos, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR o bis-scFv, en donde un unicuerpo consiste en una cadena ligera y una cadena pesada de un anticuerpo IgG4.
3. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera fracción de unión a antígeno está en formato de IgG y la segunda fracción de unión a antígeno está en formato de scFv o la primera fracción de unión a antígeno está en formato de scFv y la segunda fracción de unión a antígeno está en formato de IgG, en donde la fracción de unión a antígeno en formato de scFv está unida a la fracción de unión a antígeno en formato de IgG.
4. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la fracción de unión a antígeno en formato de scFv está unida al extremo C o N del Fc de la fracción de unión a antígeno en formato de IgG.
5. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la fracción de unión a antígeno en formato de scFv está unida a la fracción de unión a antígeno en formato de IgG a través de un enlazador peptídico que consiste en o comprende restos de glicina y serina.
6. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo está unido químicamente a polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico (PSA), hidroxietilalmidón (HES), un ligando de unión a albúmina o protectores de carbohidratos.
7. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera y/o segunda fracciones de unión a antígeno se fusionan genéticamente con albúmina, un dominio de albúmina, una proteína de unión a albúmina o un Fc.
8. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer que expresa LRP6 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas y melanoma.
9. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo biparatópico se administra por infusión intravenosa.
10. El anticuerpo biparatópico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo biparatópico se administra en combinación con otras terapias.

Fig. 1A

PA-1

LRP5 + LRP6 +



U266-B1

LRP5 + LRP6 -

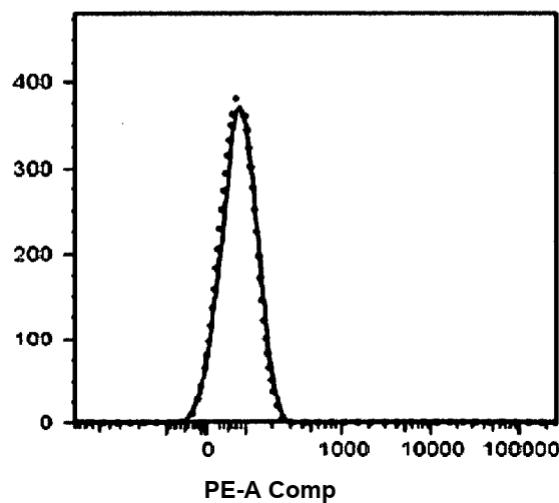
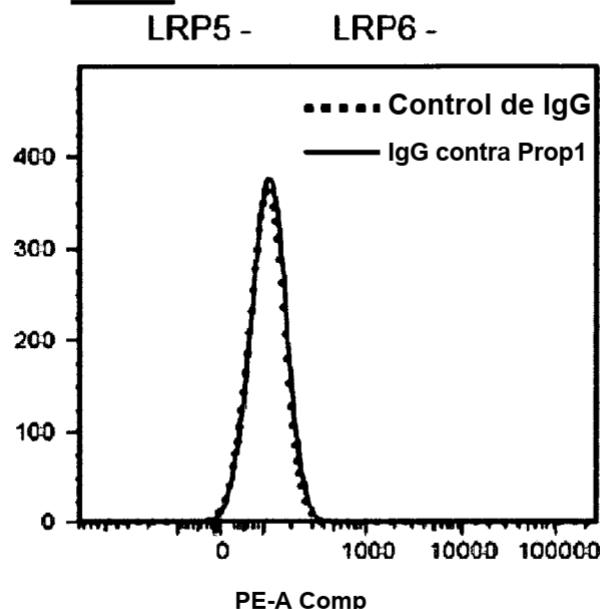


Fig 1A continuación

Daudi



Expresión de ARNm

con respecto a la estirpe celular PA1

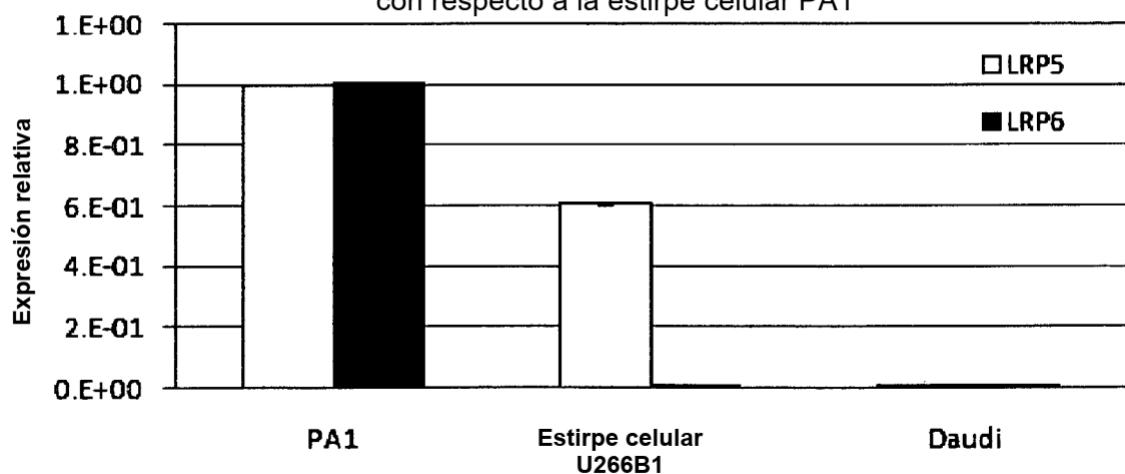


Fig. 1B

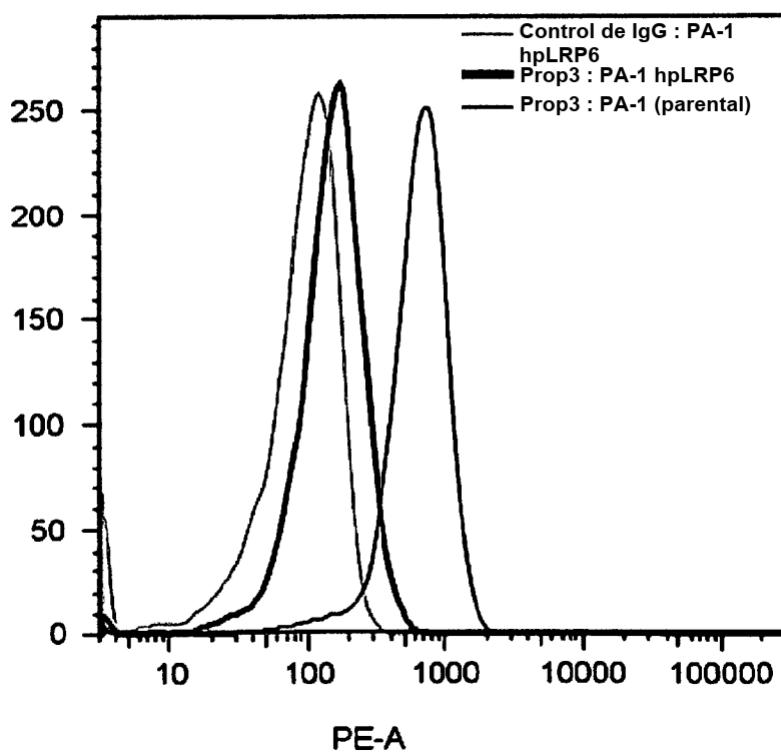
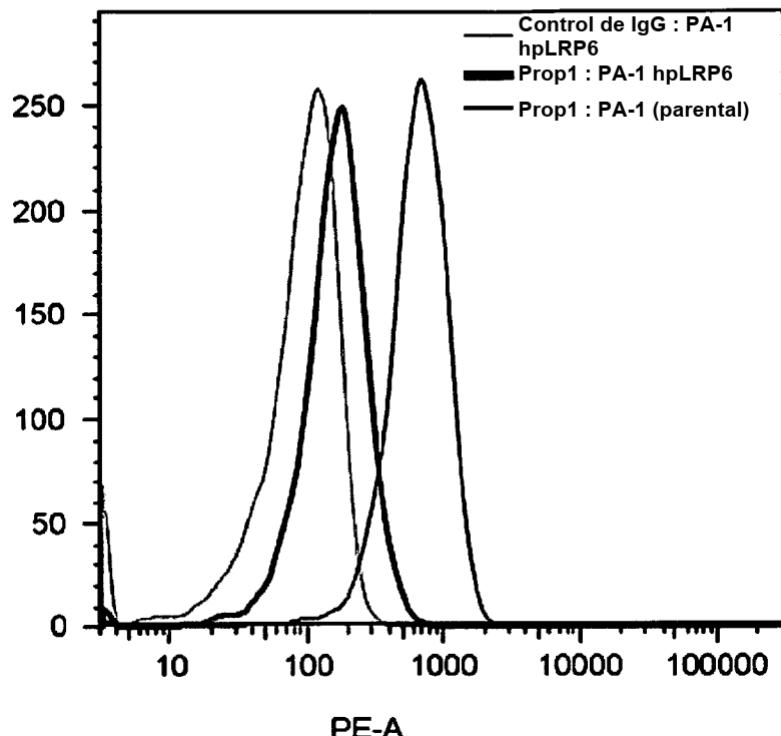


Fig. 1B continuación

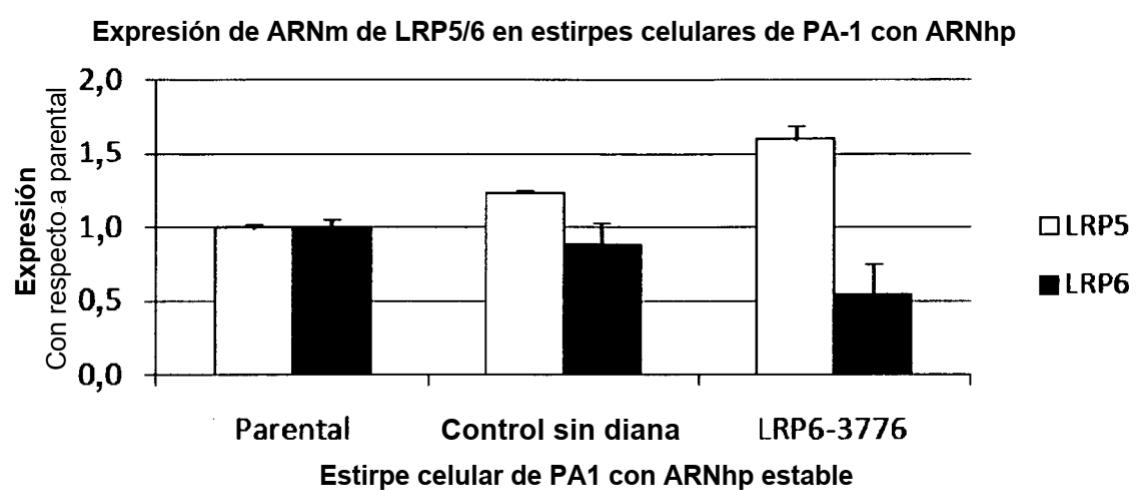


Fig. 2A

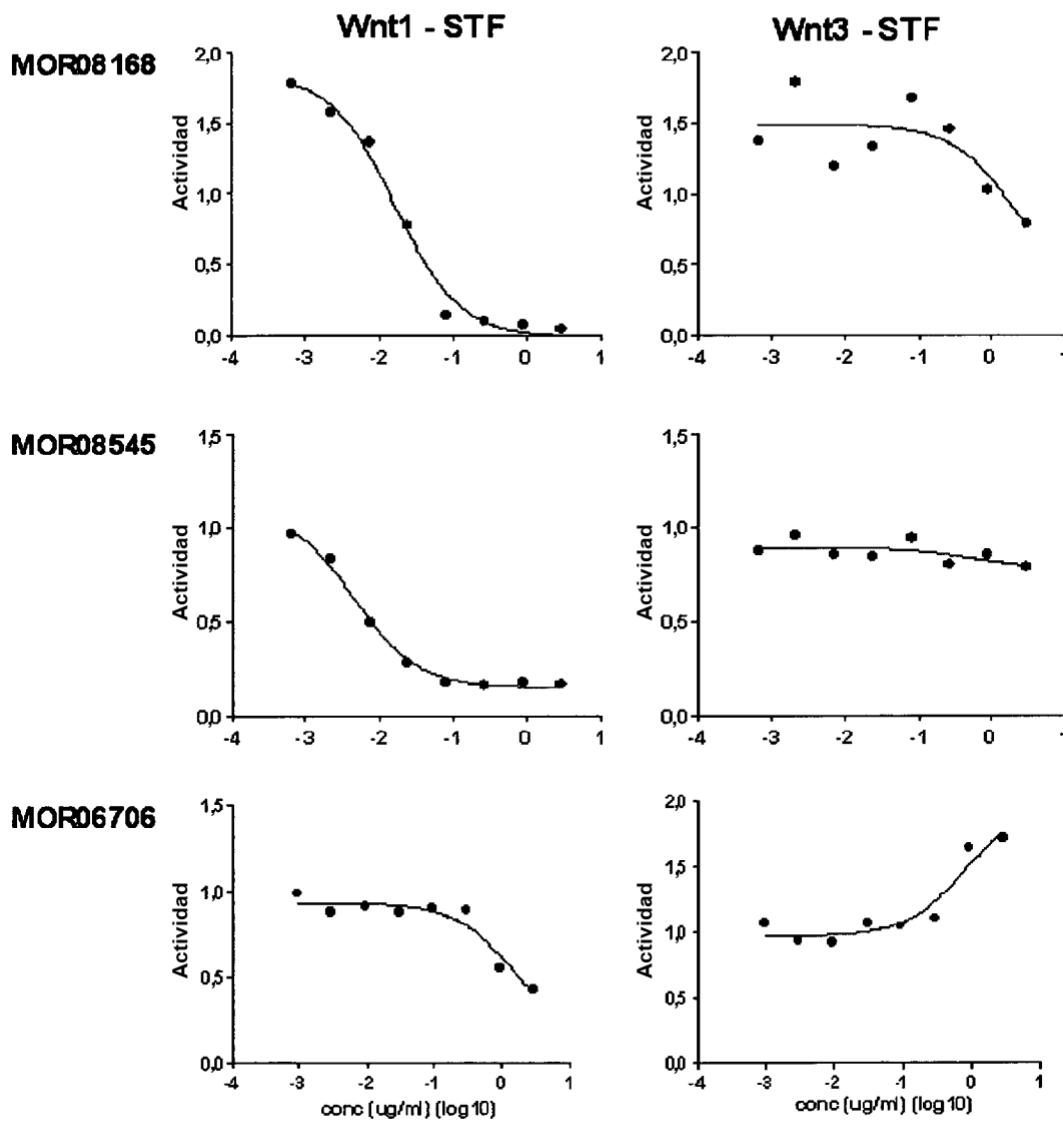


Fig. 2B

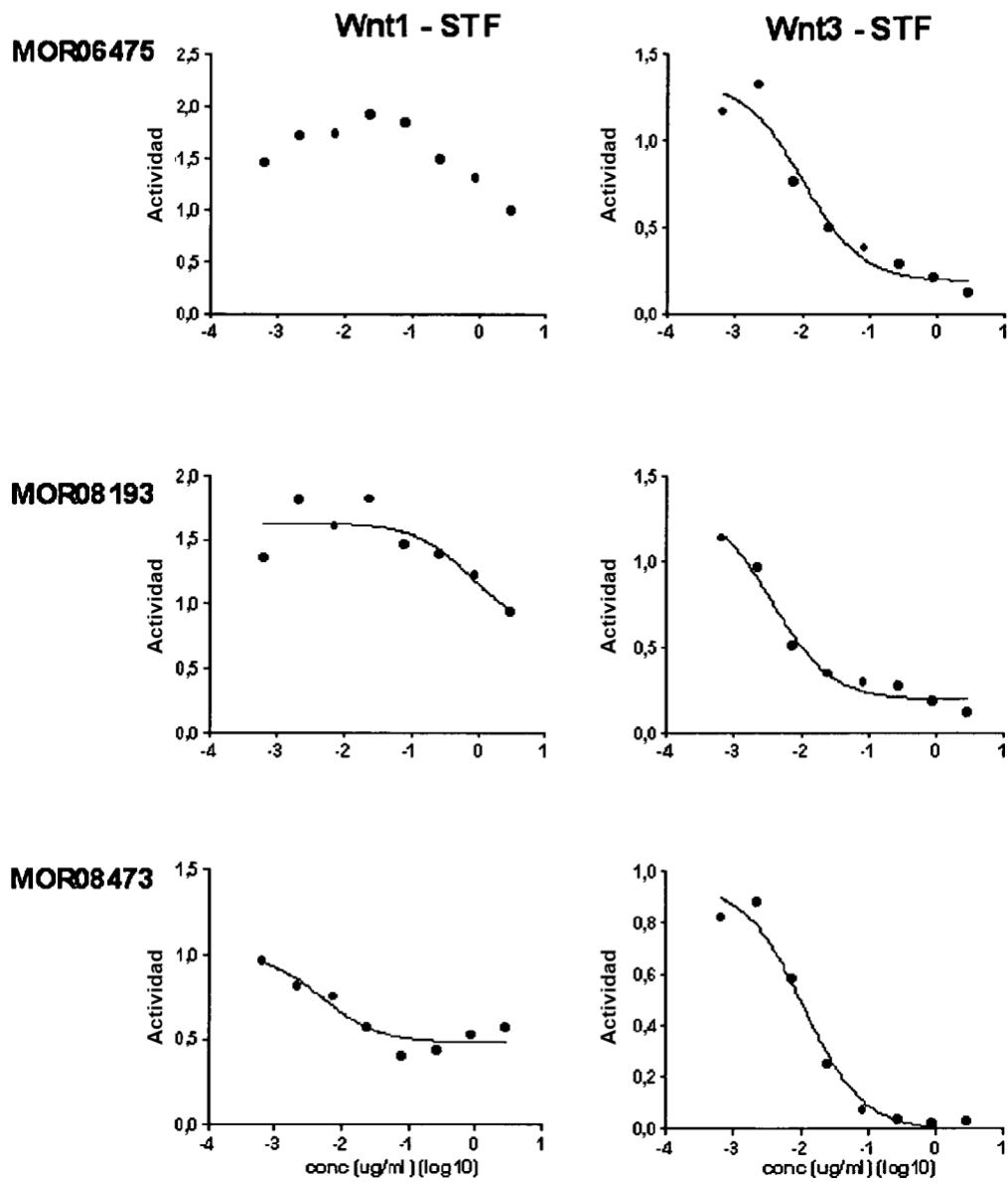


Fig. 3

	Prop 1			Prop3		
	MOR08168	MOR08545	MOR06706	MOR06475	MOR08193	MOR08473
LRP6 humana	0,28	0,09	0,14	0,31	0,36	0,74
LRP6 de ratón	0,12	0,06	n/a	0,96	0,08	0,46
LRP6 de macaco cangrejero	0,88	0,30	0,46	0,22	0,20	0,52

Valores de CE_{50} expresados en nM.

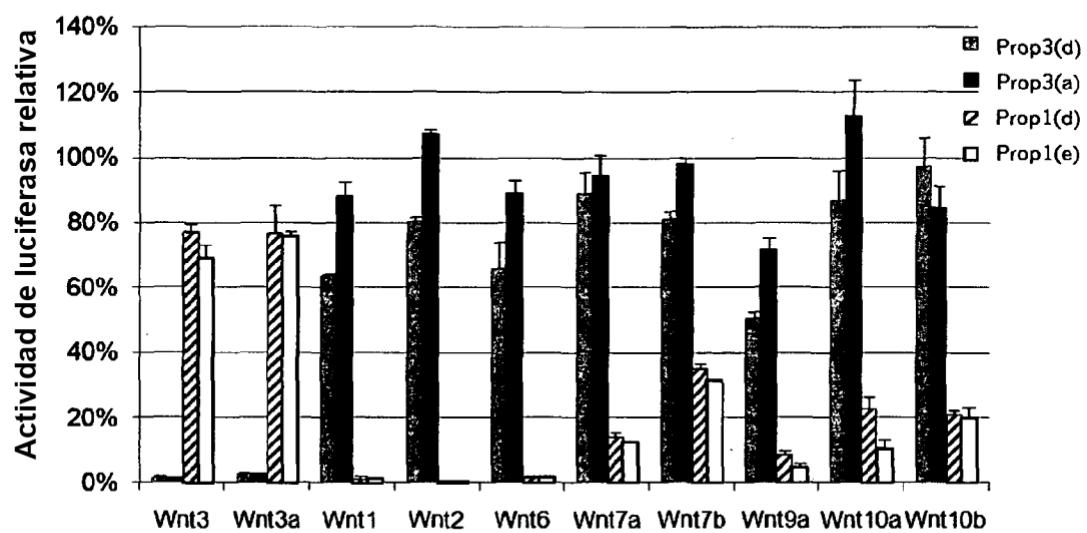
Fig. 4

Fig. 5

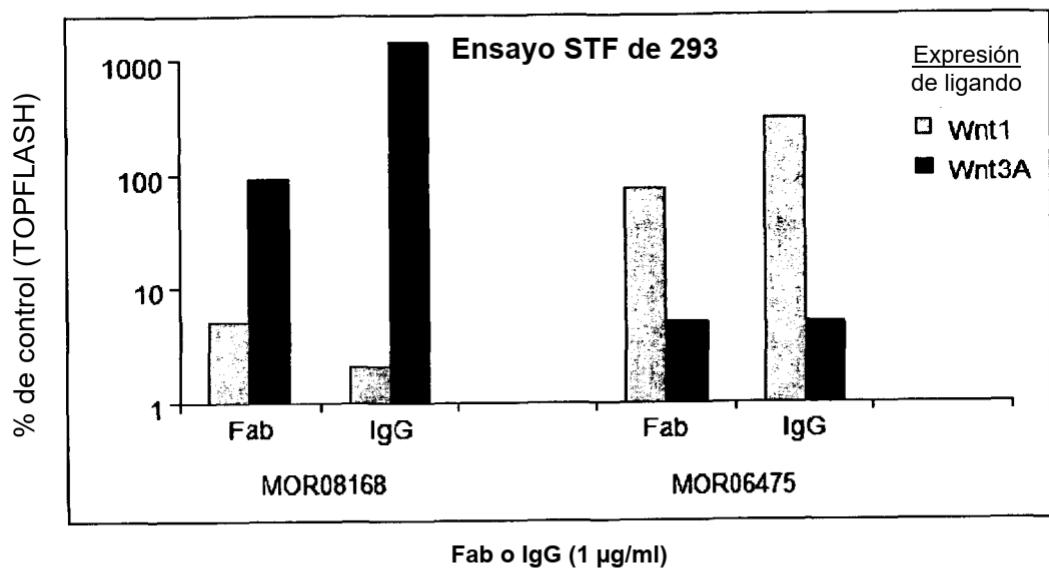


Fig. 6

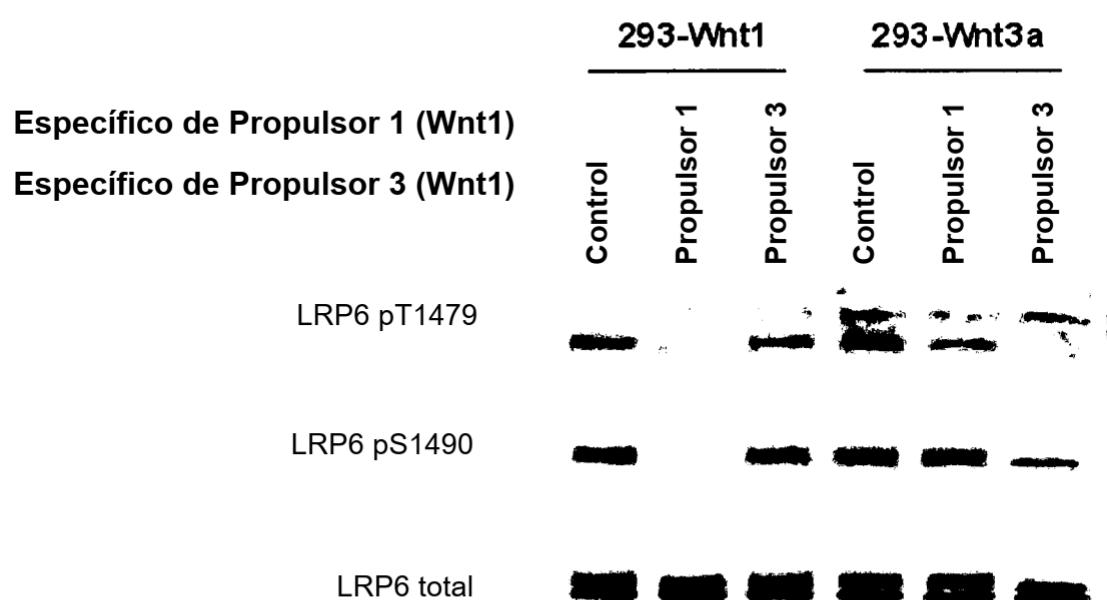
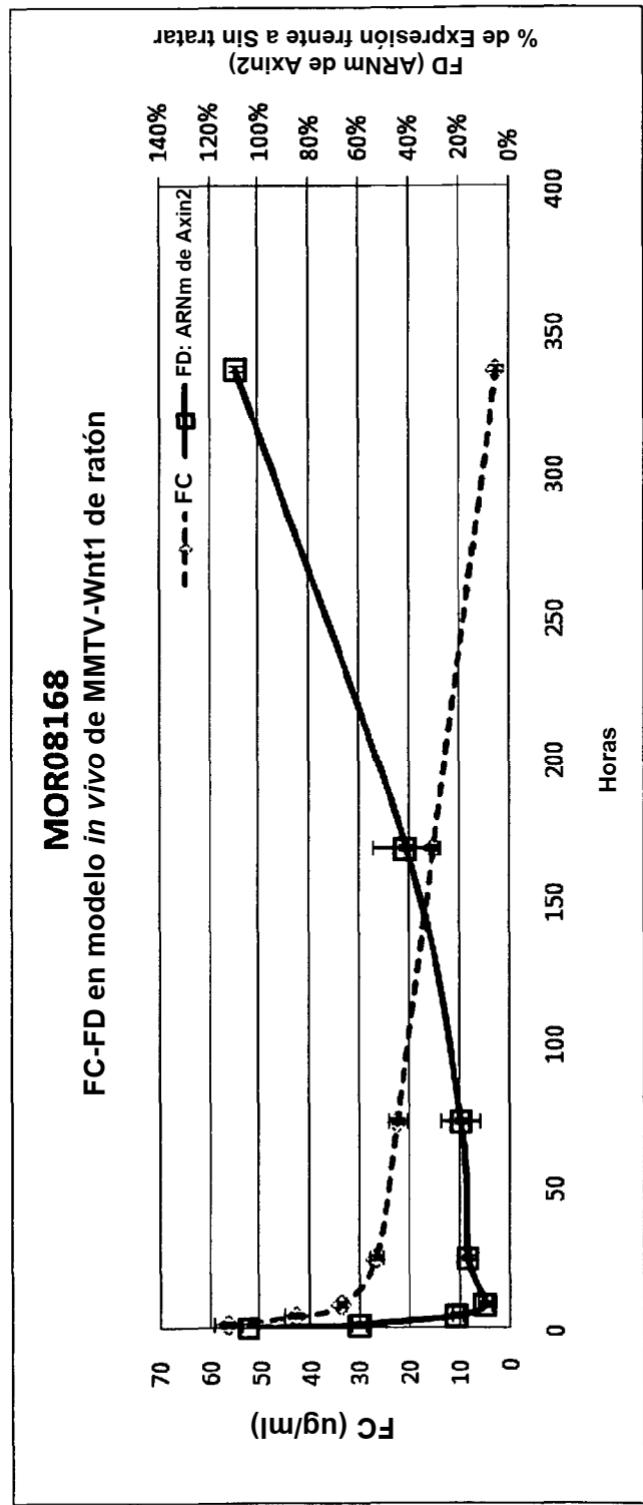


Fig. 7

Puntos temporales: 1, 4, 8 y 24 horas, 3, 7 y 14 días

Fig. 8A

ID de sonda	Símbolo del gen	Título del gen	ID del gen de entrada	Factor de cambio log(2) 0 h frente a 8 h	Val. P. ajust. 0 h frente a 8 h
1435154_at	AU018091	secuencia expresada AU018091	245128	2,51	0,008168
1418743_a at	LOC100047138///Tesc	similar a Tescalcina /// tescalcina	100047138///57816	2,42	0,000707
1418744_s at	LOC100047138///Tesc	similar a Tescalcina /// tescalcina	100047138///57816	2,41	0,001168
1447891_at	---	---	---	2,35	0,001222
1417956_at	Cidea	factor de fragmentación de ADN inductor de muerte celular, efector A similar a la subunidad alfa	12683	2,32	0,006174
1436279_at	---	---	---	2,25	0,000742
1451139_at	Slc39a4	familia 39 de portador de soluto (transportador de cinc), miembro 4	72027	2,04	0,000336
1417130_s at	Angpt14	4 similar a angiopoietina	57875	1,94	0,000722
1434918_at	Sox6	gen 6 que contiene caja SRY	20679	1,79	0,002107
1451612_at	Mt1	metalotioneína 1	17748	1,74	0,004696
1441915_s at	2310076L09Rik	gen 2310076L09 de ADNC de RIKEN	66968	1,71	0,0025
1423860_at	Ptgds	prostaglandina D2 sintasa (cerebro)	19215	1,66	0,001237
1428983_at	Cyp2s1	citocromo P450, familia 2, subfamilia s, polipéptido 1	74134	1,64	0,004778
1439036_a at	Atp1b1	ATPasa, transporte de Na+/K+, polipéptido beta 1	11931	1,63	0,00705
1451410_a at	Crip3	proteína 3 rica en cisteína	114570	1,62	0,000223
1459898_at	Sbsn	suprabasina	282619	1,60	0,002259
1433888_at	Atp2b2	ATPasa, transporte de Ca ²⁺ , membrana plasmática 2	11941	1,58	0,009975
1450435_at	Licam	molécula de adhesión celular L1	16728	1,57	0,001168

Fig. 8A continuación

ID de sonda	Símbolo del gen	Título del gen	ID del gen de entrada	Factor de cambio log(2) 0 h frente a 8 h	Val. P ajust. 0 h frente a 8 h
1455506_at	Slc25a34	familia 25 transportadora de soluto, miembro 34	384071	1,55	7,26E-05
1422820_at	Lipe	lipasa, sensible a hormona	16890	1,52	0,003431
1447655_x_at	Sox6	gen 6 que contiene caja SRY	20679	1,51	0,003772
1451204_at	Scara5	clase A de receptor de eliminador, miembro 5 (supuesto)	71145	1,51	0,001792
1451828_a_at	Acs14	miembro 4 de la familia de cadena larga de acil-CoA sintetasa	50790	1,48	6,46E-05
1451331_at	Ppp1rlb	proteína fosfatasa 1, subunidad 18 reguladora (inhibidora)	19049	1,44	0,002536
1418453_a_at	Atp1b1	ATPasa, transporte de Na+K+, polipéptido beta 1	11931	1,43	0,004956
1419706_a_at	Akap12	proteína ancla (gravina) 12 de cinasa A (PRKA)	83397	1,42	0,000118
1418911_s_at	Acs14	miembro 4 de la familia de cadena larga de acil-CoA sintetasa	50790	1,40	0,003297
1439630_x_at	Sbsn	suprabasina	282619	1,38	0,00074
		transactivador que interactúa con Cbp/p300, con dominio carboxi-terminal rico en Glu/Asp, 4, ARNm (clón de ADNc IMAGEN: 3670674)			
1438261_at	Cited4		56222	1,36	0,006783
1429952_at	Mospd4	4 que contiene dominio de esperma móvil	72076	1,36	0,005578
1435595_at	1810011O10Rik	gen 1810011O10 de ADNc de RIKEN	69068	1,34	0,000592
1429352_at	Mocos	sulfurasa con cofactor de molibdeno	68591	1,32	0,009036
1459897_a_at	Sbsn	suprabasina	282619	1,32	0,001447
1447845_s_at	Vnn1	Vanina 1	22361	1,31	0,004465
1421841_at	Fgffr3	receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos	14184	1,29	7,26E-05
1424937_at	2310076L09Rik	gen 2310076L09 de ADNc de RIKEN	66968	1,29	0,000118
1449403_at	Pde9a	fosfodiesterasa 9A	18585	1,27	0,009729
1424218_a_at	Creb3l4	4 similar a proteína 3 de unión a elemento de respuesta a AMPc	78284	1,21	0,002044

Fig. 8A continuación

ID de sonda	Símbolo del gen	Título del gen	ID del gen de entrada	Factor de cambio log(2) 0 h frente a 8 h	Val. P ajust. 0 h frente a 8 h
1424763 at	Rspfh9	homólogo de cabeza 9 de radio radial (<i>Chlamydomonas</i>) papillina, glucoproteína sulfatada similar a proteoglucano	75564 170721	1,21 1,21	0,006783 0,004502
1420521 at	Papn				
1434442 at	Stbd1	dominio 1 de unión a almidón	52331	1,19	0,004723
1438033 at	Tef	factor embrionario tirótrofo	21685	1,17	0,001335
1442335 at	---	---	---	1,16	0,006174
1448227 at	Grb7	proteína 7 de unión a receptor de factor de crecimiento	14786	1,14	0,001261
1416596 at	Slc4aa4	familia 44 portadora de soluto, miembro 4	70129	1,14	0,000898
1439620 at	Car13	anhidrasa carbónica 13	71934	1,13	0,00323
1418780 at	Cyp39a1	citocromo P450, familia 39, subfamilia a, polipéptido 1	56050	1,12	0,006174
1460409 at	Cpt1a	carnitina palmitoiltransferasa 1a, hígado	12894	1,10	0,003297
1449146 at	Notch4	homólogo 4 del gen Notch (<i>Drosophila</i>)	18132	1,10	0,008351
1443841_x at	Uap111	1 similar a UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa 1	227620	1,08	0,00764
1417273 at	Pdk4	piruvato deshidrogenasa cinasa, isoenzima 4	27273	1,08	0,006174
1430278_a at	Dqx1	ATPasa dependiente de ARN DEAQ	93838	1,07	0,0025
1426065_a at	Trib3	homólogo 3 de Tribbles (<i>Drosophila</i>)	228775	1,04	0,002859
1438038 at	4930402H24Rik	gen 4930402H24 de ADNC de RIKEN	228602	1,03	0,00599
1427537 at	Epk1	epiplacina 1	223650	1,02	0,00114
1416457 at	Ddah2	dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2	51793	1,01	0,005738

Fig. 8B

ID de sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen de entrada	Factor de cambio log(2) 0 h frente a 8 h	Val. P ajust. 0 h frente a 8 h
1449451_at	Serpineb11	Inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B (ovoalbúmina), miembro 11	66957	-3,95	7,37E-07
1451129_at	Calb2	calbindina 2	12308	-3,14	0,006783
1436845_at	Axin2	axina2	12006	-2,92	4,53E-07
1416468_at	Aldh1a1	familia 1 de aldehido deshidrogenasa, subfamilia A1	11668	-2,83	0,000506
1427508_at	Arsi	arilsulfatasa i	545260	-2,55	0,000592
1418601_at	Aldh1a7	familia 1 de aldehido deshidrogenasa, subfamilia A7	26358	-2,55	0,005578
1432592_at	Pappa	proteína plasmática A asociada al embarazo	18491	-2,55	6,46E-05
1425985_s_at	Masp1	lectina serina peptidasa 1 de unión a manano	17174	-2,48	0,001787
1434802_s_at	Ntf3	neurotrofina 3	18205	-2,43	0,000914
1425978_at	Myoocd	miocardina	214384	-2,39	0,00374
1436221_at	Ildr2	receptor 2 que contiene dominio similar a inmunoglobina	100039795	-2,36	0,00296
1418678_at	Has2	hialuronano sintasa 2	15117	-2,31	0,000996
1436894_at	Ildr2	receptor 2 que contiene dominio similar a inmunoglobina	100039795	-2,3	0,0025
1427633_a_at	Pappa	proteína plasmática A asociada al embarazo	18491	-2,21	0,002187
1436293_x_at	Ildr2	receptor 2 que contiene dominio similar a inmunoglobina	100039795	-2,17	0,002799
1433959_at	Zmat4	dedo de cinc, tipo 4 de matriz	320158	-2,14	0,00638
1427600_at	---	---	---	-2,12	6,46E-05
1432391_at	Pappa	proteína plasmática A asociada al embarazo	18491	-2,07	0,001159

Fig. 8B continuación

ID de sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen de entrada	Factor de cambio 0 h frente a 8 h log(2)	Val. P ajust. 0 h frente a 8 h
1448397_at	Gjb6	proteína de unión gap, beta 6	14623	-2,06	0,002796
1449926_at	Cd70	antígeno CD70	21948	-2,05	0,006174
1441807_s_at	---	---	---	-2,02	0,004956
1438602_s_at	Masp1	lectina serina peptidasa 1 de unión a manano	17174	-2,01	0,00255
1425212_a_at	Tnfrsf19	superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 19	29820	-1,94	6,46E-05
1428223_at	Mfsd2	2 que contiene el dominio de la superfamilia de facilitadores principales	76574	-1,93	0,006536
1420006_at	Bmp15	proteína morfogenética ósea 15 (Bmp15), ARNm	12155	-1,91	0,000707
1429506_at	Nkd1	homólogo de cutícula desnuda 1 (<i>Drosophila</i>)	93960	-1,91	0,001459
1433894_at	Jazf1	dedo de cinc JAZF 1	231986	-1,9	0,000592
1422699_at	Alox12	araquidonato 12-lipoxigenasa	11684	-1,89	0,001168
1450449_at	Anks1b	1B que contiene repeticiones de ankitrina y dominio de motivo alfa estéril	77531	-1,87	0,000592
1417275_at	Mal	proteína de mielina y linfocitos, proteína de diferenciación de linfocitos T	17153	-1,87	0,002349
1449169_at	Has2	hialuronano sintasa 2	15117	-1,8	0,000707
1420005_s_at	Bmp15	proteína morfogenética ósea 15	12155	-1,78	0,002107
		superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 11b (osteoprotegerina)	18383	-1,76	0,00402
1449033_at	Tnfrsf11b		269629	-1,73	0,001503
1433990_at	Lhfp13	3 similar a compañero de fusión de HMGC de lipoma	163533	-1,71	0,0022
1431229_at	Ipw	gen improntado en la región del síndrome de Prader-Willi	269629	-1,7	0,004465
1429592_at	Lhfp13	3 similar a compañero de fusión de HMGC de lipoma			

Fig. 8B continuación

ID de sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen de entrada	Factor de cambio 0 h frente a 8 h	Val. P ajust. log(2) 0 h frente a 8 h
1457617_at	---	---	---	-1,64	0,008658
1434265_s_at	Ank2	ankirina 2, cerebro	109676	-1,64	0,006936
1449634_a_at	Anks1b	1B que contiene repeticiones de ankirina y dominio de motivo alfa estéril familiar D RÁS, 2 similar a RAS de unión a GTP	77531	-1,6	0,005666
1455436_at	Diras2	modelo génico 106, (NCBI)	68203	-1,56	0,00813
1457429_s_at	Gm106	Factor 1 inhibidor de Wnt	226866	-1,56	0,000118
1425425_a_at	Wif1		24117	-1,55	0,000336
1415921_a_at	Infrsf19	superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 19	29820	-1,53	8,15E-05
1457948_at	Gas7	proteína 7-cb específica de detención del crecimiento (Gas7-cb)	14457	-1,53	0,006196
1439954_at	6430514M23Rik	gen 6430514M23 de ADNC de RIKEN	399595	-1,52	0,006504
1417709_at	Cyp46a1	cíocromo P450, familia 46, subfamilia a, polipéptido 1	13116	-1,52	0,004364
1445247_at	C530044C16Rik	gen C530044C16 de ADNC de RIKEN	319981	-1,52	0,000604
1428665_at	Pfn4	familia de profilina, miembro 4	382562	-1,51	0,006174
1448147_at	Infrsf19	superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, miembro 19	29820	-1,47	2,14E-08
1456335_at	Gm106	modelo génico 106, (NCBI)	226866	-1,47	0,001787
1440546_at	9630002D21Rik	gen 9630002D21 de ADNC de RIKEN	319560	-1,44	0,003664
1450506_a_at	Aen	nucleasa potenciadora de la apoptosis	68048	-1,43	0,005422
1453041_at	Ano9	anoctamina 9	71345	-1,41	0,000592
1453700_s_at	/// EG245263	gen 4933403003 de ADNC de RIKEN /// gen predicho, EG245263	245263 /// 74399	-1,41	0,004956

Fig. 8B continuación

ID de sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen de entrada	Factor de cambio log(2) 0 h frente a 8 h	Val. P. ajust. 0 h frente a 8 h
1449478_at	Mmp7	metallopeptidasa 7 de la matriz	17393	-1,39	0,009569
1452938_at	Anks1b	1B que contiene repeticiones de ankitrina y dominio de motivo alfa estéril	77531	-1,37	0,006568
1444541_at	-1,37	0,000828
1450728_at	Fix1	caja 1 de cuatro articulaciones (<i>Drosophila</i>)	14221	-1,36	0,00323
1452728_at	Kirrel3	kin de 3 similar a IRRE (<i>Drosophila</i>)	67703	-1,36	0,005549
1430118_at	2700046A07Rik	gen 2700046A07 de ADNc de RIKEN	78449	-1,31	0,008169
1441272_at	Matr3	Matrina 3, ARNm (clón de ADNc MGC: 28206 IMAGEN: 3989914)	17184	-1,29	0,002269
1419539_at	Irx4	homeocaja 4 relacionada con iroquois (<i>Drosophila</i>)	50916	-1,26	0,005098
1442456_at	Spata5	5 asociado a la espermatogénesis	57815	-1,26	0,006174
1456672_at	-1,24	0,006783
1439026_at	Tripm3	canal catiónico de potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 3	226025	-1,23	0,006174
1440446_at	-1,21	0,001125
1426139_a_at	Ccr1	1 similar al receptor de quimiocina (motivo C-C)	252837	-1,2	0,009707
1435941_at	Rhbd13	3 similar a veinlet, romboide (<i>Drosophila</i>)	246104	-1,18	0,004465
1453645_at	2700046A07Rik	gen 2700046A07 de ADNc de RIKEN	78449	-1,18	0,000692
1444905_at	D1Ertd705e	segmento de ADN, Cr 1, ERATO Doi 705, expresado	51940	-1,17	0,003297
1422733_at	Fix1	caja 1 de cuatro articulaciones (<i>Drosophila</i>)	14221	-1,14	0,007138
1423957_at	Aen	nucleasa potenciadora de la apoptosis	68048	-1,07	0,000391

Fig. 8B continuación

ID de sonda	Símbolo del gen	Título del gen	Gen de entrada	Factor de cambio 0 h frente a 8 h log(2)	Val. P ajust. 0 h frente a 8 h
1433084_at	4930402C16Rik	gen 4930402C16 de ADNC de RIKEN	73812	-1,07	0,006802
1421498_a_at	2010204K13Rik	gen 2010204K13 de ADNC de RIKEN	68355	-1,07	0,007469
1426981_at	Pcsk6	proteína convertasa subtilisina/keksina de tipo 6	18553	-1,06	0,000506
1446846_at	---	---	---	-1,05	0,004364
1429861_at	Pcdh9	protocadherina 9	211712	-1,04	0,006174
1447958_at	---	---	---	-1,02	0,000592
similar al precursor de homólogos de Goliath (proteína 130 de dedo anular) (R-Goliath) // dedo de cinc y anular 3					
1435608_at	Znrf3	LOC631806 //	407821 /// 631806	-1,02	0,000118
1456266_at	---	---	---	-1,02	0,002282
1421341_at	Axin2	Axin2	12006	-1,02	0,001447
1418495_at	Zc3h8	8 que contiene el tipo CCCH de dedo de cinc	57432	-1,01	0,000233

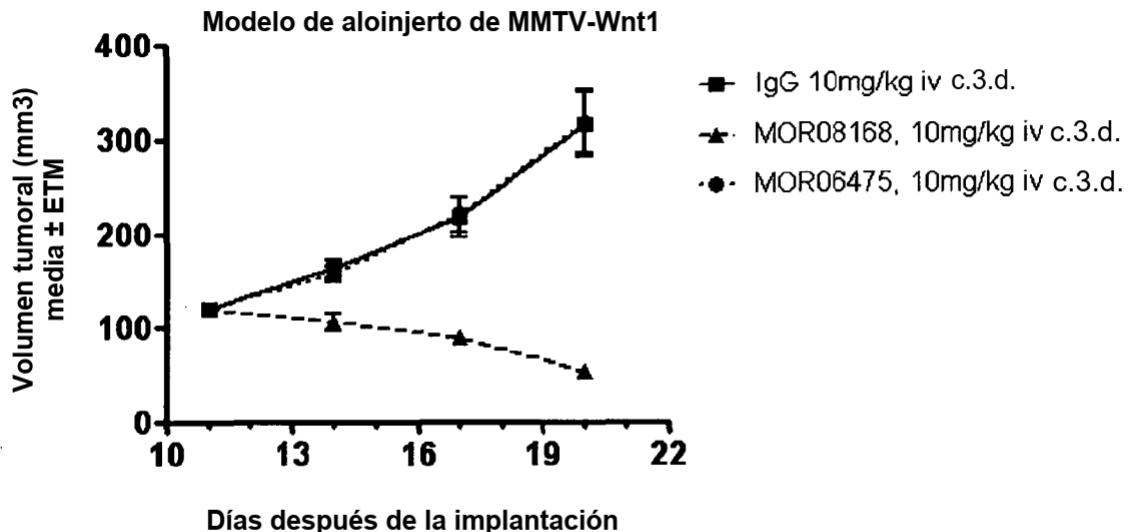
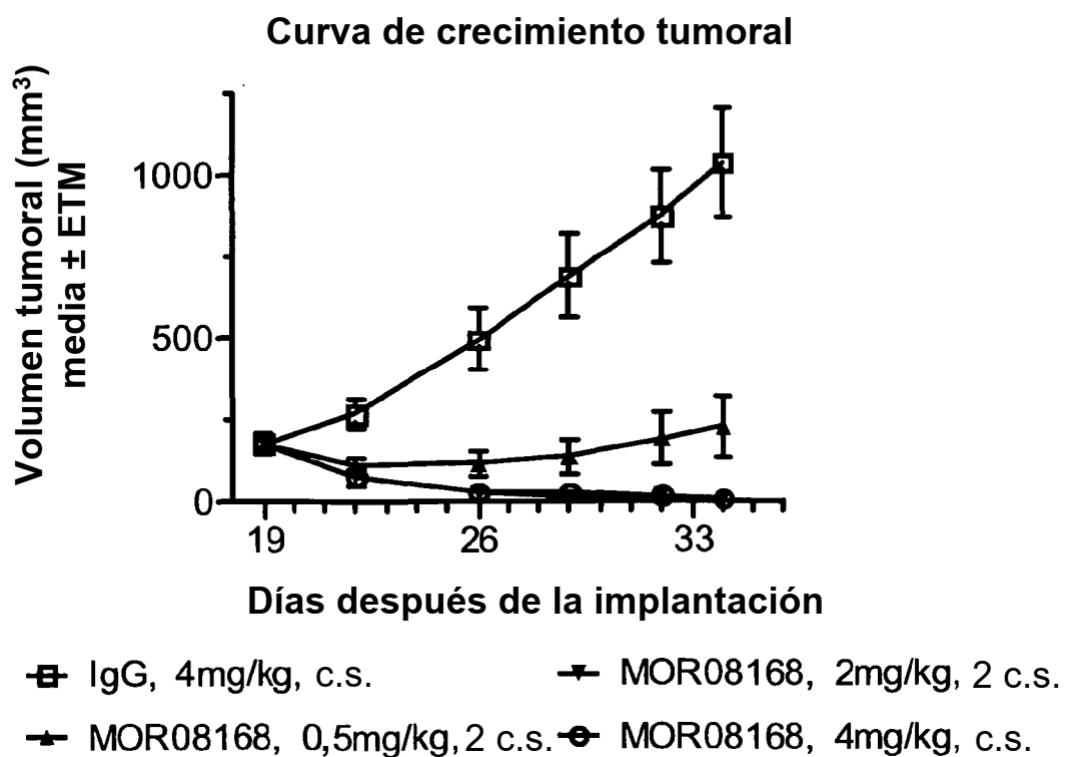
Fig. 9A**Fig. 9B**

Fig. 10

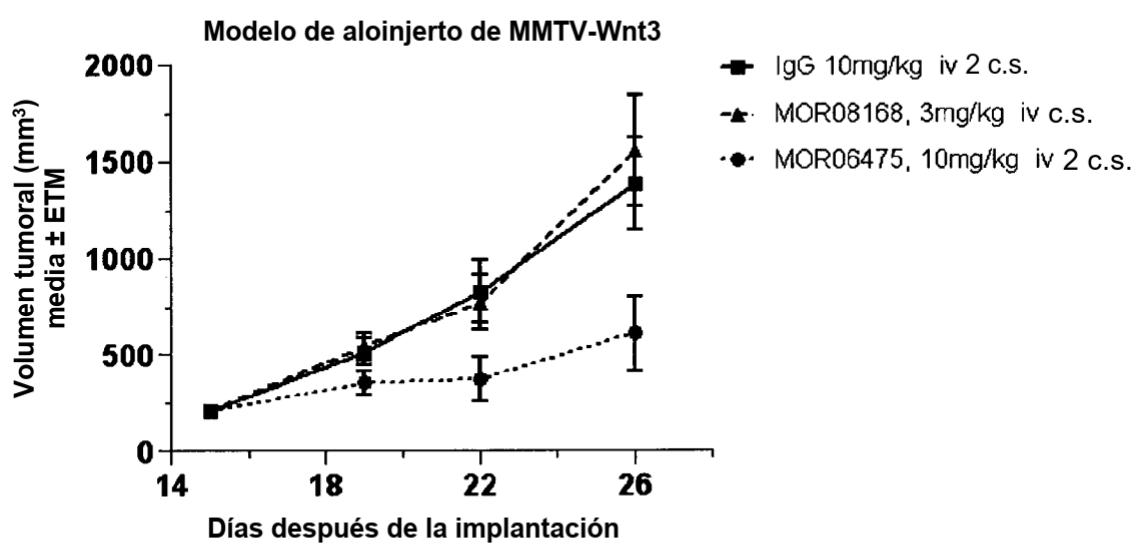


Fig. 11

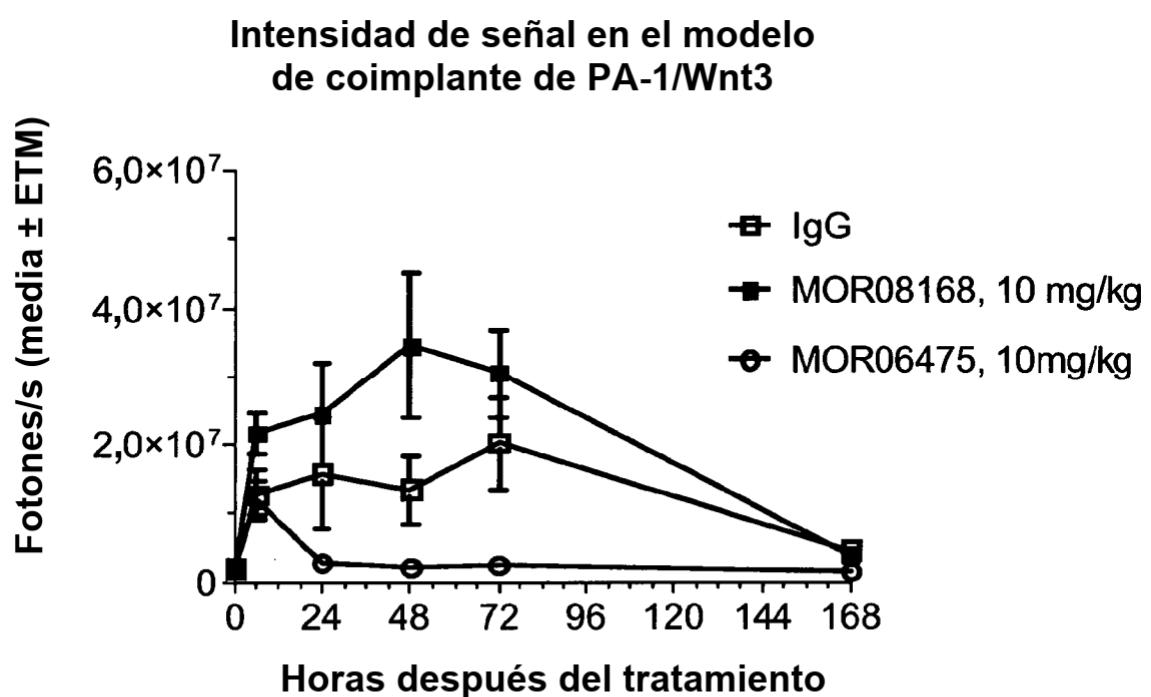


Fig. 12A



- **Protección a disolvente**
- **Sin detección de DXMS**

Fig. 12B

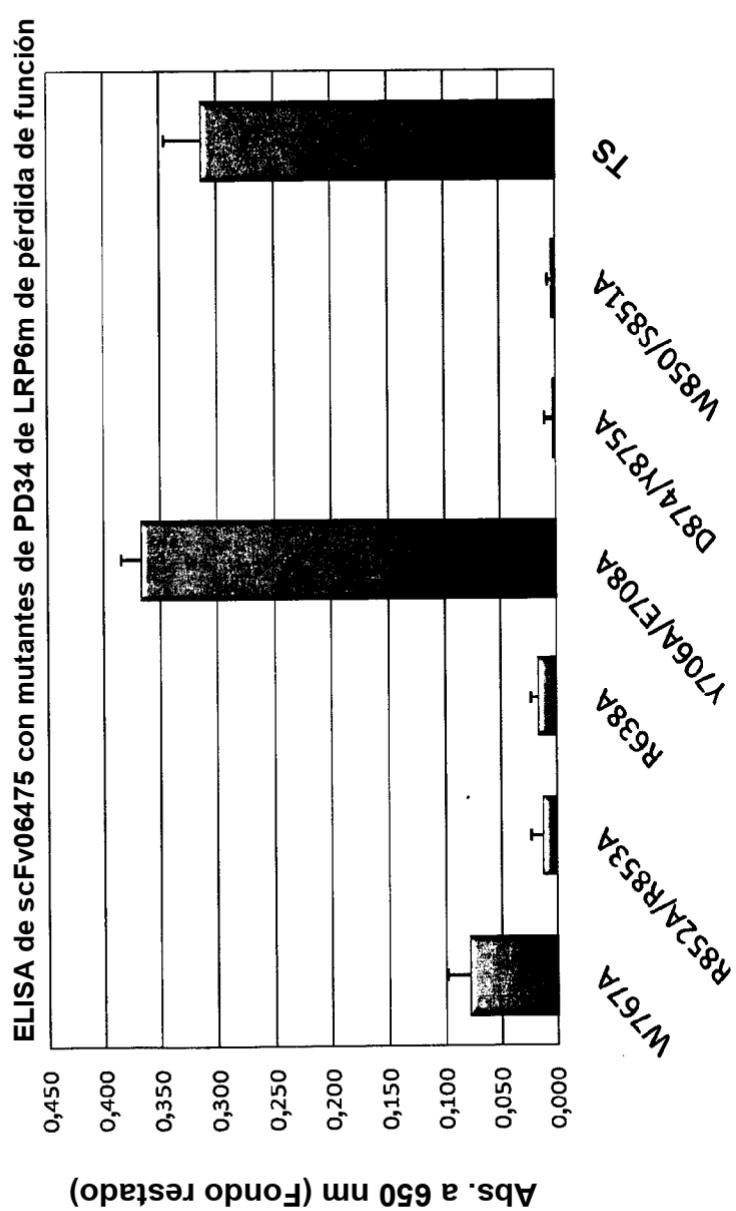


Fig. 13

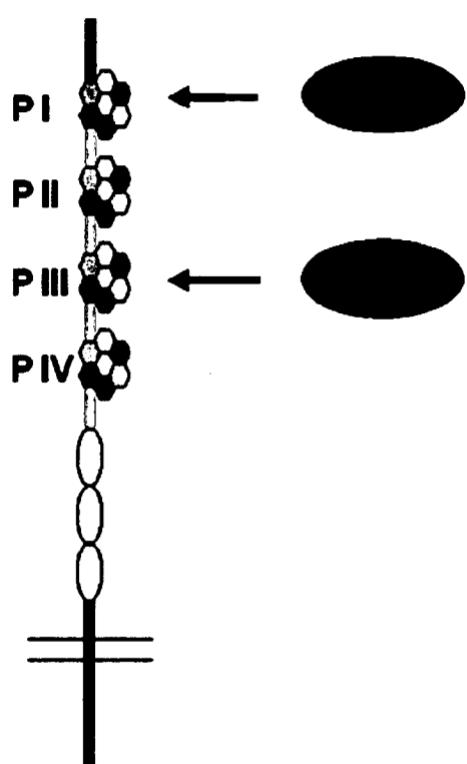


Fig. 14

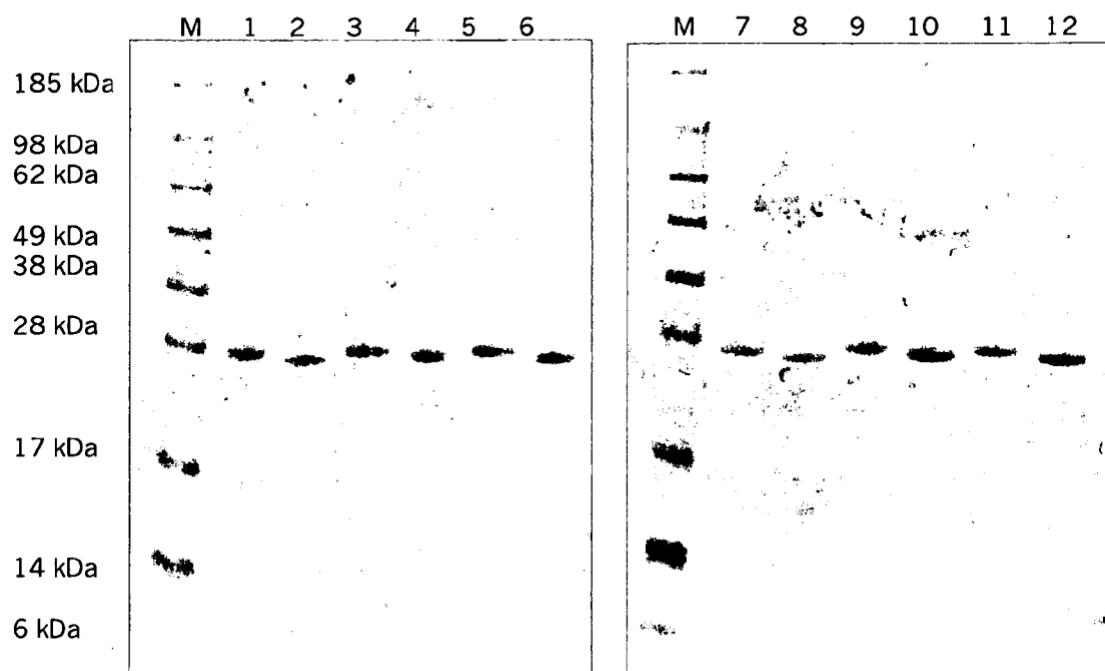


Fig. 15

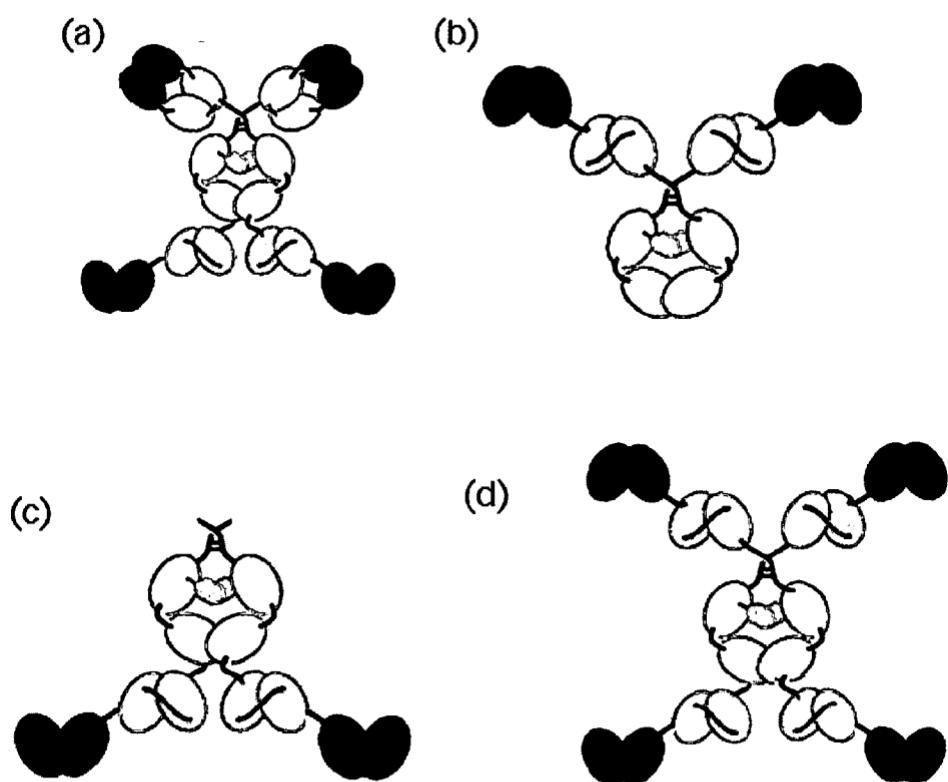


Fig. 16

1 M 2

200

116

97

66

55

36

31

21

14

Fig. 17
Wnt1-STF

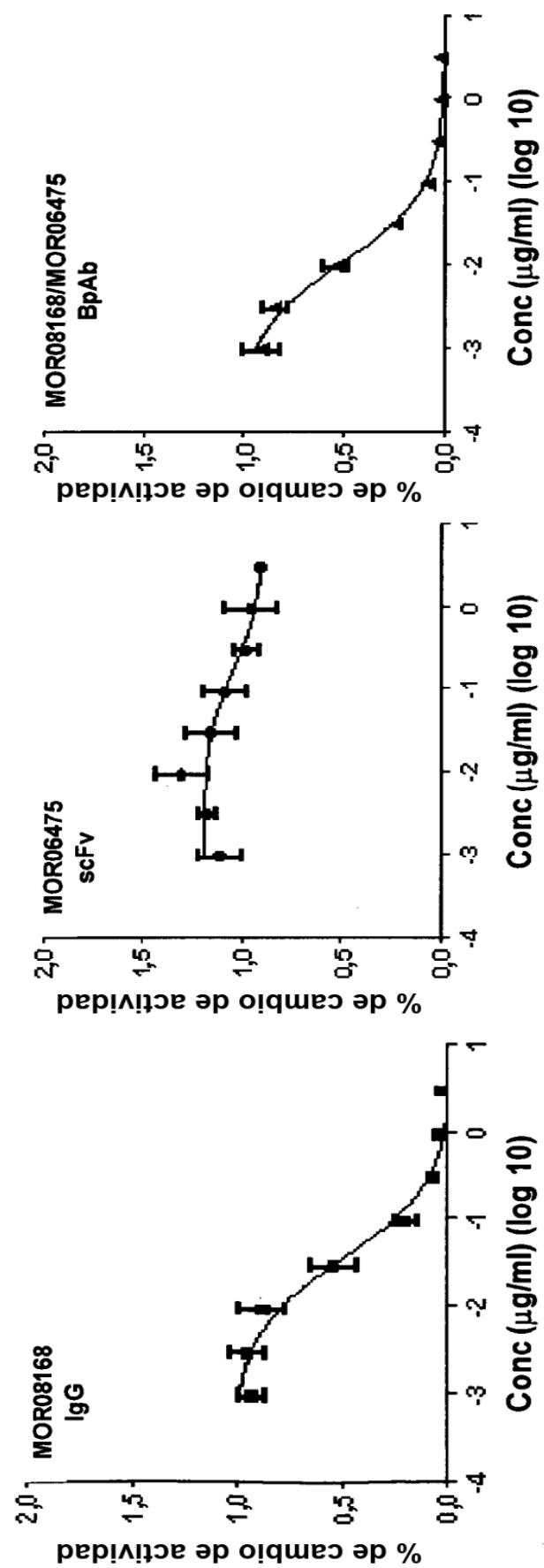


Fig. 17 continuación

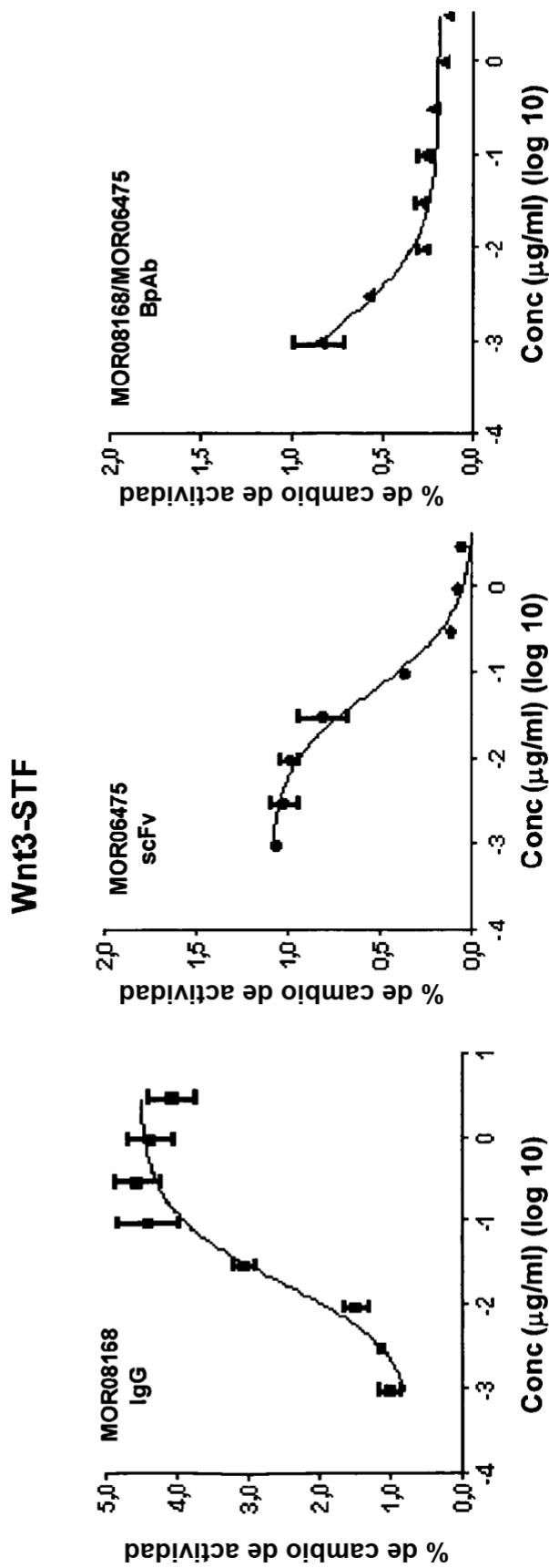


Fig. 18

	Cl ₅₀ por STF de HEK (μ g/ml)	WNT1 WNT3a
MOR06475-sc-fv-Vl-Vh	n/a	0,07
MOR06475-sc-fv-Vh-Vl	n/a	0,06
MOR06475-sc-fv-Vl-Vh-(GGGGS)3	n/a	0,08
MOR06475-sc-fv-Vh-Vl-(GGGGS)3	n/a	0,08
MOR06475-Fab	n/a	0,11
MOR08168-sc-fv-Vl-Vh	0,05	n/a
MOR08168-sc-fv-Vh-Vl	0,06	n/a
MOR08168-sc-fv-Vl-Vh-(GGGGS)3	0,07	n/a
MOR08168-sc-fv-Vh-Vl-(GGGGS)3	0,1	n/a
MOR08168-Fab	0,15	n/a
MOR08545-sc-fv-Vl-Vh	0,53	n/a
MOR08545-sc-fv-Vh-Vl	0,06	n/a
MOR08545-sc-fv-Vl-Vh-(GGGGS)3	n/a	n/a
MOR08545-sc-fv-Vh-Vl-(GGGGS)3	0,05	n/a
MOR08545-Fab	0,05	n/a
anti-LRP6_MOR08168_hlgG1 LALA_6475scfv en VL	0,013	0,0071
anti-LRP6_MOR06475_hlgG1 LALA_8168scfvatCH3_(VH-3-VL)	0,013	0,0082
anti-LRP6_MOR06475_hlgG1 LALA_8168scfvatCH3_(VH-4-VL)	0,016	0,0094
anti-LRP6_MOR08168_hlgG1 LALA_6475scfvatCH3_opt_DPaDA	0,02	0,0076
anti-LRP6_MOR08168_hlgG1 LALA_6475scfvatCH3_opt_DPaDA	0,026	0,0098
anti-LRP6_MOR08168_hlgG1 LALA_6475scfvatCH3_opt_sin-K	0,015	0,0064
MOR06475 IgG	n/a	0,0039
MOR08168 IgG	0,025	n/a
MOR08168hlgG1LALA 6475 scfv	0,016	0,011

Fig. 19

Anticuerpo		K _D InM Unión de Ab a FcRn			
		FcRnhu, pH6,0	FcRnhu, pH7,4	FcRnmacaco, FcRnmacaco, pH6,0 pH7,4	
MORCB168		0,023	UNB	0,28	UNB
MORCB168/6478 BpAB		0,021	UNB	0,12	UNB

UNB: unión de nivel bajo

Fig. 20

Intensidad de señal en el modelo
de coimplante de PA-1/Wnt3

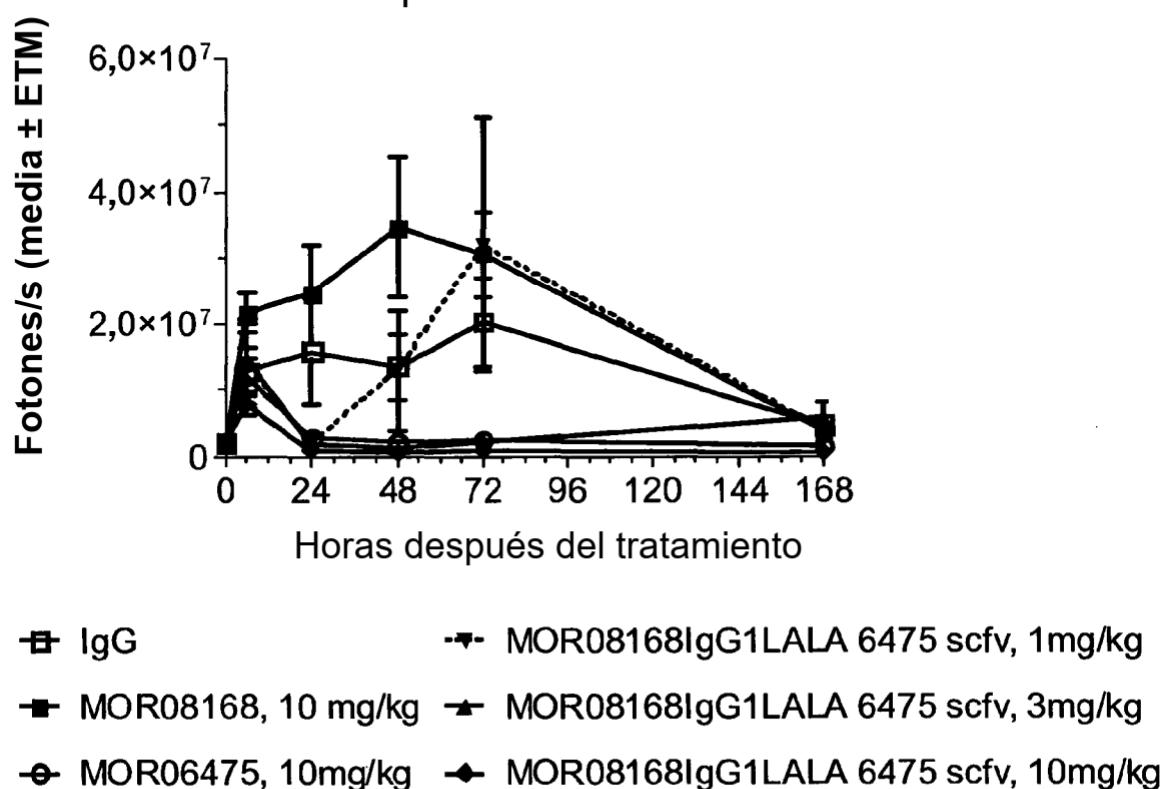


Fig. 21

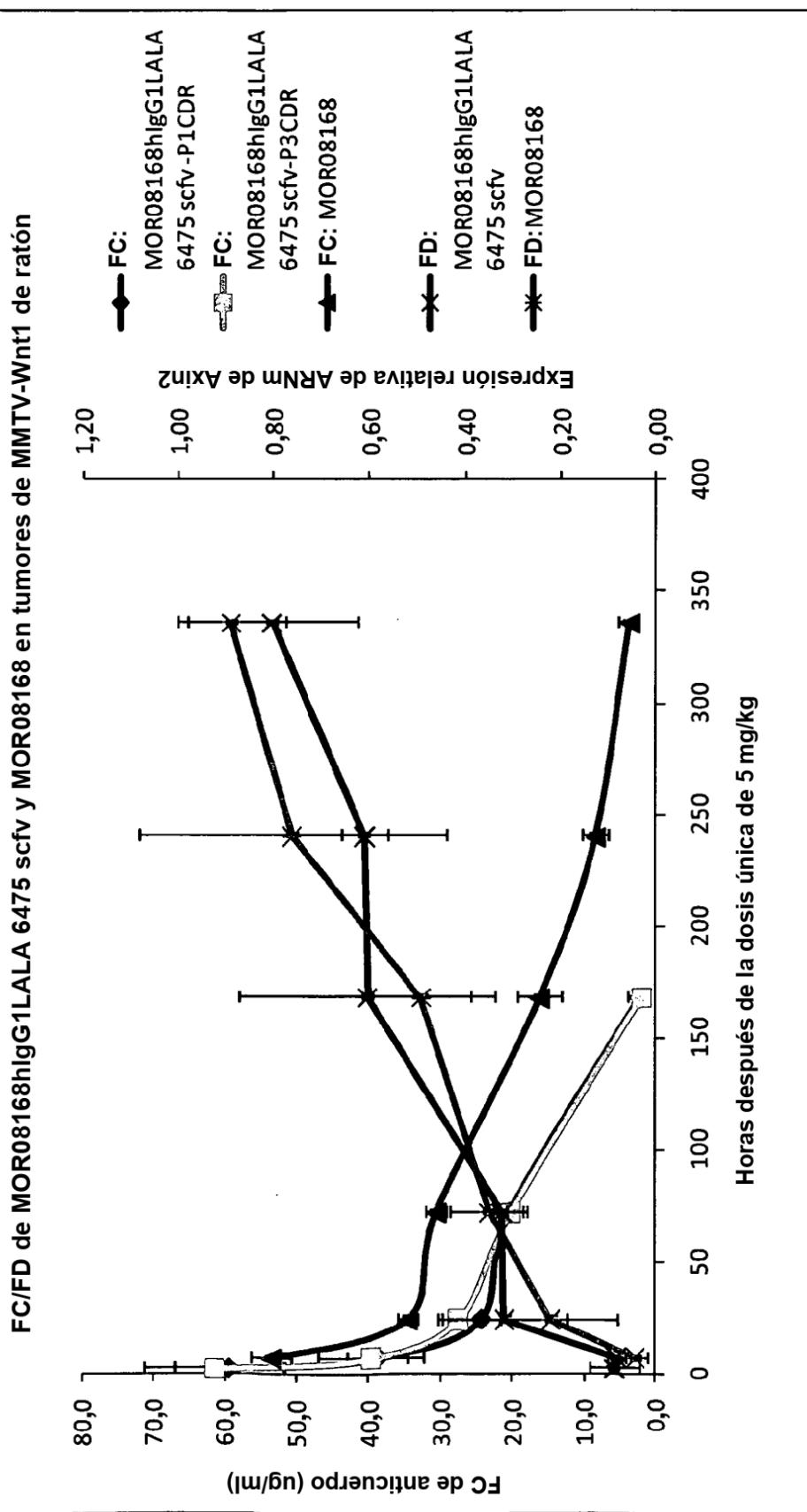


Fig. 22

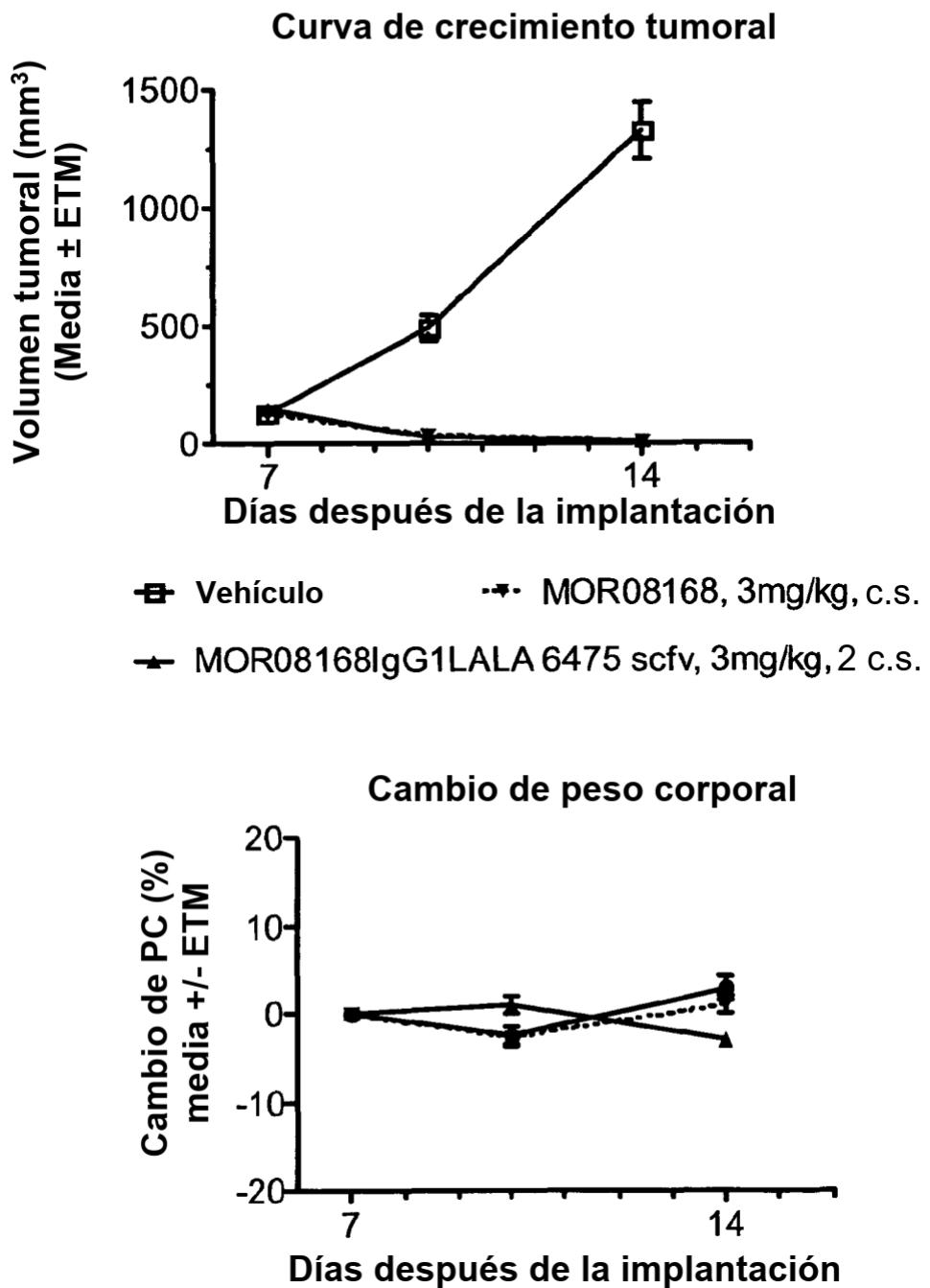


Fig. 23

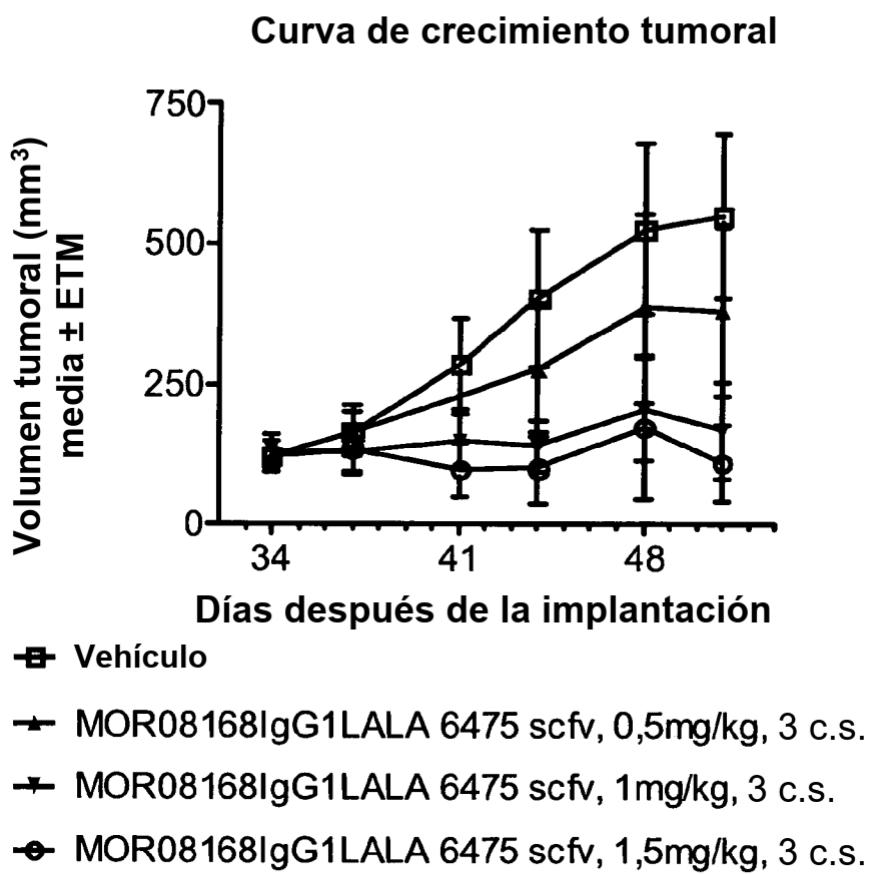


Fig. 24A

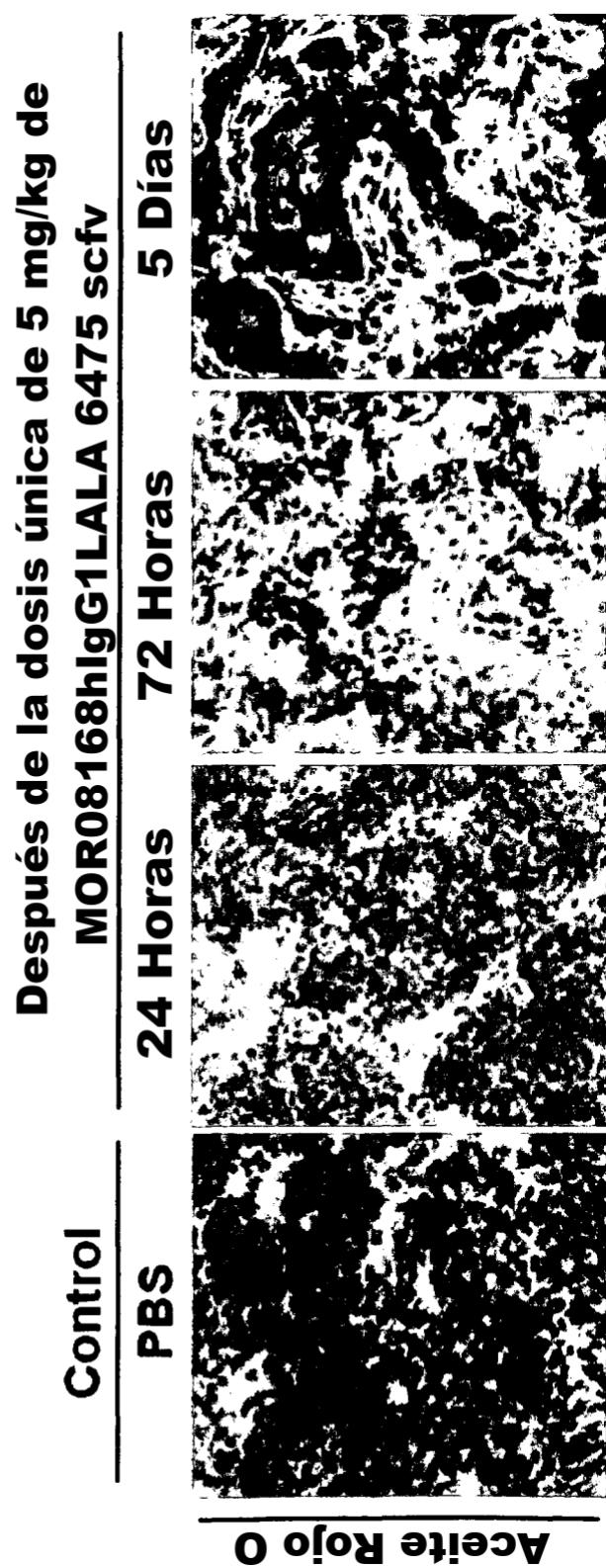


Fig. 24B

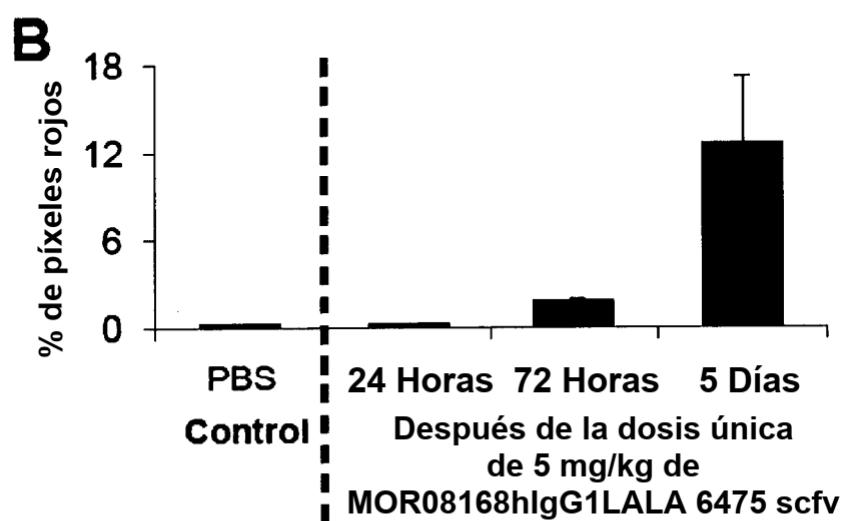


Fig. 25

Curva de crecimiento tumoral

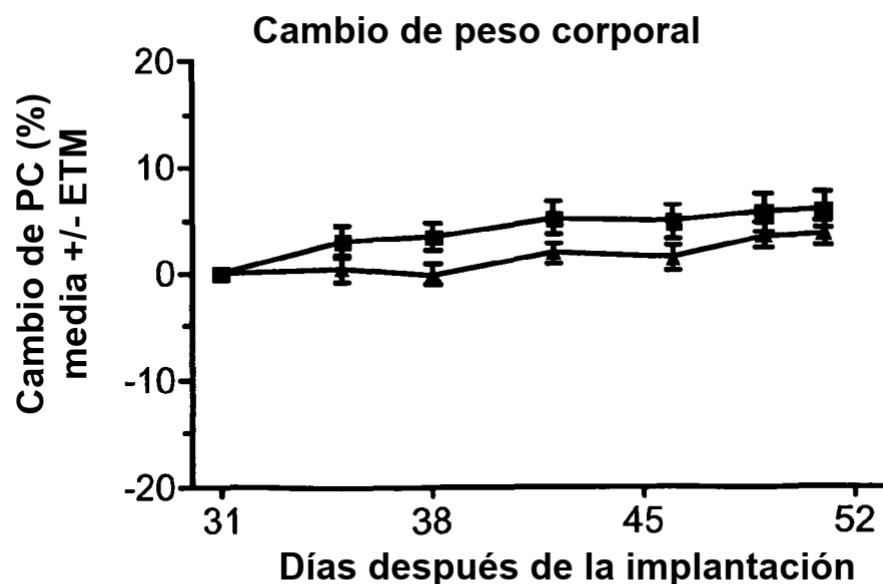
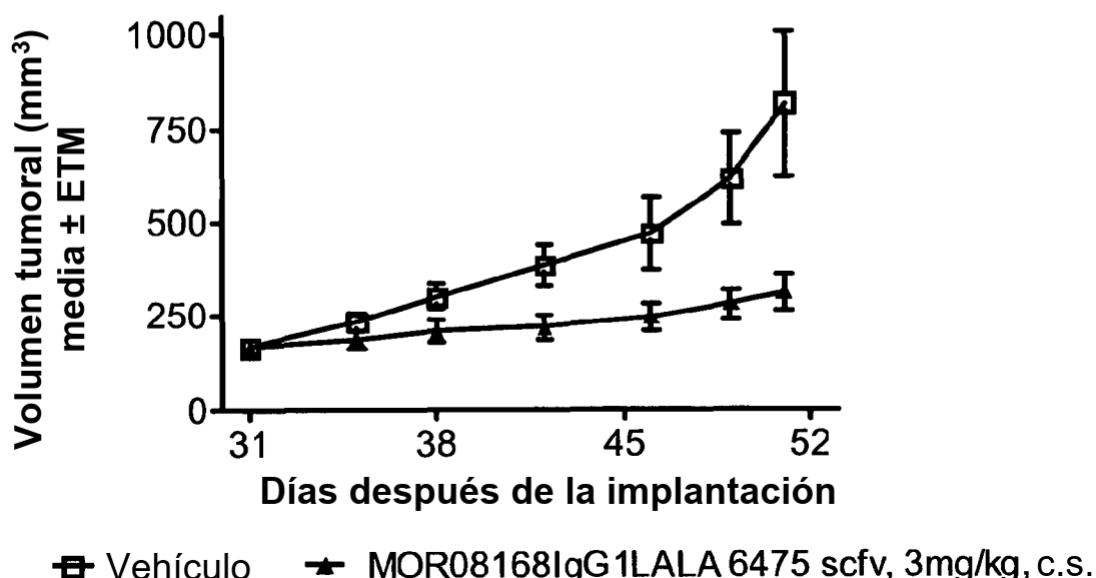


Fig. 26A

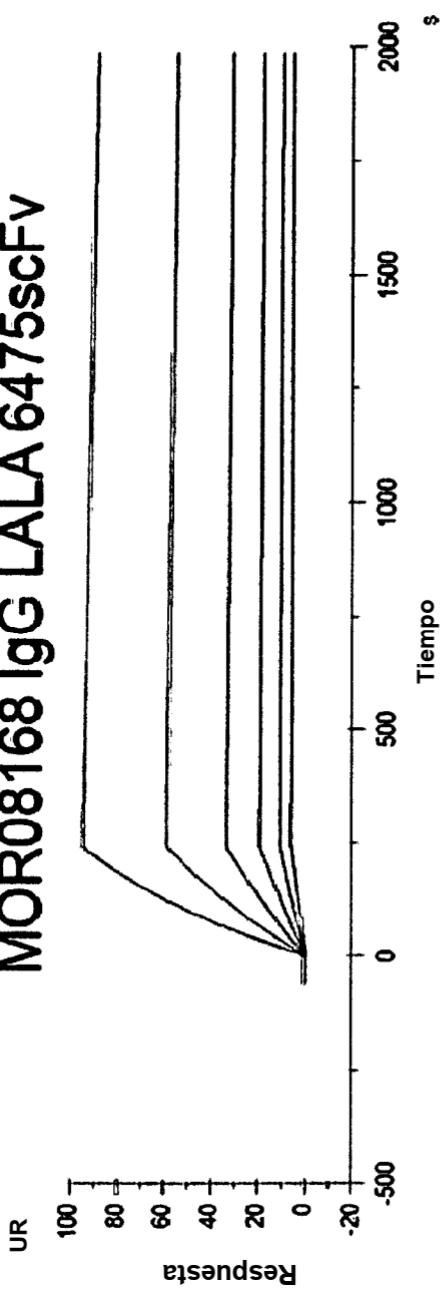
Resumen de la medición de la KD de la unión de MOR08168 IgG LALA 6475scFv, MOR08168 y MOR08475 a PD1/2 y PD3/4

Unión a PD1/2	Kd (nM)	Kd (nM)	KD (nM)
MOR08168 IgG LALA 6475scFv	1,27E+05	6,10E-05	8,68E-10 3
MOR08168	8,72E+04	9,05E-05	1,08E-09 4
Unión a PD3/4	Kd (nM)	Kd (nM)	KD (nM)
MOR08168 IgG LALA 6475scFv	2,11E+05	3,14E-04	1,93E-09 3
MOR08475	2,01E+05	2,17E-04	1,13E-09 4

Unión a PD1/2

Fig. 26B

MOR08168 IgG LALA 6475scFv



MOR08168

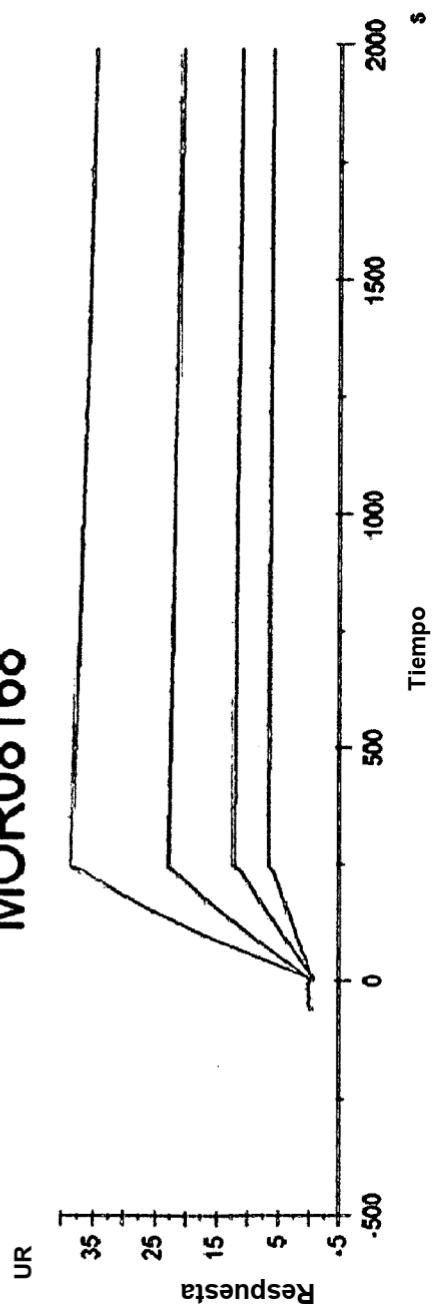


Fig. 26B continuación

Unión a PD3/4

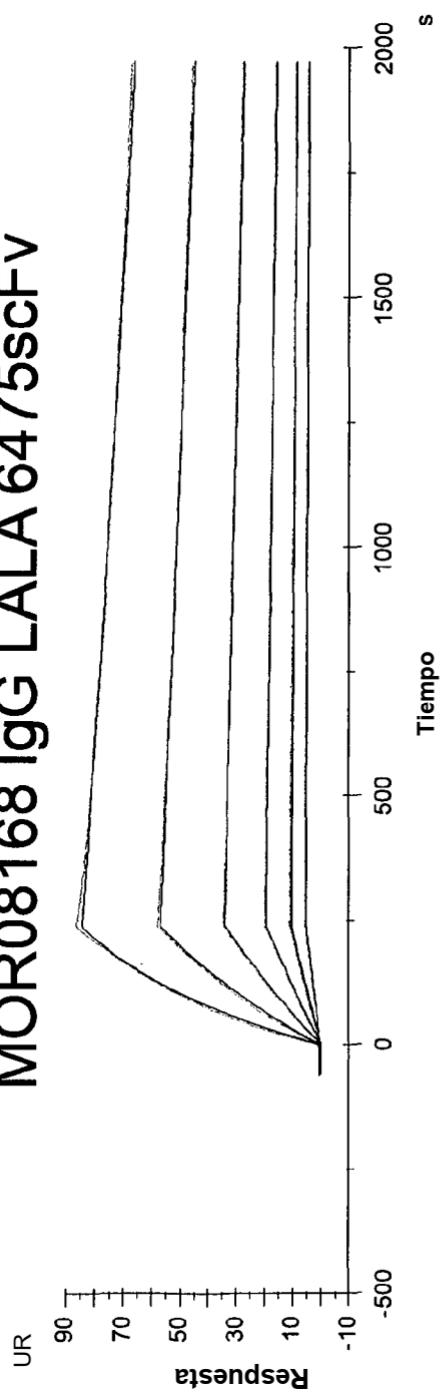
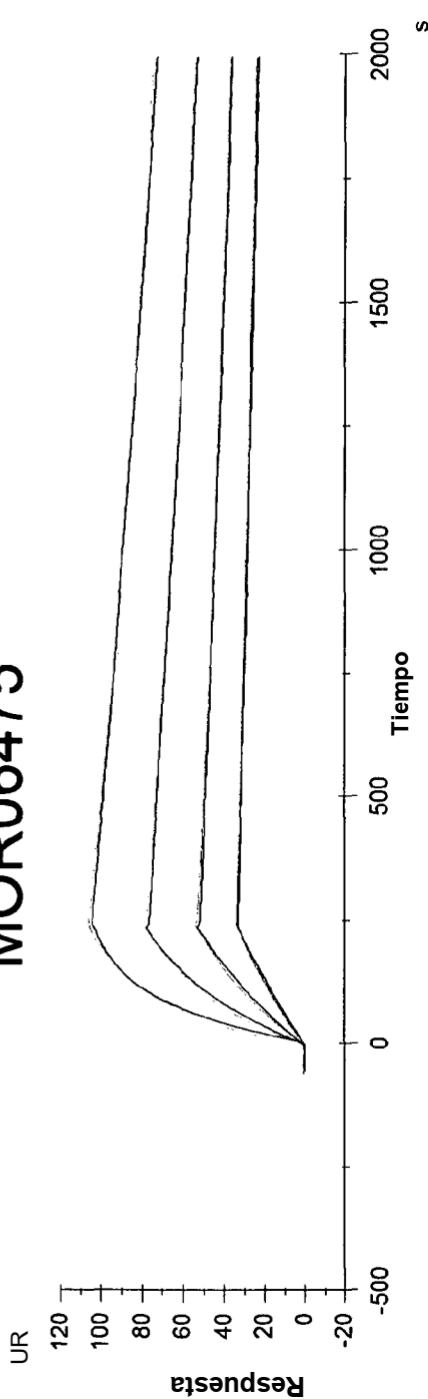
MOR08168 IgG LALA 6475scFv**MOR06475**

Fig. 26C

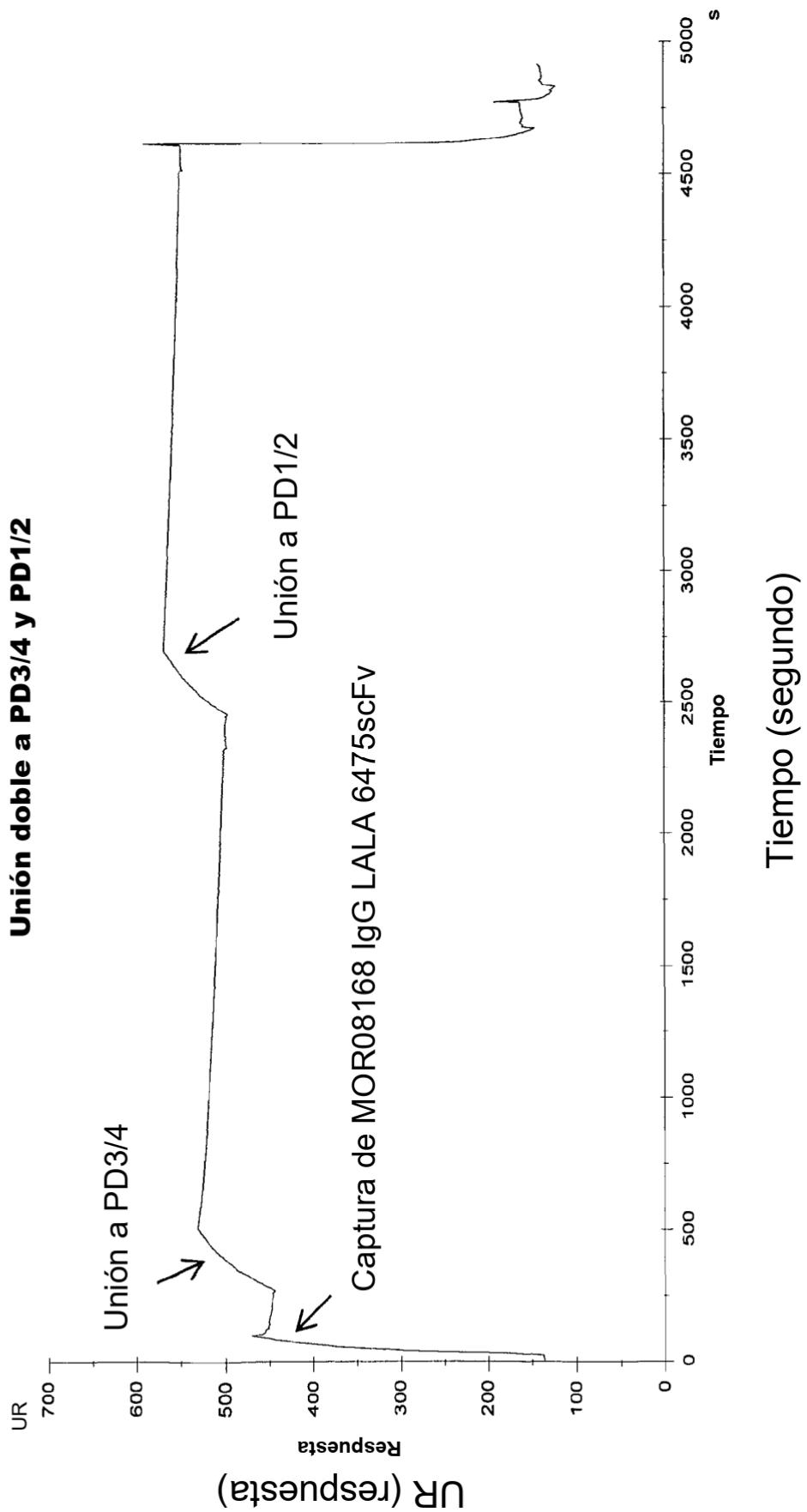


Fig. 27

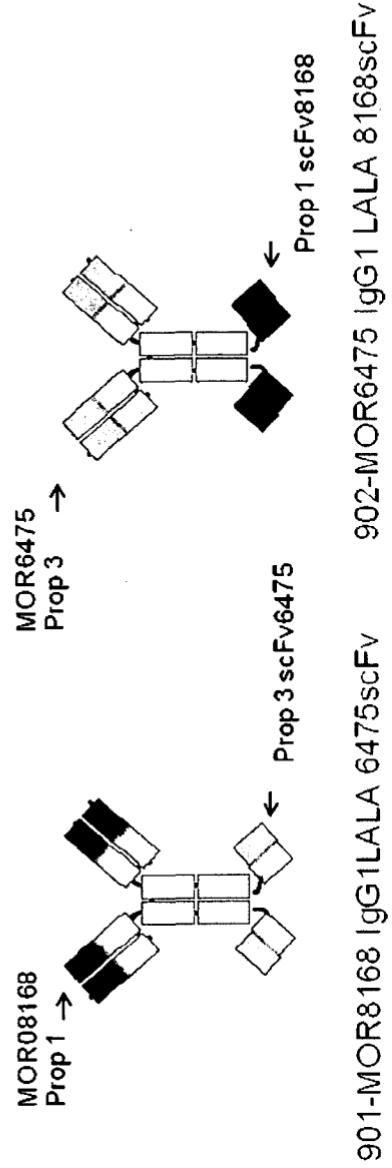


Fig. 28

a. Efecto de secuencias líder



b. Efecto de construcciones y cepas bacterianas

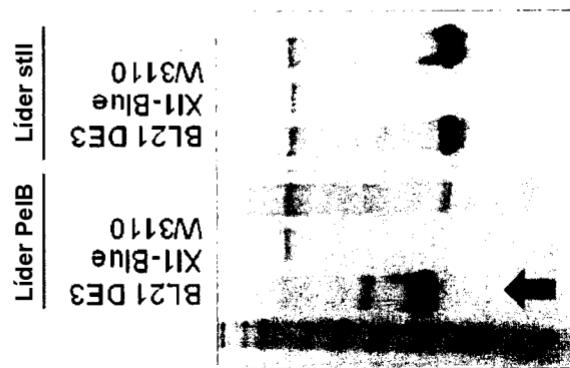


Fig. 29

Tm de mutaciones puntuales únicas en scFv06475			
ID de la construcción	mutación ^a	Tm en proteína Tm en proteína de <i>E. coli</i> de mamífero	
scFv06475 TS		59	61
6475-S2	VH:G34V	61	64
6475-S3	VH:I37F	61	64,5
6475-S6	VH:V85E	60	62,5
6475-S8	VH:M95F	61,5	64,5
6475-S9	VL:D93N	59,5	60,5

^aSe han usado los sistemas de numeración tanto de Kabat como de Chothia. La numeración es la misma para todas las mutaciones excepto VH: G34V en scFv06475. Esta sería VH: G32V en el sistema de numeración de Chothia. El sistema de numeración en el texto es el sistema de Kabat.

Fig. 30**Tm de mutaciones puntuales únicas en scFv08168**

ID de la construcción	mutación	Tm en proteína de <i>E. coli</i> ^a
TS	TS	48,50
B02	VH:V033N	50,50
B03-S1	VH:I034M	56,00
B04	VH:I034F	52,50
C05	VH:S049A	54,00
C07	VH:G050S	51,50
C08	VH:W052aG	55,50
C10	VH:H058Y	52,00
F11	VL:V047L	51,00
G02	VL:G064V	50,50
G07	VL:T078V	51,00

^aLas proteínas se expresaron en una cepa de *Acella*.

Las muestras se analizaron mediante DSF sin retirada de imidazol.

Fig. 31

Tm de mutaciones únicas frente a dobles en scFv08168

ID de la construcción	mutación	Tm en proteína de <i>E. coli</i>	Tm en proteína de mamífero	Tm en proteína de mamífero
scFv08168 TS	TS	48,50	49	49
scFv08168 B02	VH:V33N	50,50		
scFv08168 B03-S1	VH:I34M	56,00	57	56,5
scFv08168 B04	VH:I34F	52,50		
scFv08168 C05	VH:S49A	54,00		
scFv08168 C07	VH:G50S	51,50		
scFv08168 C10	VH:H58Y	52,00		
scFv08168 F11	VL:V47L	51,00		
scFv08168 G02	VL:G64V	50,50		
scFv08168 G07	VL:T78V	51,00		

^aLas proteínas se expresaron en una cepa de *Acetil/a*. Las muestras se analizaron mediante DSF sin retirada de imidazol.

^bLas proteínas se expresaron en células en suspensión 293T. Las muestras se analizaron mediante DSF sin retirada de imidazol.

Fig. 31 continuación

Tm de mutaciones únicas frente a dobles en scFv08168

ID de la construcción	mutación	Tm en proteína de <i>E. coli</i> ^a	Tm en proteína de mamífero	Tm en proteína de mamífero
scFv08168 D1	VH S49A. I34I _b	61	51,5	62,5
scFv08168 D2	VH S49A. I34F	57,5	58	58,5
scFv08168 D4	VH I34M. G50S	59,5	59,5	60
scFv08168 D5	VH I34M. H58Y	59	59	59
scFv08168 D6	VH I34M. V48I	57	56	57,5
scFv08168 D7	VH I34M. VL S22T	57	57	58
scFv08168 D8	VH I34M. VL V47L	57,5	56	58,5
scFv08168 D9	VH I34M. V - G64V	57,5	58,5	57,5

^aLas proteínas se expresaron en una cepa de *Acella*. Las muestras se analizaron mediante DSF sin retirada de imidazol.^bLas proteínas se expresaron en células en suspensión 293T. Las muestras se analizaron mediante DSF sin retirada de imidazol.

Fig. 32

Actividad de scFv06475, scFv08168 y las variantes en diferentes ensayos					
ID de la construcción	Mutaciones	CE50 por ELISA nM	Afinidad por Proteon nM	CI50 por ensayo STF para determinar la inhibición de Wnt1 (nM)	CI50 por ensayo STF para determinar la inhibición de Wnt3 (nM)
scFv06475 TS		0,76	-	-	1,48
scFv06475-S2	VH:G34V	27,4	-	-	-
scFv06475-S3	VH:I37F	4,3	-	-	-
scFv06475-S6	VH:V85E	0,73	-	-	1,33
scFv06475-S8	VH:M95F	1,0	-	-	0,96
scFv06475-S9	VL:D93N	0,88	-	-	-
scFv08168 TS		2,04	3,82	7,41	-
scFv08168 B03-S1	VH:I34M	0,98	-	5,19	-
scFv08168-D1	VH S49A, I34M	1,61	2,55	2,44	-
scFv08168-D2	VH S49A, I34F	1,68	-	2,59	-
scFv08168-D4	VH I34M, G50S	1,47	-	5,56	-
scFv08168-D5	VH I34M, H58Y	1,22	-	-	-
scFv08168-D6	VH I34M, V48I	1,24	-	0,74	-
scFv08168-D7	VH I34M, VL S22T	1,15	-	4,81	-
scFv08168-D8	VH I34M, VL V47L	0,91	-	-	-
scFv08168-D9	VH I34M, VL G64V	1,26	-	11,11	-

Fig. 33

Ejemplos seleccionados de mutaciones estabilizadoras

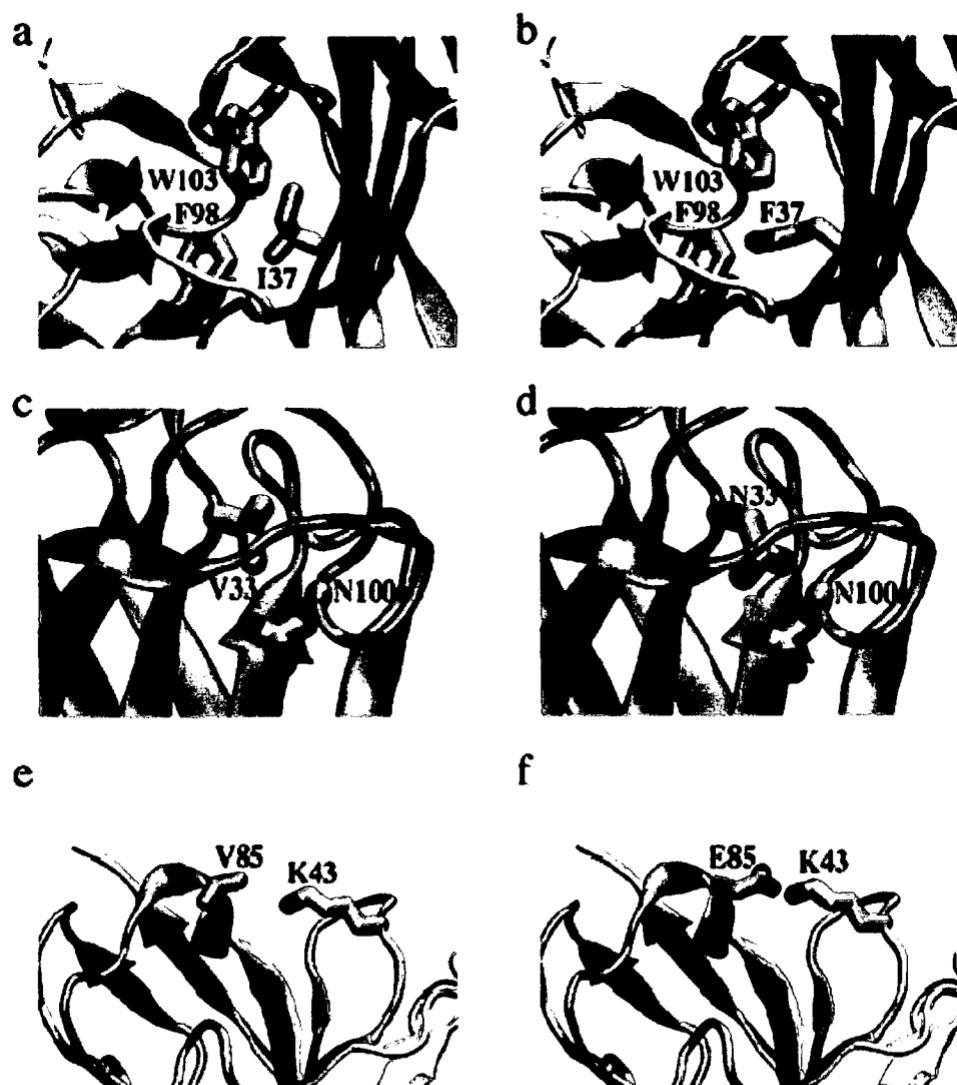


Fig. 34

Medición de la termoestabilidad de fusión de HSA y moléculas biparatópicas basadas en IgG

T_m por DSF (ProteoSTAT) *T_m* por DSC

MOR6475 IgG1-scFv8168 (902 ts) 47,72,5 ND

MOR6475 IgG1-scFv8168 (902 mutante) 62,76 ND
