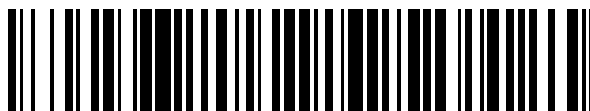


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 244**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2010 PCT/US2010/030039**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO10117980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2010 E 10712681 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2417158**

54 Título: **Anticuerpos DKK-1**

30 Prioridad:

**10.04.2009 US 168411 P**

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

**28.11.2017**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**CHEDID, MARCIO;  
DARLING, RYAN, JAMES;  
GALVIN, RACHELLE, JEANETTE y  
SWANSON, BARBARA, ANNE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 644 244 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

## Anticuerpos DKK-1

La presente invención se refiere a anticuerpos humanos manipulados contra DKK-1 y a su uso en el tratamiento de enfermedades en las que la patogenia está mediada por DKK-1.

- 5 Dickkopf-1 (Dkk-1) es un miembro de la familia de proteínas dickkopf que han demostrado ser reguladores negativos de la vía de señalización Wnt canónica. La vía desempeña un papel central en el desarrollo y la formación de hueso. Dkk-1 inhibe la señalización Wnt a través de su interacción con el correceptor Wnt LRP5 o LRP6 y las proteínas kremen. Dkk-1 impide que los miembros de la vía Wnt interaccionen con LRP5 o LRP6, evitando así la transducción de señal mediada por Wnt. DKK1 ha demostrado también que interviene en los cánceres con metástasis óseas, entre ellos mieloma múltiple, carcinoma de mama, carcinoma renal y cáncer de pulmón no microcítico.

El documento WO-2007/084.344 describe anticuerpos que se unen a la proteína Dickkopf (DKK-1) que se usan para tratar células con condiciones osteolíticas y, en particular, para tratar lesiones osteolíticas asociadas con el cáncer.

- 15 También se han descrito anticuerpos que se unen a Dkk-1 (por ejemplo, véase el documento WO2006/0.165.373), sin embargo, existe todavía la necesidad de anticuerpos humanos manipulados DKK-1 terapéuticos que inhiban la interacción de Dkk-1 con LRP5 y LRP6. Además, en vista de la intervención de Dkk-1 en la regulación de la formación de hueso, existe la necesidad de anticuerpos anti-DKK-1 humanos manipulados terapéuticos para su uso en la cicatrización del hueso. Además, dada la participación de Dkk-1 en los cánceres, existe la necesidad de anticuerpos anti-DKK-1 humanos manipulados para tratar cánceres, incluyendo mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.

- 20 Yaccoby Shmeul y col., Blood, American Society of Hematology, US LNKD\_D01: 10.1182/BLOOD\_2006\_09\_047712, Vol. 109, nº 5, 1 de marzo de 2007, páginas 2106-2111, XP002485200 describe actividad de osteoblastos simulada por DKK-1, reducción de la osteoclastogénesis y promoción de formación de hueso en huesos mielomatosos y no mielomatosos.

- 25 Los anticuerpos de la presente invención son antagonistas de DKK-1 útiles terapéuticamente que poseen un conjunto de propiedades convenientes. Los anticuerpos humanos manipulados de la presente invención muestran una alta afinidad (Kd) por DKK-1 humano, DKK-1 de *Cynomolgus*, DKK-1 de rata, DKK-1 de ratón y DKK-1 de conejo. Los anticuerpos de la presente invención bloquean la inhibición mediada por DKK-1 de fosfatasa alcalina, un marcador de la actividad de osteoblastos. Además, los anticuerpos de la presente invención muestran un aumento en la densidad de masa ósea en las cortezas anterior y posterior en un modelo *in vivo* de defecto cortical y muestran una importante inhibición del crecimiento de xenoinjertos de pulmón no microcíticos *in vivo*.

- 30 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que LCDR1 presenta la SEQ ID NO: 5, LCDR2 presenta la SEQ ID NO: 8, LCDR3 presenta la SEQ ID NO: 7, HCDR1 presenta la SEQ ID NO: 1, HCDR2 presenta la SEQ ID NO: 2 y HCDR3 presenta la SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento del cáncer.

Preferentemente, el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según la presente invención se usa en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer se selecciona entre mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.

- 40 Preferentemente, el anticuerpo DKK-1 humano manipulado es para su uso según la presente invención y en el que la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

- 45 Más preferentemente, el anticuerpo DKK-1 humano manipulado es para su uso según la presente invención y en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

- 50 El anticuerpo DKK-1 humano manipulado es preferentemente para su uso según la presente invención y que comprende dos cadenas ligeras en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, y dos cadenas pesadas en las que cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

- 55 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que LCDR1 presenta la SEQ ID NO: 5, LCDR2 presenta la SEQ ID NO: 8, LCDR3 presenta la SEQ ID NO: 7, HCDR1 presenta la

SEQ ID NO: 1, HCDR2 presenta la SEQ ID NO: 2 y HCDR3 presenta la SEQ ID NO: 4 junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del cáncer.

Preferentemente, la composición farmacéutica es para su uso según la presente invención en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer se selecciona entre mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.

La composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede comprender opcionalmente además otros ingredientes terapéuticos.

La presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una  $K_d$  a 37°C inferior a  $5,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33) y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32).

La presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión del mismo en el que LCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 5, LCDR2 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 47, LCDR3 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 49, HCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 1, HCDR2 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 2 y HCDR3 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 44.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de cáncer que comprende la administración de un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.

La presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en la presente memoria descriptiva, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  inferior a  $1,5 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29). Más preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  inferior a  $1,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29). De forma más preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  inferior a  $5,0 \times 10^{-12}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29). Más preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  entre  $0,5 \times 10^{-12}$  M y  $1,5 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29). De forma más preferida, la presente invención proporciona el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  entre  $1,0 \times 10^{-12}$  M y  $1,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29). Los valores  $K_d$  se establecen mediante un equilibrio de unión a 37°C tal como se describe en el Ejemplo 2.

La presente invención proporciona también un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en la presente memoria descriptiva, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  inferior a  $5,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33) y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32). Más preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  inferior a  $3,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33) y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32). De forma más preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  inferior a  $2,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31) y DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33). Más preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  entre  $1,0 \times 10^{-11}$  M y  $5,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33) y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32). De forma más preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo tiene una  $K_d$  entre  $1,5 \times 10^{-11}$  M y  $3,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31) y DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33). Los valores  $K_d$  se establecen por un equilibrio de unión a 37°C tal como se describe en el Ejemplo 2.

Más preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una  $K_d$  inferior a  $3,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de

ratón (SEQ ID NO: 33) y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32). De forma más preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una Kd inferior a  $2,5 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33) y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32). Más preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una Kd inferior a  $2,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33) y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32). De forma más preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una Kd entre  $0,5 \times 10^{-12}$  M y  $3,0 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33) y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32). Más preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una Kd entre  $1,0 \times 10^{-12}$  M y  $2,5 \times 10^{-11}$  M para DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29), DKK-1 de Cynomolgus (SEQ ID NO: 30), DKK-1 de rata (SEQ ID NO: 31), DKK-1 de ratón (SEQ ID NO: 33), y DKK-1 de conejo (SEQ ID NO: 32). Los valores Kd se establecen por un equilibrio de unión a 37°C tal como se describe en el Ejemplo 2.

La presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las regiones de determinación de complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que LCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 5, HCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 1 y HCDR2 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 2.

La presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión del mismo en el que LCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 46, LCDR2 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 48, LCDR3 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 50, HCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 1, HCDR2 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 43 y HCDR3 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 45. La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión del mismo en el que LCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 5, LCDR2 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 47, LCDR3 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 49, HCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 1, HCDR2 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 2 y HCDR3 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 44.

La presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión del mismo en el que LCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 5, LCDR2 tiene una secuencia amino seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10, LCDR3 tiene una secuencia amino seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9, HCDR1 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 1, HCDR2 tiene la secuencia amino de SEQ ID NO: 2 y HCDR3 tiene una secuencia amino seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en:

(i) LCDR1 presenta la SEQ ID NO: 5, LCDR2 presenta la SEQ ID NO: 6, LCDR3 presenta la SEQ ID NO: 7, HCDR1 presenta la SEQ ID NO: 1, HCDR2 presenta la SEQ ID NO: 2 y HCDR3 presenta la SEQ ID NO: 3,

(ii) LCDR1 presenta la SEQ ID NO: 5, LCDR2 presenta la SEQ ID NO: 8, LCDR3 presenta la SEQ ID NO: 7, HCDR1 presenta la SEQ ID NO: 1, HCDR2 presenta la SEQ ID NO: 2 y HCDR3 presenta la SEQ ID NO: 4,

(iii) LCDR1 presenta la SEQ ID NO: 5, LCDR2 presenta la SEQ ID NO: 6, LCDR3 presenta la SEQ ID NO: 9, HCDR1 presenta la SEQ ID NO: 1, HCDR2 presenta la SEQ ID NO: 2 y HCDR3 presenta la SEQ ID NO: 3,

(iv) LCDR1 presenta la SEQ ID NO: 5, LCDR2 presenta la SEQ ID NO: 10, LCDR3 presenta la SEQ ID NO: 9, HCDR1 presenta la SEQ ID NO: 1, HCDR2 presenta la SEQ ID NO: 2 y HCDR3 presenta la SEQ ID NO: 3

La presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 y la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

## ES 2 644 244 T3

La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.

5 La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la LCVR y la HCVR comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en:

10 (i) una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

(ii) una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

15 (iii) una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

(iv) una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

20 La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado comprende una cadena ligera en la que la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22.

25 La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado, en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado comprende una cadena pesada en la que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

30 Más preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado, en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera seleccionada entre el grupo que consiste en

(i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19,

(ii) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,

35 (iii) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y

(iv) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

40 La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado que comprende dos cadenas ligeras en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, y dos cadenas pesadas en las que cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado que comprende dos cadenas ligeras en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, y dos cadenas pesadas en las que cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

45 La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado que comprende dos cadenas ligeras en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y dos cadenas pesadas en las que cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

50 La presente invención proporciona preferentemente un anticuerpo DKK-1 humano manipulado que comprende dos cadenas ligeras en las que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, y dos cadenas pesadas en las que cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

La presente invención proporciona también un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que compite con el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para unión a DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29) tal como se determina por medio de un ensayo de competencia de anticuerpos.

- 5 La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

10 El anticuerpo de la presente invención puede usarse en un procedimiento de cicatrización de hueso que comprende la administración de un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de cáncer que comprende la administración de un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en el que el cáncer se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.

Además, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para su uso en terapia. Preferentemente, la presente invención proporciona un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.

Además, la presente invención proporciona también el uso de un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer, en el que el cáncer se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.

## Definiciones

Un anticuerpo de longitud completa tal como existe en forma natural es una molécula de inmunoglobulina que comprende 2 cadenas pesadas (H) y 2 cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. La parte del extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100-110 aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos por medio de las regiones de determinación de complementariedad (CDR) contenidas en los mismos. La parte del extremo carboxi de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función de efector.

Las CDR están intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco ("FR"). Cada región variable de cadena ligera (LCVR) y cada región variable de cadena pesada (HCVR) está compuesta por 3 CDR y 4 FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las 3 CDR de la cadena ligera se refieren como "LCDR1, LCDR2 y LCDR3" y las 3 CDR de la cadena pesada se refieren como "HCDR1, HCDR2 y HCDR3". Las CDR contienen la mayor parte de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La numeración y la posición de los residuos de aminoácidos de las CDR en las regiones LCVR y HCVR están de acuerdo con la bien conocida convención de numeración de Kabat.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda, y se caracterizan por una región constante particular tal como se conoce en la técnica. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, y definen el isotipo de un anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, respectivamente. Los anticuerpos IgG pueden dividirse adicionalmente en subclases, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante particular con una secuencia bien conocida en la técnica.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpo monoclonal" (AMc) se refiere a un anticuerpo que procede de una copia o clon único que incluye, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o de fagos, y no el procedimiento por el que se produce. Los AMc de la presente invención existen preferentemente en una población homogénea o sustancialmente homogénea. Los AMc completos contienen 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras. Los "fragmentos de unión a antígeno" de dichos anticuerpos monoclonales incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv monocatenarios. Los anticuerpos monoclonales y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención pueden producirse, por ejemplo, por tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación de fagos, tecnologías sintéticas, por ejemplo, injerto de CDR, o combinaciones de dichas tecnologías, u otras tecnologías conocidas en la técnica. Por ejemplo, los ratones pueden estar inmunizados con DKK-1 humano o fragmentos del mismo, los anticuerpos resultantes pueden recuperarse y purificarse, y la determinación de si poseen propiedades de unión o funcionales similares o

iguales a los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva puede evaluarse por los procedimientos descritos en los Ejemplos mostrados a continuación. Los fragmentos de unión a antígeno también pueden prepararse por procedimientos convencionales. Los procedimientos para producir y purificar anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, capítulos 5-8 y 15, ISBN 0-87969-314-2.

La frase "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene dominios de diferentes especies (generalmente 2 especies). El anticuerpo V es un anticuerpo quimérico en el que los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada contienen residuos de un anticuerpo murino, mientras que el dominio de cadena ligera de región constante contiene residuos que comprenden una cadena ligera kappa de rata y los dominios de cadena pesada de región constante contienen residuos que comprenden un anticuerpo IgG1 de rata. El anticuerpo V es una quimera murina/de rata y se usa en estudios para reducir la probabilidad de respuesta inmunitaria en modelos preclínicos a largo plazo.

La frase "anticuerpos humanos manipulados" se refiere a anticuerpos monoclonales que tienen propiedades de unión y funcionales según la invención, y que tienen regiones marco que son sustancialmente humanas o totalmente humanas alrededor de las CDR obtenidas de un anticuerpo no humano. Los "fragmentos de unión a antígeno" de dichos anticuerpos humanos manipulados incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv monocatenarios. "Región marco" o "secuencia marco" se refiere a una cualquiera de las regiones marco 1 a 4. Los anticuerpos humanos manipulados y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprendidos por la presente invención incluyen moléculas en las que una cualquiera o más de regiones marco 1 a 4 son sustancial o totalmente humanas, es decir, en las que está presente cualquiera de las posibles combinaciones de regiones marco individuales sustancial o totalmente humanas 1 a 4. Por ejemplo, esto incluye moléculas en las que la región marco 1 y la región marco 2, la región marco 1 y la región marco 3, la región marco 1, 2 y 3, etc., son sustancial o totalmente humanas. Los marcos sustancialmente humanos son aquellos que tienen al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias con una secuencia marco de línea germinal humana conocida. Preferentemente, los marcos sustancialmente humanos tienen al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o aproximadamente el 99% de identidad de secuencias con una secuencia marco de línea germinal humana conocida.

Los marcos totalmente humanos son aquellos que son idénticos a una secuencia marco de línea germinal humana conocida. Las secuencias de línea germinal marco humana pueden obtenerse de ImMunoGeneTics (IMGT) por medio de su página web <http://imgt.cines.fr>, o de *The Immunoglobulin FactsBook* de Marie-Paule Lefranc y Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Por ejemplo, los marcos de cadena ligera de línea germinal pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, L1, L11, L12, L2, L5, L15, L6, L8, 012, 02 y 08, y las regiones marco de cadena pesada de línea germinal pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VHI-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VHI-18, VHI-69, VI-13-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59 y VH5-51.

Pueden generarse anticuerpos humanos manipulados además de los descritos en la presente memoria descriptiva que muestran propiedades funcionales similares según la presente invención usando varios procedimientos diferentes. Los compuestos de anticuerpos específicos descritos en la presente memoria descriptiva pueden usarse como plantillas o compuestos de anticuerpos progenitores para preparar compuestos de anticuerpos adicionales. En un enfoque, las CDR de compuesto de anticuerpo progenitor se injertan en un marco humano que tiene una alta identidad de secuencias con el marco del compuesto del anticuerpo progenitor. La identidad de secuencias del nuevo marco será generalmente al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 99% idéntica a la secuencia del marco correspondiente en el compuesto del anticuerpo progenitor. Este injerto puede producir una reducción en la afinidad de unión en comparación con el del anticuerpo progenitor. Si así sucede, el marco puede experimentar mutación restauradora en el marco progenitor en ciertas posiciones basándose en criterios específicos descritos por Queen y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2869. Las referencias adicionales que describen procedimientos útiles en la humanización de anticuerpos de ratón incluyen las patentes de EE.UU. n<sup>o</sup> 4.816.397; 5.225.539 y 5.693.761; los programas informáticos ABMOD y ENCAD tal como se describe en Levitt (1983) *J. Mol. Biol.* 168: 595-620; y el procedimiento de Winter y col. (Jones y col. (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332: 323-327; y Verhoeyen y col. (1988) *Science* 239: 1534-1536.

La identificación de residuos que se considerarán para mutación restauradora puede realizarse del modo siguiente:

Cuando un aminoácido se encuadra en la siguiente categoría, el aminoácido marco de la secuencia de línea germinal humana que se está usando (el "marco aceptor") es sustituida por un aminoácido marco de un marco del compuesto del anticuerpo progenitor (el "marco donador"):

(a) el aminoácido en la región marco humana del marco aceptor es infrecuente para marcos humanos en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es típico para marcos humanos en esa posición;

(b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o

(c) cualquier átomo de cadena lateral de un aminoácido marco está a menos de aproximadamente 5-6 angstroms (entre centros) de cualquier átomo de un aminoácido de CDR en un modelo tridimensional de inmunoglobulina.

5 Cuando cada uno de los aminoácidos en la región marco humana del marco aceptor y un aminoácido correspondiente en el marco donador es en general infrecuente para marcos humanos en esa posición, dicho aminoácido puede ser sustituido por un aminoácido típico para marcos humanos en esa posición. Este criterio de mutación restauradora permite recuperar la actividad del compuesto del anticuerpo progenitor.

10 Otro enfoque para generar anticuerpos humanos manipulados que muestran propiedades funcionales similares a los compuestos de anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva implica la mutación aleatoria de aminoácidos en las CDR injertadas sin cambiar el marco, y el cribado de las moléculas resultantes según su afinidad de unión y otras propiedades funcionales que son tan buenas o mejores que las de los compuestos de anticuerpos progenitores. También pueden introducirse mutaciones individuales en cada posición de aminoácido en cada CDR, seguido por la valoración de los efectos de dichas mutaciones en la afinidad de unión y otras propiedades funcionales. Las mutaciones individuales que producen propiedades mejoradas pueden combinarse para evaluar sus efectos en combinación mutua.

15 Además, es posible una combinación de los dos enfoques anteriores. Después de injerto de CDR, se pueden someter a mutación restauradora regiones marco específicas además de introducir cambios de aminoácidos en las CDR. Esta metodología se describe en Wu y col. (1999) J. Mol. Biol. 294: 151-162.

20 Aplicando las enseñanzas de la presente invención, un experto en la materia puede usar técnicas comunes, por ejemplo, mutagenia dirigida al sitio, para sustituir aminoácidos en las secuencias marco y CDR descritas en la presente memoria descriptiva y generar así secuencias de aminoácidos de regiones variables obtenidas de las secuencias de la presente memoria descriptiva. Todos los aminoácidos alternativos de ocurrencia natural pueden introducirse en un sitio de sustitución específico. Los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden usarse a continuación para cribar estas secuencias de aminoácidos de regiones variables adicionales con el fin de identificar secuencias que tienen las funciones *in vivo* indicadas. De este modo, pueden identificarse secuencias adicionales adecuadas para preparar anticuerpos humanos manipulados y porciones de unión a antígenos de los mismos de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la sustitución de aminoácidos en los marcos se limita a una, dos o tres posiciones en una cualquiera o más de las 4 regiones marco de cadena ligera y/o cadena pesada descritas en la presente memoria descriptiva. Preferentemente, la sustitución de aminoácidos en las CDR se limita a una, dos o tres posiciones en una cualquiera o más de las 3 CDR de cadena ligera y/o de cadena pesada. Son posibles también combinaciones de los diversos cambios en estas regiones marco y CDR descritas anteriormente. Con la máxima preferencia, estas técnicas se usan para generar secuencias de aminoácidos de regiones variables adicionales usando las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera variables descritas en las SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14 respectivamente.

35 Los anticuerpos humanos manipulados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que "compiten" con las moléculas descritas en la presente memoria descriptiva son aquellos que se unen a DKK-1 humano (SEQ ID NO: 29) en un sitio o sitios que son idénticos a, o que se solapan con, el sitio o sitios en los que se unen las moléculas de la presente memoria descriptiva. Los anticuerpos humanos manipulados en competencia o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden identificarse, por ejemplo, por medio de un ensayo de competencia de anticuerpos. Por ejemplo, una muestra de DKK-1 humano purificado o parcialmente purificado (SEQ ID NO: 29) está unida a un vehículo sólido. A continuación, se añade un anticuerpo descrito en la presente memoria descriptiva y un anticuerpo monoclonal de prueba o un fragmento de unión a antígeno, con la prueba o el anticuerpo de la presente invención marcados. Si el anticuerpo marcado y el anticuerpo no marcado se unen a sitios separados y discretos en DKK-1, el anticuerpo marcado se unirá al mismo nivel esté presente o no el anticuerpo en competencia sospechado. Sin embargo, si los sitios de interacción son idénticos o están solapados, el anticuerpo no marcado competirá, y la cantidad de anticuerpo marcado unida al antígeno se reducirá. Si el anticuerpo no marcado está presente en exceso, no se unirá el anticuerpo marcado. Para los fines de la presente invención, los anticuerpos humanos manipulados en competencia o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos son aquellos que disminuyen la unión de los anticuerpos de la presente invención a DKK-1 en aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o aproximadamente el 99%. Los detalles de los procedimientos para llevar a cabo dichos ensayos de competencia son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, páginas 567-569, ISBN 0-87969-314-2. Dichos ensayos pueden hacerse cuantitativos usando anticuerpos purificados. Se establece una curva estándar valorando un anticuerpo frente a una versión marcada de sí mismo. Se valora la capacidad de un anticuerpo monoclonal en competencia no marcado o un fragmento de unión a antígeno del mismo para inhibir la unión de la molécula marcada a la placa. Se representan gráficamente los resultados y se comparan las concentraciones necesarias para conseguir el grado deseado de inhibición de unión. Puede determinarse si los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con anticuerpos humanos manipulados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención en dichos ensayos de competencia poseen propiedades funcionales idénticas similares de los anticuerpos humanos



manipulados de la presente invención por medio de los procedimientos descritos en los Ejemplos mostrados en la presente memoria descriptiva.

El término "inhibir" significa capacidad de antagonizar, prohibir, prevenir, limitar, ralentizar, perturbar, eliminar, detener, reducir o revertir sustancialmente los efectos biológicos de DKK-1.

5 El término "que trata" (o "tratar" o "tratamiento") se refiere a procedimientos que implican ralentización, interrupción, detención, control, parada, reducción o reversión de la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad, pero no implica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas, afecciones o trastornos relacionados con la enfermedad asociados con la actividad de DKK-1.

10 El término "que previene" (o "prevenir" o "prevención") significa prohibir, limitar o inhibir la incidencia u ocurrencia de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad. Los episodios agudos y las afecciones crónicas pueden tratarse o prevenirse. En un episodio agudo, se administra un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo al inicio de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad, y se interrumpe cuando termina el episodio agudo. En cambio, un síntoma, trastorno, afección o enfermedad crónicos se tratan durante un marco temporal más prolongado.

15 El término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de anticuerpo de la presente invención que, tras la administración de una única o múltiples dosis a un paciente, proporciona el tratamiento o prevención deseados. Las cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos de anticuerpos de la presente invención pueden comprender una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg por dosis individual. Una cantidad terapéuticamente eficaz para cualquier paciente individual puede ser determinada por el proveedor de atención sanitaria monitorizando el efecto de los compuestos de anticuerpos en un biomarcador.

20 El término "cicatrización del hueso" se refiere a la estimulación de formación de hueso en puntos de lesión bloqueando el DKK-1. Los ejemplos de indicaciones de cicatrización del hueso incluyen, pero no se limitan a, curación de fracturas, fijación/retención de implantes y fijación/retención de implantes dentales.

25 Los anticuerpos humanos manipulados de la presente invención pueden usarse como medicamentos en medicina humana, administrados por diversas vías. Con la máxima preferencia, dichas composiciones son para administración parenteral. Dichas composiciones farmacéuticas pueden prepararse por procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practise of Pharmacy, 19<sup>a</sup> ed. (1995), A. Gennaro y col., Mack Publishing Co.) y comprenden un anticuerpo humano manipulado tal como se describe en la presente memoria descriptiva, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Los resultados de los ensayos siguientes muestran que los anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención son útiles como inhibidor de DKK-1. Los anticuerpos de la presente invención poseen un conjunto de propiedades convenientes. Por ejemplo, el Anticuerpo II de la presente invención tiene una mayor estabilidad química y física, y solubilidad. Se realizan estudios acelerados para evaluar la estabilidad química de los anticuerpos incubando los anticuerpos de la presente invención en diferentes condiciones tampón (variación de pH y NaCl) e incubando a 4 °C, 25 °C y 40 °C durante 4 semanas. Las modificaciones químicas de los anticuerpos de la presente invención se detectan por cromatografía de intercambio de cationes ("CEX") para separar las variantes de carga (por ejemplo., desamidación de asparagina en ácido aspártico) y análisis LC-MS para identificar sitios específicos de degradación. El Anticuerpo II tiene la mínima cantidad de degradación detectada por CEX y este resultado es confirmado adicionalmente por datos de LC-MS que muestran que los tres residuos de asparagina en las CDR tenían la mínima cantidad de desamidación en comparación con los otros anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva después de incubación de 4 semanas a 40 °C en tampón de pH 8. La solubilidad para el Anticuerpo II es más favorable que con el Anticuerpo I cuando se formula a pH 6 + NaCl 150 mM. Además, el Anticuerpo II mantenía una solubilidad > 105 mg/mL cuando se almacenó a 4 °C, mientras que la solubilidad para el Anticuerpo I era de sólo 48 mg/mL y precipitó en estas mismas condiciones. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "CE50" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta máxima posible para ese agente. "Kd" se refiere a la constante de disociación en equilibrio que puede calcularse mediante la fórmula:  $k_{off}/k_{on} = Kd$ .

### Ejemplo 1 - Producción de anticuerpos

50 Los Anticuerpos I, II, III y IV pueden prepararse y purificarse del modo siguiente. Se transfecta de forma transitoria o estable una célula hospedadora apropiada, tal como HEK 293 EBNA o CHO, con un sistema de expresión para secretar anticuerpos usando una proporción de vector HC:LC predeterminada óptima o un único sistema de vectores que codifica al mismo tiempo HC, por ejemplo SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24, y LC, por ejemplo SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28. Se purifica el medio aclarado, en el que se ha secretado el anticuerpo, usando cualquiera de las numerosas técnicas usadas comúnmente. Por ejemplo, el medio puede aplicarse cómodamente a una columna de Sefarosa FF de Proteína A o G que se ha equilibrado con un tampón compatible, tal como suero salino con tampón de fosfato (pH 7,4). Se lava la columna para eliminar los componentes de unión no específicos. Se eluye el anticuerpo unido, por ejemplo, por gradiente de pH (tal como tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8 a tampón de citrato de sodio 0,1 M pH 3,0). Se detectan las fracciones de anticuerpo, por

ejemplo, por SDS-PAGE, y a continuación se almacenan en reserva. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso pretendido. El anticuerpo puede concentrarse y/o filtrarse en condiciones estériles usando técnicas comunes. El agregado soluble y los multímeros pueden eliminarse de manera efectiva mediante técnicas comunes, que incluyen exclusión por tamaños, interacción hidrófoba, intercambio de iones o cromatografía de hidroxipatita. La pureza del anticuerpo después de estas etapas de cromatografía es superior al 99%. El producto puede congelarse inmediatamente a -70°C o puede liofilizarse. A continuación, se proporcionan las secuencias de aminoácidos para estos anticuerpos.

**SEQ ID NO**

Anticuerpo	Cadena pesada	Cadena ligera	HCVR	LCVR
I	17	19	11	13
II	18	20	12	14
III	17	21	11	15
IV	17	22	11	16
V	35	34	37	36

Anticuerpo	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
I	1	2	3	5	6	7
II	1	2	4	5	8	7
III	1	2	3	5	6	9
IV	1	2	3	5	10	9
V	1	38	39	40	41	42

**Ejemplo 2: Medidas de afinidad (Kd) para anticuerpos DKK-1**

Para establecer un equilibrio de unión, se mezcla una concentración constante de anticuerpo con concentraciones variables de DKK-1 His-tagged (SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33) (intervalo 1 nM - 1 pM) en PBS (pH 7,4) + 1 mg/mL de albúmina de suero bovino("BSA") o tampón en solitario y se incubaba durante varios días a 37°C. Se establecen dos conjuntos de reacciones de unión, un conjunto a baja concentración de anticuerpo (3 pM) y un conjunto a alta concentración de anticuerpo (30 ó 50 pM).

Después de establecer el equilibrio, se usa un instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Inst. Inc.) para sondear la fracción de anticuerpo 'libre' (no unido). Brevemente, el DKK-1 His-tagged se acopla de forma covalente con perlas de flujo rápido de Sefarosa 4 activadas por NHS (GE Healthcare) que son empaquetadas por el instrumento para crear una pequeña columna. Las mezclas preequilibradas de anticuerpo + DKK-1 His-tagged se pasan sobre las perlas para capturar sólo anticuerpo libre. La cantidad de anticuerpo libre capturado es proporcional a la concentración libre en las muestras en equilibrio, y se detecta por inyección de un anticuerpo secundario marcado por fluorescencia. Los conjuntos de datos de concentraciones de anticuerpo altas y bajas se ajustan globalmente usando análisis de curva n en el software KinExA. Este ajuste devuelve un valor de Kd, así como el intervalo de confianza al 95%.

**Tabla 1: Afinidad de Anticuerpo II a DKK-1 de distintas especies**

Especie DKK-1	Kd (pM)	Intervalo de confianza al 95% para Kd (pM)
Human	3,3	1,4 - 7,5
Cynomolgus	14	8,4 - 26
Rata	8,4	3,9 - 23

Murina	7,0	4,7 - 11
Conejo	17	11 - 27

### Ejemplo 3: Efecto de los anticuerpos DKK-1 en el ensayo de fosfatasa alcalina C2C12

La señalización Wnt canónica es importante para la diferenciación y la actividad de osteoblastos. Wnt-3a de CM (Medios Acondicionados) combinado con BMP-4 induce a las células C2C12 de ratón pluripotentes a diferenciarse en osteoblastos con un criterio de valoración mensurable de fosfatasa alcalina ("AP"), un marcador de actividad de osteoblastos. DKK-1, un inhibidor de la señalización Wnt canónica, inhibe la diferenciación y la producción de AP. Los Anticuerpos DKK-1 de neutralización evitan la inhibición mediada por DKK-1 de AP. Los anticuerpos que bloquean la actividad inhibitoria de DKK-1 previenen la pérdida de actividad de AP.

Las células C2C12 se cultivan en confluencia al 60%-80% en matraces de cultivo de tejidos en medio de crecimiento (Medio Eagle Modificado de Dulbecco ("DMEM") que contiene L-glutamina, suero bovino fetal ("FBS") inactivado por calor al 10%, 1x antibiótico/antimicótico, 1x piruvato de sodio). Las células C2C12 se vuelven a suspender a una concentración de 30.000 células/mL en medio de crecimiento y se añaden 100  $\mu$ L/pocillo a una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos y se incuba durante toda la noche a 37°C, 95% de humedad, CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo se sustituye por 50  $\mu$ L de medio de ensayo (DMEM que contiene L-glutamina, FBS inactivado por calor al 5%, 1x antibiótico/antimicótico, 1x piruvato de sodio). Para estimular la diferenciación (y así inducir la producción de AP), se añaden 100  $\mu$ L de medio de ensayo más 1,5x Wnt-3a CM + BMP-4 (R&D Systems catálogo #314-BP). Esto produce una concentración final de 1x Wnt-3a CM y 25 ng/mL de BMP-4. Los controles negativos contienen células L CM (no Wnt-3a o BMP-4). Las células se incuban a 37°C, 95% de humedad, CO<sub>2</sub> al 5% durante 72 horas. El medio se elimina, se lavan las células con 200  $\mu$ L de solución salina con tampón de fosfato ("PBS"), y se elimina el PBS. Se liofilizan las células 3 veces. Se añaden 100  $\mu$ L de sustrato pNPP (Thermo Scientific catálogo #37621) por pocillo y se incuba la placa a temperatura ambiente. Se lee la absorbancia a 405 nm. Para determinar la concentración de DKK-1 necesaria para inhibir la diferenciación, se valoran moléculas de Dkk-1 de diversas especies para identificar la concentración mínima necesaria para inhibir totalmente la inducción de AP.

La concentración mínima de DKK-1 de cada especie que inhibe totalmente la inducción de AP es la siguiente: DKK-1 humano = 38 nM, DKK-1 de Cynomolgus = 11,4 nM, DKK-1 de rata = 5,8 nM y DKK-1 de conejo = 25,0 nM.

Una vez determinada la concentración de DKK-1 que inhibe totalmente la inducción de AP, se preincuban concentraciones crecientes de un anti-anticuerpo DKK-1 en medio de ensayo con una concentración inhibitoria de Dkk-1 durante 30 minutos a temperatura ambiente. La inducción de AP se determina tal como se describe anteriormente. Los resultados se comunican como una CE50 (nM  $\pm$  error estándar).

El Anticuerpo II bloquea la inhibición mediada por Dkk-1 de AP C2C12. Para el DKK-1 de diversas especies, los CE50 (expresados como nM  $\pm$  error estándar) son los siguientes: ser humano = 9,8  $\pm$  0,41, cynomolgus = 6,4  $\pm$  0,25, rata = 2,9  $\pm$  0,25 y conejo = 6,0  $\pm$  0,32.

### Ejemplo 4: Ensayo in vivo de defecto cortical (DC)

Se someten a ovariectomía ratas Sprague-Dawley hembra de seis meses y se permite la pérdida ósea durante dos meses. Se introducen defectos de 2 mm de diámetro en los fémures izquierdo y derecho mediante un taladro eléctrico con una broca dental de 2 mm. Este orificio se extiende a través de las cortezas anterior y posterior. La cicatrización del hueso se monitoriza longitudinalmente evaluando la densidad de masa ósea ("DMO") a través del uso de tomografía computarizada cuantitativa ("qCT") durante 35 días después de la intervención quirúrgica. Al final del experimento, se sacrifican los animales y se someten los fémures enteros a determinaciones de carga hasta fallo para establecer la resistencia biomecánica de la diáfisis completa. Los anticuerpos se administran por vía subcutánea en las dosis e intervalos indicados.

Se administra la dosis del Anticuerpo II del modo siguiente: 5 mg/kg una vez cada dos semanas empezando un día después de la intervención quirúrgica (Grupo 1), 1 mg/kg (Grupo 2), 5 mg/kg (Grupo 3) o 15 mg/kg (Grupo 4) una vez cada dos semanas empezando nueve días después de la intervención quirúrgica. La DMO se valora mediante qCT en el día 35. El grupo 1 mostró un aumento estadísticamente significativo en DMO en las cortezas anterior y posterior. El Grupo 4 mostró un aumento estadísticamente significativo en DMO en las dos cortezas, aunque los Grupos 2 y 3 mostraron un aumento no significativo en DMO.

### Ejemplo 5: Ensayo de eficacia in vivo en cáncer

Se aclimata a ratones (ratones C.B-17 hembra, modelo inmunodeficiente combinado grave Fox Chase # CB17SC-M) durante una semana en un centro de animales antes del inicio del experimento. Después de la aclimatación, se distribuye aleatoriamente a los ratones en grupos de 10 por tratamiento. Se implantan células de carcinoma pulmonar no microcítico A549 humano en cultivo por vía subcutánea en el flanco trasero de los ratones y se deja que el tumor alcance un volumen tumoral medio  $\sim$  100 mm<sup>3</sup>. Se administra Anticuerpo II (1 mg/kg y 5 mg/kg),

anticuerpo IgG de control (1 mg/kg y 5 mg/kg) o vehículo (solución salina con tampón de citrato suplementada con Tween 80 al 0,02%) por medio de inyección subcutánea. Los animales reciben 2 tratamientos separados por 7 días.

Los tumores se miden 2 veces por semana mediante calibres electrónicos para representar gráficamente curvas de crecimiento. Los animales se monitorizan también dos veces por semana para analizar las fluctuaciones en el peso corporal y signos de toxicidad. Las medidas del volumen tumoral mostradas en la tabla 3 se toman en el día 29.

Tal como se muestra en la Tabla 2, los grupos de tratamiento que reciben Anticuerpo II mostraron una inhibición de crecimiento significativa de xenoinjertos de pulmón microcítico A549 humanos in vivo.

**Tabla 2: Eficacia de Anticuerpo II en modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón no microcítico A549**

Grupo de tratamiento	Volumen tumoral $\pm$ Error estándar (mm <sup>3</sup> )	Valor p (relativo al grupo control del vehículo)
Vehículo de citrato	402 $\pm$ 36	-
Control IgG (1 mg/kg)	372 $\pm$ 45	-
Control IgG (5 mg/kg)	492 $\pm$ 72	-
Anticuerpo II (1 mg/kg)	279 $\pm$ 32	0,01 - 0,05
Anticuerpo II (5 mg/kg)	202 $\pm$ 21	< 0,001

#### 10 Ejemplo 6: Ensayo de xenoinjerto in vivo de renormalización angiogénica

Para comprender el mecanismo de la eficacia antitumoral, se efectúa un análisis de imágenes de alto contenido en tumores A549 tratados con Anticuerpo II o IgG de control. Se analizan varios marcadores de base fenotípica en términos cuantitativos y cualitativos para valorar los procedimientos biológicos relevantes de cáncer de angiogénica (CD31 y actina de músculo liso, SMA), inducción de hipoxia (transportador de glucosa 1, GLUT1), proliferación celular (Ki67) y apoptosis (Terminal UDP Nick-End Labeling, TUNEL).

Se aclimatan ratones C.B-17 hembra (Fox Chase SCID) modelo # CB17SC-M de 7 a 8 semanas de vida durante una semana y se deja que ingieran *ad libitum* una dieta normal baja en grasas (4,5%), que se continúa a lo largo de la duración del estudio.

Se cultivan células A549 de origen ATCC y se dividen en medio de Kaighn F-12 (Invitrogen #21127) suplementadas con FBS al 10% (Invitrogen #0, y diluciones 100x de piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y penicilina-estreptomicina (Invitrogen #11360, #11140 y #15140 respectivamente). Se separan y se preparan a una concentración final de 50 x 10<sup>6</sup> células/ml en PBS en el paso 19 con viabilidad del 95%.

Se inyectan 5 x 10<sup>6</sup> células de carcinoma pulmonar humano A549 por vía subcutánea en el flanco de los ratones objeto en una mezcla 1:1 de PBS y Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA). Se realizan medidas del tumor y el peso corporal dos veces por semana. Antes del tratamiento, se aleatoriza a los ratones basándose en el tamaño del tumor usando un algoritmo de aleatorización.

Empezando cuando el tumor llegó a 200 mm<sup>3</sup>, se separan los ratones aleatorizados en 2 grupos de 10 animales y se les administra la dosis subcutánea en el día 1 y de nuevo en el día 8 con 5 mg/kg de Anticuerpo II o el control de IgG4. El estudio se termina 10 días después de la administración de la primera dosis de anticuerpo.

El Anticuerpo II se prepara en solución salina con tampón de citrato (CBS) (citrato 10 mM pH6, NaCl 150 mM y polisorbato al 0,2%). Se proporciona control de IgG4 a 6,0 mg/ml en suero salino con tampón de fosfato (PBS).

Los tumores de xenoinjertos se extirpan en los ratones después de 17 días de dosis y se colocan en fijador Cinc-Tris (BD Pharmingen). Los tumores fijados se procesan, se bloquean en parafina y se seccionan en cortes de 3  $\mu$ m en cortes histológicos estándar. Los cortes histológicos se hornean a 15°C durante 1 hora y después se desparafinan en xileno (4 tratamientos, 10 minutos cada uno). Se hidratan los cortes histológicos a través de una serie de inmersiones en etanol/agua con lavados finales en solución salina con tampón Tris/Tween (TBST). A continuación, se bloquean los cortes histológicos con Bloque de Proteína (DAKO) durante 30 minutos. Para el Panel Tumoral, se tiñen los cortes histológicos con una combinación de Hoechst 33324 (Invitrogen), CD31 antihumano de rata (Pharmingen)/ Alexa-488 anti-rata (Invitrogen), anti-Ki67 de conejo (NeoMarkers)/Alexa 647 anti-conejo (Invitrogen) y rojo TUNEL-TMR (diluido 1:5 en tampón de dilución TUNEL; Roche). Para el Panel de Angiogénica, se tiñen los cortes histológicos con una combinación de Hoechst 33324 (Invitrogen), CD31 anti-humano de rata (Pharmingen)/Alexa-488 anti-rata (Invitrogen), anti-GLUT1 de conejo (Chemicon)/Alexa 647 anti-conejo (Invitrogen) y anti-Actina de músculo liso/Cy3 de ratón (Sigma). Se obtienen imágenes de los cortes histológicos usando un citómetro de exploración láser iCys (CompuCito) y una estación de trabajo Marianas Digital Imaging configurada con

un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert 200M (Intelligent Imaging Innovations). Se realizan comparaciones de datos cuantitativos de los grupos de tratamiento usando el análisis de Dunnet en el software estadístico JMP (SAS).

5 Tal como se muestra en la Tabla 3, los xenoinjertos A549 de animales tratados con IgG de control están moderadamente vascularizados, tienen niveles moderados de miofibroblastos y numerosas áreas focalizadas de hipoxia. Los tumores tratados con IgG de control tienen una red extensa de vasos consistentes en brotes vasculares neoangiogénicos y vasos maduros que están deficientemente cubiertos por pericitos. Los tumores tratados con IgG de control tienen áreas hipóxicas (marcadas por GLUT1) que son zonas claramente demarcadas a cierta distancia de los vasos perfundidos y las áreas necróticas que están todavía más alejadas de los vasos. El tratamiento con Anticuerpo II produce un área de los vasos disminuida, un área de pericitos reducida y una cobertura por pericitos de los vasos disminuida. Sin embargo, este tratamiento no produjo una diferencia significativa en la hipoxia tumoral. 10 Cualitativamente, la vasculatura tumoral tratada con anticuerpo II parece consistir en vasos más pequeños menos en red y con menor cobertura de pericitos que el grupo tratado con IgG de control.

15 Tal como se muestra en la Tabla 3, los tumores tratados con IgG tienen las células tumorales en proliferación distribuidas uniformemente, pero también muestran con frecuencia una o más áreas grandes de necrosis que son avasculares. El tratamiento con Anticuerpo II no produce cambios en la apoptosis y sólo una disminución ligera no significativa en el área de proliferación total. Sin embargo, existe una disminución acusada en el porcentaje de área de células Ki67 de alta intensidad en los tumores tratados con anticuerpo II, lo que podría indicar una menor cantidad de células en la fase del ciclo celular G2.

20 **Tabla 3: Anticuerpo II en ensayo de xenoinjerto *in vivo* de renormalización angiogénica**

Panel fenotípico	Parámetro biológico	Valor IgG de control: valor de tratamiento con anticuerpos II	Significación estadística (valor p de Dunnet)
Panel de angiogenia tumoral	% <b>área de vaso total</b>	10,26: 7,88	0,001
Panel de angiogenia tumoral	% <b>área de vaso funcional</b>	9,84: 7,59	0,0009
Panel de angiogenia tumoral	% <b>área de vaso no funcional</b>	0,42: 0,30	0,1341
Panel de angiogenia tumoral	% <b>vasos cubiertos por pericito</b>	42,44: 30,88	0,0234
Panel de angiogenia tumoral	% <b>área hipóxica tumoral</b>	14,90: 11,77	0,3615
Panel de proliferación tumoral	% <b>área de proliferación tumoral</b>	12,16: 9,68	0,1739
Panel de proliferación tumoral	% <b>área con Ki67 alto</b>	0,66: 0,19	0,0012
Panel de proliferación tumoral	% <b>células tumorales en ciclo con Ki67 alto</b>	5,24: 1,68	<0,0001
Panel de apoptosis tumoral	% <b>área de apoptosis tumoral</b>	8,63: 8,24	0,7466
<p>% <b>área de vaso total</b> - Porcentaje de área de tejido tumoral cubierta por todos los vasos con independencia de su estado funcional.</p> <p>% <b>área de vaso funcional</b> - Porcentaje de área de tejido tumoral cubierta por vasos en regiones no hipóxicas.</p> <p>% <b>área de vaso no funcional</b> - Porcentaje de área de tejido tumoral cubierta por vasos en regiones hipóxicas.</p> <p>% <b>vasos cubiertos por pericito</b> - Porcentaje de todos los vasos tumorales que se asocian con células que expresan actina del músculo liso (SMA).</p> <p>% <b>área hipóxica tumoral</b> - Porcentaje de área de tejido tumoral cubierta por células que expresan GLUT1, un marcador sustituto de hipoxia.</p> <p>% <b>área de proliferación tumoral</b> - Porcentaje de área de tejido tumoral que es positiva para Ki67, una proteína nuclear usada rutinariamente como marcador de células de proliferación activa.</p>			

**% área con Ki67 alto** - Porcentaje de área de tejido tumoral que se tiñe intensamente para Ki67. Las células que expresan niveles altos de Ki67 están en las fases del ciclo celular más tardías que aquellas que expresan niveles inferiores de Ki67.

**% células tumorales en ciclo con Ki67 alto** - Porcentaje de todas las células Ki67 positivas que están diseñadas para tener un nivel alto de expresión de Ki67. Las células que expresan niveles altos de Ki67 se encuentran en fases del ciclo celular más tardías que aquellas que expresan niveles inferiores de Ki67.

**% área de apoptosis tumoral** - Porcentaje de área de tejido tumoral con alta tinción TUNEL. TUNEL es un procedimiento usado rutinariamente para detectar roturas de ADN bicatenario que es indicativo de apoptosis terminal.

**Ejemplo 7: Ensayo de eficacia in vivo en hueso**

Para evaluar la capacidad del Anticuerpo V (cadena ligera SEQ ID NO: 34 y cadena pesada SEQ ID NO: 35) que acelera la formación de hueso periimplante y regenera el tejido óseo, se usan ratas Sprague-Dawley macho de cuatro meses (Harlan Sprague Dawley Inc) que pesaban 425 gramos aproximadamente. En las ratas se implanta quirúrgicamente un tornillo de titanio (2 mm x 4 mm) en las dos patas del lado derecho medio por encima de la unión tibial-peronea. A continuación, se distribuyen las ratas aleatoriamente en 2 grupos según el peso corporal y reciben 10 mg/kg de Anticuerpo V o 10 mg/kg de IgG de control por inyección subcutánea una vez por semana empezando el mismo día de la intervención quirúrgica durante 21 días. Se usa tomografía computarizada cuantitativa (escáner TC modelo Aloka LaTheta LTC-100) para exploración *ex vivo* y se cuantifica el hueso recién formado con un tamaño de vóxel de 60 µm. El volumen de interés (VOI) se define como 28 cortes a intervalos de 0,1 mm sobre el punto de implante anterior. Las diferencias entre grupos se valoran con software JMP versión 5.1. (Cary, Carolina del Norte), y se compara frente al control de IgG usando el método de Dunnett con un nivel de significación de P<0,05. Cualitativamente la evaluación por imágenes de rayos X faxitrón *ex vivo* indica que las ratas tratadas con el Anticuerpo V tienen más hueso nuevo y callo alrededor del implante. Los análisis de TC cuantitativos revelan un aumento estadísticamente significativo del contenido mineral del hueso cortical periimplante (14%), nueva área de hueso (16%), grosor cortical (7%) y nuevo contenido mineral del hueso periimplante esponjoso en la médula ósea (18%), y área de hueso (16%) en ratas tratadas con Anticuerpo V en comparación con el IgG de control. Los datos revelan que el Anticuerpo V estimula la nueva formación de hueso y acelera la regeneración del tejido óseo en ratas con implante de titanio.

**Tabla 4: Análisis de micro-TC de formación de hueso nuevo periimplante**

Grupo	n	Análisis periimplante de la médula ósea		Análisis periimplante corticales		
		Contenido mineral del hueso (mg)	Área de hueso (cm <sup>2</sup> )	Contenido mineral del hueso (mg)	Área de hueso (cm <sup>2</sup> )	Grosor cortical (cm)
Control IgG	10	0,84 ± 0,04	0,034 ± 0,001	6,70 ± 0,07	0,064 ± 0,001	0,054 ± 0,001
Anticuerpo V	10	1,00 ± 0,04*	0,039 ± 0,002*	7,61 ± 0,06*	0,074 ± 0,001*	0,057 ± 0,001*

Los datos se presentan como media ± EE. \*, p<0,05, con respecto a IgG de control, prueba de Dunnett JMP.

**LISTADO DE SEQ ID**

**25 CDR de cadena pesada**

SEQ ID NO: 1 GFTFSSYTMS

SEQ ID NO: 2 TISGGGFGTYYPDSVKG

SEQ ID NO: 3 PGYHNYYFDI

SEQ ID NO: 4 PGYNNYYFDI

**30 CDR de cadena ligera**

SEQ ID NO: 5 HASDSISNSLH

SEQ ID NO: 6 YGRQSIQ

SEQ ID NO: 7 QQSESWPLH

SEQ ID NO: 8 YARQSIQ

SEQ ID NO: 9 QQSASWPLH

5 SEQ ID NO: 10 YARQSEQ

**Regiones variables de cadena pesada**

SEQ ID NO: 11

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGG  
GFGTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGYHNYFDI  
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 12

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGG  
GFGTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGYNNYYFDI  
WGQGTTVTVSS

**Regiones variables de cadena ligera**

SEQ ID NO: 13

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYGRQSIQG  
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSESWPLHFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 14

15 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYARQSIQG  
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSESWPLHFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 15

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYGRQSIQG  
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSASWPLHFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 16

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYARQSEQ  
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSASWPLHFGGGTKVEIK

20 **Cadenas pesadas completas**

SEQ ID NO: 17

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGG  
GFGTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGYHNYFDI  
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVKDKRVE  
SKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQF  
NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL  
LPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSLG

SEQ ID NO: 18

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGG  
GFGTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGYNNYYFDI  
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV  
SKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQF  
NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL  
LPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT  
QKLSLSLG

**Cadenas ligeras completas**

SEQ ID NO: 19

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYGRQSIQG  
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSESWPLHFGGGTKVEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 SEQ ID NO: 20

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYARQSIQG  
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSESWPLHFGGGTKVEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 21

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYGRQSIQG  
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSASWPLHFGGGTKVEIKRTVAAP  
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 SEQ ID NO: 22

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYARQSEQ  
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSASWPLHFGGGTKVEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Secuencias de nucleótidos - Regiones variables de cadena pesada**

SEQ ID NO: 23



GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATAACCATGTCTT  
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACCATTTCGG  
TGGTGGTTTCGGCACATACTATCCCGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCT  
CCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC  
CGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACCTGGATATCACAACACTACT  
TTGACATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAA  
GGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC  
ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGG  
TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC  
CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG  
CAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC  
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCT  
GCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAA  
ACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG  
GTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATG  
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA  
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCACCAGGACTGGCTGAAC  
GGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCG  
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACA  
CCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG  
CCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAAT  
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG  
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGA  
GGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA  
CACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

SEQ ID NO: 24

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATAACCATGTCTT  
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACCATTTCGG  
TGGTGGTTTCGGCACATACTATCCCGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCT  
CCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC  
CGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACCTGGATATAATAACTACTACT

TTGACATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAA  
 GGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC  
 ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG  
 TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC  
 CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGTGACCGTGCCCTCCAG  
 CAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC  
 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCT  
 GCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGACCATCAGTCTTCTGTCCCCCCTCAA  
 ACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG  
 GTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATG  
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA  
 GCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAAC  
 GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCCTCCATCG  
 AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACA  
 CCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG  
 CCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAAT  
 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACG  
 GCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGA  
 GGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA  
 CACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

**Secuencias de nucleótidos - Regiones variables de cadena ligera**

SEQ ID NO: 25

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG  
 AGCCACCCTCTCCTGCCACGCCAGCGACAGTATTAGCAACAGCCTACACTGGT  
 ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATGGCAGACA  
 GTCCATCCAGGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC  
 TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTG  
 TCAACAGAGTGAGAGCTGGCCGCTCCACTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA  
 GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATC  
 CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA  
 CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC  
 AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC  
 GCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA  
 ACAGGGGAGAGTGC

5 SEQ ID NO: 26

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG  
 AGCCACCCTCTCCTGCCACGCCAGCGACAGTATTAGCAACAGCCTACACTGGT  
 ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATGCTAGACA  
 GTCCATCCAGGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC  
 TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTG  
 TCAACAGAGTGAGAGCTGGCCGCTCCACTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG  
 ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA

GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC  
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA  
CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC  
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC  
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA  
ACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 27

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG  
AGCCACCCTCTCCTGCCACGCCAGCGACAGTATTAGCAACAGCCTACACTGGT  
ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATGGCAGACA  
GTCCATCCAGGGCATCCCAGCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC  
TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTG  
TCAACAGAGTGCCAGCTGGCCCGCTCCACTTCGGCGGAGGGGACCAAGGTGGAG  
ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGA  
GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC  
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA  
CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC  
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC  
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA  
ACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 28

5 **DKK-1 humano**

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG  
AGCCACCCTCTCCTGCCACGCCAGCGACAGTATTAGCAACAGCCTACACTGGT  
ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATGCTAGACA  
GTCCGAGCAGGGCATCCCAGCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC  
TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTG  
TCAACAGAGTGCCAGCTGGCCCGCTCCACTTCGGCGGAGGGGACCAAGGTGGAG  
ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGA  
GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC  
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA  
CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC  
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC  
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA  
ACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 29

TLNSVLNSNAIKNLPPPLGGAAGHPGSAVSAAPGILYPGGNKYQTIDNYQPYP  
EDEECGTDEYCASPTRGGDAGVQICLACRKRRCMRHAMCCPGNYCKNGICV  
SSDQNHFRGEIETITESFGNDHSTLDGYSRRTTLSSKMYHTKGQEGSVCLRSSDC  
ASGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGS HGLEIFQRICYGEGLSCRIQKD  
HHQASNSSRLHTCQRH

**DKK-1 de Cynomolgus**

10 SEQ ID NO: 30

TLNSVLNSNAIKNLPPLGGAGHPGSAVSAAPGILYPGGNKYQOTIDNYQPYP  
CAEDEECGTDEYCASPTRGGDAGVQICLACRKRRCMRHAMCCPGNYCKNGICV  
SSDQNNFRGEIEETITESFGNDHSTLDGYSRRTTLSSKMYHSGQEGSVCLRSSDC  
ATGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEIFQRCYCGEGLScriQKD  
HHQASNSSRLHTCQR

**DKK-1 de rata**

SEQ ID NO: 31

TLNSVLINSNAIKNLPPLGGAGGQPGSAVSVAPGVLYEGGNKYQTLDNYQPYP  
CAEDEECGTDEYCSSPSRGAAGVGGVQICLACRKRRCMRHAMCCPGNYCKNG  
ICMPSDHSHLPRGEIEEGIIENLGNDHGAGDGYPRRTTLTSKIYHTKQEGSVCLR  
SSDCATGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEIFQRCYCGEGLAC  
RIQKDHQTSNSSRLHTCQRHAFIDYKDDDDKHV

5 **DKK-1 de conejo**

SEQ ID NO: 32

TLNSVLVNSNAIKNLPPLGGANGHPGSAVSATPGILYEGGNKYLPLDNYQPYP  
CTEDEECGTDEYCASPARGGGAGVQICLACRKRRCMRHAMCCPGNYCKNGIC  
MPSDHNHFHRGEIEETIVESFGNDHSTSDGYSRRTTLSSKMYHAKGQEGSVCLRS  
SDCATGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEIFQRCYCGDGLSCR  
LQNDQHEASNSSRLHTCQR

**DKK-1 de ratón**

SEQ ID NO: 33

TLNSVLINSNAIKNLPPLGGAGGQPGSAVSVAPGVLYEGGNKYQTLDNYQPYP  
CAEDEECGSDEYCSSPSRGAAGVGGVQICLACRKRRCMTHAMCCPGNYCKNG  
ICMPSDHSHFPRGEIEESIIENLGNDHNAAGDGYPRRTTLTSKIYHTKQEGSVC  
LRSSDCAAGLCCARHFWSKICKPVLKEGQVCTKHRRKGSHGLEIFQRCYCGEGL  
ACRIQKDHQASNSSRLHTCQRH

10

**Anticuerpo V - Cadena ligera completa**

SEQ ID NO: 34

DILLTQSPATLSVTPGDSVLSLSCRASDSISGSLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGI  
PSRFSGSGSGTDFTLINSVETEDFGMYFCQQSNWPLNFGAGTKLELKRADAAP  
TVSIFPPSTEQLATGGASVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLDVTDQDS  
KDSTYSMSSTLSLSKADYESHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC

15 **Anticuerpo V - Cadena pesada completa**

SEQ ID NO: 35

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWVATISGG  
GGNTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQLSSLRSEDALYYCARPGYNNYYFDY  
WGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNS  
GALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIV  
PRNCGGDCKPCICTGSEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISQDDPEVHFS  
WFVDDVEVHTAQTRPPEEQFNSTFRSVSELPILHQDWLNGRTRFCKVTSAAFPSP  
EKTISKPEGRTQVPHVYTMSPTEEMTQNEVSITCMVKGFYPPDIYVEWQMNGQ  
PQENYKNTPTMDTDGSYFLYSKLNVKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTEK  
SLSHSPGK

**Anticuerpo V - Región variable de cadena ligera**

SEQ ID NO: 36

DILLTQSPATLSVTPGDSVLSLSCRASDSISGSLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGI  
PSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWPLNFGAGTKLELK

**Anticuerpo V - Región variable de cadena pesada**

5 SEQ ID NO: 37

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWVATISGG  
GGNTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLSSLRSEDTALYYCARPGYNNYYFDY  
WGQGTTLTVSS

**Anticuerpo V - CDR de cadena pesada**

SEQ ID NO: 38 TISGGGGNTYYPDSVKG

SEQ ID NO: 39 PGYNNYYFDY

10 **Anticuerpo V - CDR de cadena ligera**

SEQ ID NO: 40 RASDSISGSLH

SEQ ID NO: 41 YASQSIGI

SEQ ID NO: 42 QQSNSWPLN

**CDR de cadena pesada de consenso**

15 SEQ ID NO: 43 TISGGGX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TYYPDSVKG

X<sub>1</sub> es F, G

X<sub>2</sub> es G, N

SEQ ID NO: 44 PGYX<sub>3</sub>NYFDI

X<sub>3</sub> es H, N

20 SEQ ID NO: 45 PGYX<sub>4</sub>NYFDX<sub>5</sub>

X<sub>4</sub> es H, N

X<sub>5</sub> es I, Y

**CDR de cadena ligera de consenso**

SEQ ID NO: 46 X<sub>6</sub>ASDSISX<sub>7</sub>SLH

25 X<sub>6</sub> es H, R

X<sub>7</sub> es N, G

SEQ ID NO: 47 YX<sub>8</sub>RQSX<sub>9</sub>Q

X<sub>8</sub> es G, A

X<sub>9</sub> es I, E

30 SEQ ID NO: 48 YX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>QSX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>

X<sub>10</sub> es G, A

X<sub>11</sub> es R, S

X<sub>12</sub> es I, E

X<sub>13</sub> es Q, S

SEQ ID NO: 49 QQSX<sub>14</sub>SWPLH

X<sub>14</sub> es E, A

SEQ ID NO: 50 QQSX<sub>15</sub>SWPLX<sub>16</sub>

X<sub>15</sub> es E, A, N

5 X<sub>16</sub> es H, N

**Región variable de cadena pesada de consenso**

SEQ ID NO: 51

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGG  
GFGTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGYX<sub>17</sub>NYF  
DI WGQGTTVTVSS

X<sub>17</sub> es H, N

10 **Región variable de cadena ligera de consenso**

SEQ ID NO: 52

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYX<sub>18</sub>RQS  
X<sub>19</sub>QGIPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYC QQSX<sub>20</sub>SWPLHFGGGTKVEIK

X<sub>18</sub> es G, A

X<sub>19</sub> es I, E

15 X<sub>20</sub> es E, A

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 5, LCDR2 es la SEQ ID NO: 8, LCDR3 es la SEQ ID NO: 7, HCDR1 es la SEQ ID NO: 1, HCDR2 es la SEQ ID NO: 2 y HCDR3 es la SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 2.- Un anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso según la reivindicación 1 en el que el cáncer se selecciona entre mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.
- 10 3.- Un anticuerpo DKK-1 humano manipulado para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.
- 15 4.- Un anticuerpo DKK-1 humano manipulado para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo DKK-1 humano manipulado comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 20 5.- Un anticuerpo DKK-1 humano manipulado para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende dos cadenas ligeras en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, y dos cadenas pesadas en el que cada cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.
- 25 6.- Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo DKK-1 humano manipulado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 5, LCDR2 es la SEQ ID NO: 8, LCDR3 es la SEQ ID NO: 7, HCDR1 es la SEQ ID NO: 1, HCDR2 es la SEQ ID NO: 2 y HCDR3 es la SEQ ID NO: 4 junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 7.- Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6 en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer se selecciona entre mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.
- 30 8.- Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6 y 7 que comprende opcionalmente además otros ingredientes terapéuticos.