

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA ANTICUERPOS DIRIGIDOS A BMP6

[001] SOLICITUDES RELACIONADAS

5 [002] Esta solicitud reclama la prioridad de la solicitud estadounidense de número serial 62/094,716, presentada el 19 de diciembre de 2014y de la solicitud estadounidense de número serial 62/181,803, presentada el 19 de junio de 2015, los contenidos de las cuales se incorporan en la presente en su totalidad como referencia.

10 [003] LISTADO DE SECUENCIAS

[004] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad como referencia. Dicha copia ASCII, creada el 16 de diciembre de 2015, se denomina PAT056599-WO-PCT_SL.txt y tiene 68,301 bites.

15

[005] INTRODUCCIÓN

[006] La presente invención se refiere a anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno del mismo relacionados con BMP6 humano, a las composiciones y a los métodos usados en los mismos.

20

[007] ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[008] La anemia es frecuente en los pacientes con enfermedad renal crónica (CKD) y se asocia con una menor calidad de vida y un mayor riesgo de resultados adversos, incluyendo enfermedades cardiovasculares y la muerte. Varias formas
25 de anemia en pacientes con CKD implican el uso de agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), suplementos orales y transfusiones intravenosas de hierro. Sin embargo, muchos pacientes no responden adecuadamente a estos tratamientos ni requieren altas dosis de ESA y/o hierro. Las altas dosis de hierro también pueden causar toxicidad asociada con la generación de radicales de
30 oxígeno y reacciones alérgicas. Estos tratamientos pueden carecer de eficacia

debido a que no tratan plenamente la causa subyacente de la anemia, es decir, la absorción deficiente de hierro, y la movilización de hierro a partir de las reservas corporales.

[009] Los intentos de manejar la resistencia a eritropoyetina se están llevando a cabo actualmente por la co-administración de altas dosis de hierro parenteral. Sin embargo, la mayor parte de hierro a partir de preparaciones intravenosas es primero procesado por los macrófagos, y su utilización para la eritropoyesis es dependiente de la exportación de hierro ferroportina mediada.

[0010] En muchos pacientes con anemia, la exportación de ferroportina mediada por hierro es suprimida por los altos niveles de hepcidina. Evidencia adicional sugiere que el aumento de los niveles de hepcidina se correlaciona con una pobre capacidad de respuesta de los ESA en hemodiálisis. Por lo tanto, los agentes reductores de la hepcidina pueden ser una estrategia eficaz para mejorar los ESA de anemia refractaria en esta población de pacientes y en otras formas de anemia por enfermedad crónica (ACD) caracterizada por la restricción de hierro.

[0011] Por lo tanto, los métodos que disminuyen los niveles circulantes de hepcidina deben mejorar la absorción de hierro, facilitar la liberación de hierro secuestrado, y promover la eritropoyesis de ESA de anemia refractaria presentes en pacientes con enfermedad renal crónica.

[0012] A pesar de las opciones de tratamiento actuales para tratar enfermedades y trastornos asociados a la anemia, sigue habiendo una necesidad de composiciones mejoradas para los tratamientos de la anemia que sean eficaces y bien toleradas.

[0013] **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

[0014] La presente invención proporciona moléculas de unión a BMP6 aisladas (por ejemplo, anticuerpos de unión a BMP6 o fragmento de unión a antígeno de los mismos), composiciones farmacéuticas que comprenden tales moléculas, métodos de fabricación de tales moléculas, composiciones y métodos de uso de

los mismos en la reducción de los niveles de hepcidina y en tratamiento de la anemia.

5 [0015] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de BMP6 que comprende cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, o 6 CDR de cualquiera de los anticuerpos de la Tabla 1.

[0016] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de BMP6 que comprende las 6 CDRs del anticuerpo 3, como se describe en la Tabla 1.

10 [0017] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de BMP6 que comprende las 6 CDRs del anticuerpo 5, como se describe en la Tabla 1.

[0018] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo a BMP6 que comprende las 6 CDRs del anticuerpo 6, como se describe en la Tabla 1.

15 [0019] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo a BMP6 que comprende las 6 CDRs del anticuerpo 7, como se describe en la Tabla 1.

[0020][0016] En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

20 [0021] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 9, 10 y 11, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 19, 20 y 21, respectivamente.

[0022] En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

25 [0023] las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente.

[0024] En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0025] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 29, 30 y 31, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 39, 40 y 41, respectivamente.

5 [0026] En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0027] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 32, 33 y 34, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente.

10 [0028] En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0029] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 49, 50 y 51, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 59, 60 y 61, respectivamente.

15 [0030] En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0031] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 52, 53 y 54, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 62, 63 y 64, respectivamente.

20 [0032] En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0033] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 69, 70 y 71, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 79, 80 y 81, respectivamente o

25 [0034] En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0035] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 82, 83 y 84, respectivamente.

[0036] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana y consta de:

[0037] Una secuencia VH (la cadena pesada del dominio variable) de la SEQ ID NO: 15;

[0038] Una secuencia de VH de la SEC ID NO: 35;

[0039] Una secuencia de VH de la SEC ID NO: 55; o

[0040] Una secuencia de VH de la SEC ID NO: 75.

[0041] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana comprende una secuencia de VH que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pero menos de 100% de identidad de secuencia para una de las secuencias de VH descritas anteriormente.

[0042] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0043] Una secuencia VL (cadena ligera de dominio variable) de la SEQ ID NO: 25;

[0044] Una secuencia VL de la SEC ID NO: 45;

[0045] Una secuencia VL de la SEC ID NO: 65; o

[0046] Una secuencia VL de la SEC ID NO: 85.

[0047] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana comprende una secuencia de VL que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pero menos de 100% de identidad de secuencia para una de las secuencias VL descritas anteriormente.

[0048] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0049] Una secuencia de VH de la SEC ID NO: 15; y una secuencia VL de la SEC ID NO: 25;

[0050] Una secuencia de VH de la secuencia de la SEQ ID NO: 35; y una secuencia VL de la SEC ID NO: 45;

5 [0051] Una secuencia de VH de la secuencia de la SEQ ID NO: 55; y una secuencia VL de la SEC ID NO: 65; o

[0052] Una secuencia de VH de la secuencia de la SEQ ID NO: 75; y una secuencia VL de la SEC ID NO: 85.

[0053] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o
10 fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana comprende una secuencia de VH que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pero menos del 100% de identidad de secuencia para una de las
15 secuencias de VH descritas anteriormente, y VL comprende una secuencia que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pero menos de 100% de identidad de secuencia para una de las secuencias VL descritos anteriormente. En una
20 realización, las VH y VL se derivan del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 1.

[0054] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0055] Una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 17;

25 [0056] Una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 37;

[0057] Una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57; o

[0058] Una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 77.

[0059] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o
30 fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana comprende una secuencia de cadena pesada que tiene al menos 85%, al menos

90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pero menos de 100% de identidad de secuencia para una de las secuencias de cadena pesada descritas anteriormente.

- 5 [0060] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y consta de:

[0061] Una secuencia de la cadena ligera de la SEC ID NO: 27;

[0062] Una secuencia de la cadena ligera de la SEC ID NO: 47;

[0063] Una secuencia de la cadena ligera de la SEC ID NO: 67; o

- 10 [0064] Una secuencia de la cadena ligera de la SEC ID NO: 87.

[0065] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana comprende una secuencia de cadena ligera que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%,
15 al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pero menos de 100% de identidad de secuencia para una de las secuencias de cadena ligera descritas anteriormente.

- [0066] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 humana y comprende
20 una cadena pesada y una cadena ligera en la que:

[0067] Una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 17; y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 27;

[0068] Una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 37; y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 47;

- 25 [0069] Una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57; y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 67; o

[0070] Una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 77; y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 87.

- 30 [0071] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana

comprende una secuencia de cadena pesada que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pero menos del 100% de identidad de secuencia para una de las
5 secuencias de cadena pesada descrita anteriormente, y comprende una secuencia de cadena ligera que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia, pero menos de 100% de identidad de secuencia para una de las secuencias de cadena ligera descritas
10 anteriormente. En una realización, la cadena pesada y la cadena ligera se derivan del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 1.

[0072] En una realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a BMP6, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a
15 antígeno del mismo comprende al menos una secuencia determinante de complementariedad (CDR) que tiene al menos 90%, 95%, 97%, 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con una cualquiera o más de:

[0073] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 9, 10 y 11, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 19,
20 20 y 21, respectivamente;

[0074] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente;

[0075] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 29, 30 y 31, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 39,
25 40 y 41, respectivamente;

[0076] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 32, 33 y 34, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente;

[0077] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 49, 50 y 51, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 59, 60 y 61, respectivamente;

5 [0078] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 52, 53 y 54, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 62, 63 y 64, respectivamente;

[0079] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 69, 70 y 71, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 79, 80 y 81, respectivamente; o

10 [0080] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 82, 83 y 84, respectivamente.

[0081] En una realización de la presente invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a
15 BMP6 y comprende al menos una secuencia determinante de la complementariedad (CDR) idéntica a una cualquiera o más de:

[0082] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 9, 10 y 11, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 19, 20 y 21, respectivamente;

20 [0083] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente;

[0084] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 29, 30 y 31, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 39,
25 40 y 41, respectivamente;

[0085] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 32, 33 y 34, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente;

[0086] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 49, 50 y 51, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 59, 60 y 61, respectivamente;

5 [0087] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 52, 53 y 54, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 62, 63 y 64, respectivamente;

[0088] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 69, 70 y 71, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 79, 80 y 81, respectivamente; o

10 [0089] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 82, 83 y 84, respectivamente.

[0090] En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a
15 BMP6, de los cuales comprenden al menos una secuencia CDR de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en:

[0091] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 12, 13 y 14;

[0092] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 29, 30 y 31;

[0093] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 32, 33 y 34;

20 [0094] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 49, 50 y 51;

[0095] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 52, 53 y 54;

[0096] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 69, 70 y 71;

[0097] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74; y

[0098] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 9, 10 y 11.

25 [0099][0095] En una realización de la presente invención, en la que los anticuerpos aislados o fragmento de unión al antígeno de los mismos se unen específicamente a BMP6, dichos anticuerpos comprenden al menos una secuencia CDR de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en:

[00100] Las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 19, 20
30 y 21, respectivamente;

- [00101] Las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente;
- [00102] Las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 39, 40 y 41, respectivamente;
- 5 [00103] Las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente;
- [00104] Las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 59, 60 y 61, respectivamente;
- [00105] Las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 62, 63
10 y 64, respectivamente;
- [00106] Las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 79, 80 y 81, respectivamente; y
- [00107] [00103] Las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 82, 83 y 84, respectivamente.
- 15 [00108] En realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo es monoclonal.
- [00109] En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno del mismo que se unen específicamente a BMP6, en el que dicho anticuerpo tiene una constante de afinidad (K_A) de al menos aproximadamente $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} o M^{-1} . En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno del mismo que se unen específicamente a BMP6, en el que dicho anticuerpo tiene una constante de afinidad (K_A) de al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , o 10^{11} M^{-1} .
- 20 [00110] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a BMP6, en la que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 con una K_d de no más de aproximadamente 1 nM o no más de aproximadamente 0.1 nM. En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o
25 fragmento de unión a antígeno de los mismos específicamente se une a BMP6, en
30

el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 con una K_d de no más de 1 nM o no más de 0,1 nM. En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a BMP6, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a BMP6 con un una $K_d \leq 1$ nM o $\leq 0,1$ nM. En una realización, la K_d es también medida por Biacore.

[00111] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a BMP6, e inhiben la actividad de BMP6.

[00112] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a BMP6, y compete cruzadamente (reacciona cruzadamente) con un anticuerpo descrito en la Tabla 1, presentada abajo. En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen al mismo epítipo de BMP6, compiten cruzadamente con un anticuerpo descrito en la Tabla 1 presentada abajo.

[00113] En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos s tienen al menos aproximadamente un 100-, 500- o 1.000 veces mayor afinidad por BMP6 humano, que a cualquier: BMP2 humano, BMP5 humano o BMP7 humano. En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tiene al menos un 100-, 500- o 1.000 veces mayor afinidad por BMP6 humano, que a cualquier: BMP2 humano, BMP5 humano o BMP7 humano. En realizaciones, la especificidad para BMP6 es también medida por ELISA.

[00114] En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmento de unión a antígeno de los mismos tienen al menos aproximadamente 100-, 500- o 1.000 veces mayor afinidad por BMP6 humano, que a BMP2 humano. En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene al menos un 100-, 500- o 1000

veces mayor afinidad por BMP6 humano, que por BMP2 humano. En realizaciones, la especificidad para BMP6 es también medida por ELISA.

[00115] En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmento de unión a antígeno de los mismos tienen al menos aproximadamente un 100-, 500- o 1.000 veces mayor afinidad por BMP6 humano, que a BMP5 humano. En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno del mismo tienen al menos un 100-, 500- o 1000 veces mayor afinidad por BMP6 humano, que a BMP5 humano. En realizaciones, la especificidad para BMP6 es también medida por ELISA.

[00116] En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmento de unión a antígeno de los mismos tienen al menos aproximadamente un 100-, 500- o 1.000 veces mayor afinidad por BMP6 humano, que a BMP7 humano. En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno del mismo tienen al menos un 100-, 500- o 1000 veces mayor afinidad por BMP6 humano, que a BMP7 humano. En realizaciones, la especificidad para BMP6 es también medida por ELISA.

[00117] En una realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene unión detectable a BMP2 humano o a BMP5 (por ejemplo, en un ELISA).

[00118] En una realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene actividad detectable contra BMP2 humano (por ejemplo, en un ELISA).

[00119] En una realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene actividad detectable contra BMP5 humano (por ejemplo, en un ELISA).

[00120] En una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención que se unen específicamente a BMP6 son anticuerpos monoclonales aislados. En una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención que se unen específicamente a BMP6 son anticuerpos monoclonales humanos aislados. En

una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención que se unen específicamente a BMP6 son anticuerpos monoclonales humanizados. En una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención que se unen específicamente a BMP6 son anticuerpos quiméricos aislados. En una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención comprenden una región constante de la cadena pesada humana y una región constante de cadena ligera humana.

[00121] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a BMP6 es un anticuerpo de cadena sencilla.

[00122] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a BMP6 es un fragmento Fab.

[00123] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a BMP6 es un scFv.

[00124] En una realización, los anticuerpos de la invención son una IgM o IgG. En una realización de la presente invención, la IgG es una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o. En una realización, la IgG es una IgG1.

[00125] En una realización de la presente invención, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden un marco en el que los aminoácidos se han sustituido en el marco de anticuerpo a partir de las respectivas secuencias de la línea germinal humana VH o VL.

[00126] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo es un componente de un inmunoconjugado. En una realización, el inmunoconjugado puede comprender el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquiera de los siguientes, como no limitativos ejemplos: una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, o medicamento.

[00127] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo ha alterado la función efectora a través de mutación de la región Fc.

5 [00128] En una realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo bloquea cruzadamente la unión de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aislado enumerado en la Tabla 1.

[00129] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la expresión de hepcidina inducida por BMP6 de células hepáticas (por ejemplo, líneas celulares de hígado y/o células primarias de hígado humano in vitro). En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la expresión de hepcidina inducida por BMP6 en las células hepáticas (por ejemplo, líneas celulares de hígado y/o células primarias de hígado humano in vitro) en al menos aproximadamente un 50%. Por ejemplo, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la expresión de hepcidina inducida por BMP6 en las células hepáticas en al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90 o 100%. La expresión de hepcidina se pueden medir, (ejemplos no limitantes), mediante la obtención de la cantidad de ARNm de hepcidina o los niveles de proteína. En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la expresión de hepcidina inducida por BMP6 en las células hepáticas (por ejemplo, líneas celulares de hígado y/o células primarias de hígado humano in vitro) en al menos un 50%. Por ejemplo, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la expresión de hepcidina inducida por BMP6 en las células hepáticas por lo menos un 50, 60, 70, 80, 90 o 100%. La expresión de hepcidina se puede medir, (como ejemplos no limitativos) mediante la medición de la cantidad de ARNm de hepcidina o los niveles de proteína.

[00130] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce la actividad de BMP6 humana in vitro. En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o

30

fragmento de unión a antígeno del mismo reduce la actividad de BMP6 humana in vitro, según se mide en un ensayo de gen reportero HEP3B-BRE-Luc.

[00131] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado del mismo, que se une específicamente BMP6, y que

5 se une a un epítipo de BMP6 humana que comprende la secuencia QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 211, o los aminoácidos de 88 a 102 de la SEQ ID NO: 89) En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente BMP6 y el cual se une a un epítipo de BMP6 humana que consiste en la secuencia

10 QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 211, o los aminoácidos 88 a 102 de la SEQ ID NO: 89). En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene al menos aproximadamente 100 veces mayor afinidad por un epítipo humano BMP6 que consta de la secuencia de QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 211, o los aminoácidos 88 a 102 de SEQ

15 ID NO: 89) que a (a) un epítipo BMP7 humano que consiste en la secuencia de QTLVHFINPETVPKP (SEQ ID NO: 212, o amino ácidos 88 a 102 de SEQ ID NO: 90) o (b) un epítipo BMP5 humano que consiste en la secuencia de QTLVHLMFPDHVPKP (SEQ ID NO: 213, o aminoácidos 87 a 101 de la SEQ ID NO: 91). En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o

20 fragmento de unión a antígeno del mismo tiene al menos 100 veces mayor afinidad por un epítipo BMP6 humana que consiste en la secuencia de QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 211, o los aminoácidos 88 a 102 de la SEQ ID NO: 89) que a (a) un epítipo BMP7 humano que consiste en la secuencia QTLVHFINPETVPKP (SEQ ID NO: 212, o los aminoácidos 88 a 102 de la SEQ ID

25 NO: 90) o (b) un epítipo BMP5 humano que consiste en la secuencia de QTLVHLMFPDHVPKP (SEQ ID NO: 213, o aminoácidos 87 a 101 de la SEQ ID NO.: 91). Tal anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo pueden comprender, como ejemplos no limitativo a: (a) las secuencias de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 69, 70 y 71, respectivamente, y las secuencias

30 de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 79, 80 y 81, respectivamente, o (b)

las secuencias de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente, y las secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 82, 83 y 84, respectivamente, en una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de VH de la SEC ID NO: 75; y la secuencia de VL de la SEC ID NO: 85. En una realización, la afinidad es medida por Biacore.

[00132] En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene al menos aproximadamente 500 veces mayor afinidad por un epítipo humano BMP6 que consta de la secuencia QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 211, o los aminoácidos 88 a 102 de SEQ ID NO: 89) que a (a) un epítipo BMP7 humano que consiste en la secuencia de QTLVHFINPETVPKP (SEQ ID NO: 212, o amino ácidos 88 a 102 de SEQ ID NO: 90) o (b) un epítipo BMP5 humano que consiste en la secuencia de QTLVHLMFPDHVPKP (SEQ ID NO: 213, o los aminoácidos 87-101 de la SEQ ID NO: 91) Tal un anticuerpo aislado o fragmento del mismo puede comprender, como ejemplos no limitativos de unión al antígeno: (a) las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 69, 70 y 71, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 79, 80 y 81, respectivamente o (b) las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID N: Os 82, 83 y 84, respectivamente. En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de VH de la SEC ID NO: 75; y la secuencia de VL de la SEC ID NO: 85. En una realización, la afinidad es medida por Biacore.

[00133] En otro aspecto, la invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de los aspectos o formas de realización anteriores.

[00134] En una realización, la composición comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.

[00135] En una realización, la composición comprende además un agente terapéutico adicional.

[00136] En una realización de la presente invención, el agente terapéutico adicional reduce la actividad de BMP6.

5 [00137] En una realización de la presente invención, el agente terapéutico adicional es un siRNA, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula pequeña.

[00138] En una realización de la presente invención, el agente terapéutico adicional se selecciona de entre el grupo que consiste en: agente estimulante de eritropoyesis (ESA) y hierro (por ejemplo, hierro suplementario en la dieta o hierro IV).

[00139] En una realización de la presente invención, el agente terapéutico adicional es agente estimulante de eritropoyesis (ESA), por ejemplo EPO.

15 [00140] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en la Tabla 1, se pueden administrar a un paciente en necesidad del mismo en combinación con un método o procedimiento terapéutico, tal como se describe en este documento o alguno conocido en la técnica. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en la Tabla 1 puede ser administrado antes, después o durante un

20 método o procedimiento.

[00141] En una realización, el método o procedimiento terapéutico es una transfusión de sangre. En una realización, el método o procedimiento terapéutico es la diálisis. En una realización, el método o procedimiento de administración terapéutica de un ESA, por ejemplo, EPO. En una realización, el método o

25 procedimiento terapéutico es la administración de hierro, por ejemplo, IV hierro. En una realización, el método o procedimiento de administración terapéutica de un ESA, por ejemplo, EPO, y administración de hierro, por ejemplo, hierro IV. En una realización, el método o procedimiento terapéutico es una combinación de cualquiera de los anteriores.

[00142] En otro aspecto, la presente invención incluye un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se describe aquí. En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifican un anticuerpo aislado o
5 fragmento de unión a antígeno del mismo descritos en la Tabla 1 que comprende uno cualquiera o más de:

[00143] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 9, 10 y 11, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 19, 20 y 21, respectivamente;

10 [00144] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente;

[00145] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 29, 30 y 31, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs:
15 39, 40 y 41, respectivamente;

[00146] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 32, 33 y 34, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente;

[00147] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 49, 50 y
20 51, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 59, 60 y 61, respectivamente;

[00148] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 52, 53 y 54, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 62, 63 y 64, respectivamente;

25 [00149] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 69, 70 y 71, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 79, 80 y 81, respectivamente; o

[00150] Las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3 y de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs:
30 82, 83 y 84, respectivamente.

[00151] En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se describe en la Tabla 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

[00152] La secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17;

[00153] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 15;

[00154] La secuencia de la cadena ligera de la SEC ID NO: 27;

[00155] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 25;

10 [00156] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 37;

[00157] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 35;

[00158] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 47;

[00159] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 45;

[00160] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57;

15 [00161] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 55;

[00162] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 67;

[00163] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 65;

[00164] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 77;

[00165] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 75;

20 [00166] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 87; y

[00167] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 85.

[00168] En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en la Tabla 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98 % o 99% de secuencia de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

[00169] La secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17;

[00170] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 15;

30 [00171] La secuencia de la cadena ligera de la SEC ID NO: 27;

- [00172] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 25;
- [00173] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 37;
- [00174] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 35;
- [00175] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 47;
- 5 [00176] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 45;
- [00177] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57;
- [00178] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 55;
- [00179] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 67;
- [00180] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 65;
- 10 [00181] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 77;
- [00182] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 75;
- [00183] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 87; y
- [00184] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 85.
- [00185] En una realización, la presente invención proporciona un ácido
- 15 nucleico (polinucleótido) que codifica un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en la Tabla 1, donde el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- [00186] La secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 18;
- [00187] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 38;
- 20 [00188] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 58;
- [00189] La secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 78;
- [00190] La secuencia de la cadena ligera de la SEC ID NO: 28;
- [00191] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 48;
- [00192] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 68;
- 25 [00193] La secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 88;
- [00194] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 16;
- [00195] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 36;
- [00196] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 56;
- [00197] La secuencia de VH de la SEC ID NO: 76;
- 30 [00198] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 26;

[00199] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 46;

[00200] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 66; y

[00201] La secuencia de VL de la SEC ID NO: 86.

[00202] En otro aspecto, lapresente invención también proporciona un vector
5 que comprende dichos ácidos nucleicos o polinucleótidos.

[00203] En otro aspecto, la presente invención también proporciona una
célula huésped que comprende dichos ácidos nucleicos o polinucleótidos. En una
realización, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En
una realización de la presente invención, las células hospedadoras aisladas
10 comprenden un vector que comprende dichos ácidos nucleicos o polinucleótidos.

[00204] En una realización, la presente invención proporciona una célula
huésped aislada que comprende (1) un segmento de ácido nucleico recombinante
que codifica una cadena pesada de los anticuerpos de la invención, y (2) un
segundo segmento de ácido nucleico recombinante que codifica una cadena ligera
15 de los anticuerpos de la invención; en la que dicho segmentos de ADN son,
respectivamente, unidos operativamente a un primer y un segundo promotor, y
son capaces de ser expresados en dicha célula huésped. En otra realización de la
presente invención, las células huésped aisladas comprenden un segmento de
ADN recombinante que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de los
20 anticuerpos de la invención, respectivamente, en la que dicho segmento de ADN
está unida operativamente a un promotor, y es capaz de expresarse en dichas
células huésped. En una realización, las células huésped son de una línea celular
de mamífero no humano. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a
antígeno de los mismos es un anticuerpo monoclonal humano, o un fragmento de
25 unión a antígeno del mismo.

[00205] La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo o
fragmento de unión a antígeno del mismo a BMP6, un polinucleótido, un vector, o
una célula huésped, tal como se describe en el presente documento, en la
fabricación de un medicamento. La presente invención proporciona un anticuerpo
30 o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en el presente

documento, para su uso como un medicamento. La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en el presente documento, para su uso en una terapia. La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento de anemia, por ejemplo, anemia de enfermedad crónica. En una realización, la enfermedad crónica es la enfermedad renal crónica. En una realización, la enfermedad crónica es el cáncer. En una realización, la enfermedad es la inflamación crónica. En realizaciones, el paciente con anemia ha sido o está siendo tratado con un agente estimulador de la eritropoyesis (AEE), por ejemplo, la eritropoyetina (EPO).

[00206] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de uso de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y composiciones que comprenden tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento. En un aspecto, la invención proporciona un método para reducir la actividad o nivel de hepcidina en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a BMP6 como se describe en el presente documento. En una realización de este método, la actividad o nivel de Hepcidina se reduce en al menos un 50%. En una realización, el paciente tiene anemia. En realizaciones, la anemia es la anemia de enfermedad crónica (ACD), por ejemplo, la anemia de la enfermedad renal crónica (ERC), la anemia de cáncer o la anemia de la inflamación. En una realización, la anemia es una anemia resistente a agente estimulantes de la eritropoyesis (ESA), o una anemia por deficiencia de hierro.

[00207] La presente invención proporciona un método de tratamiento de la anemia en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descritas en este documento. En realizaciones, la anemia es la anemia de la enfermedad crónica (ACD), por ejemplo, la anemia de la enfermedad renal

crónica (ERC), la anemia de cáncer o la anemia de la inflamación. En una realización, la anemia es resistente a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), o anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, el paciente está siendo o ha sido tratado con un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA),
5 por ejemplo, la eritropoyetina (EPO). En realizaciones, la anemia es una anemia con una hiporrespuesta a la EPO. En realizaciones, la anemia es una anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, el paciente es un paciente con hemodiálisis crónica.

[00208] En otra realización, la presente invención proporciona un método
10 para inhibir BMP6 en un paciente en necesidad de lo mismo, en donde el método comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno de la invención. En formas de realización, el paciente tiene anemia. En realizaciones, la anemia es la anemia de la enfermedad crónica (ACD), por
15 ejemplo, la anemia de la enfermedad renal crónica (CKD), la anemia de cáncer o la anemia de la inflamación. En una realización, la anemia es una anemia resistente a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), o anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, el paciente está siendo o ha sido tratado con un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA), por ejemplo, la
20 eritropoyetina (EPO). En realizaciones, la anemia es una anemia de hiporrespuesta a EPO. En realizaciones, la anemia es la anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, el paciente es un paciente de hemodiálisis crónica.

[00209] La presente invención también proporciona un método para reducir la
25 actividad de BMP6 en una célula, lo que comprende la etapa de poner en contacto la célula con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, propio de la invención.

[00210] La presente invención proporciona además un método para
30 aumentar los niveles de hierro sérico, saturación de transferrina (TSAT), contenido de hemoglobina reticulocitaria (CHr), recuento de reticulocitos, recuento de

glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito en un paciente en necesidad del mismo, que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención.

[00211] La presente invención proporciona además un método para

5 aumentar o mantener el nivel de hemoglobina en un paciente, comprendiendo el método de administrar al paciente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descritos en este documento. En formas de realización, el paciente tiene anemia. En realizaciones, la anemia es una anemia de la enfermedad crónica (ACD), por ejemplo, la anemia de la enfermedad renal crónica (ERC), la
10 anemia de cáncer o la anemia de la inflamación. En una realización, la anemia es resistente a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), o anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, el paciente está siendo o ha sido tratado con un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA), por ejemplo, la eritropoyetina (EPO). En realizaciones, la anemia es una anemia de
15 hiporrespuesta a EPO. En realizaciones, la anemia es la anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, el paciente es un paciente de hemodiálisis crónica. En formas de realización, el método comprende, además, una reducción en el requerimiento de la dosis de hierro del paciente, o reducir el requerimiento de la dosis de EPO, o reducir tanto el requerimiento de la dosis de hierro del paciente,
20 como el requerimiento de la dosis de EPO, con respecto a dicho requerimiento de dosis de EPO y/o el requerimiento de dosis de hierro en ausencia de tratamiento con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en este documento. En formas de realización, el nivel de hemoglobina aumenta o se mantiene a un nivel de al menos aproximadamente 10,0, al menos
25 aproximadamente 11,0, o al menos aproximadamente 12,0 g/dL. En formas de realización, el nivel de hemoglobina aumenta o se mantiene a un nivel de al menos 10,0, al menos 11,0, o al menos 12,0 g/dL.

[00212] En cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la etapa de administrar al paciente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del
30 mismo descritos en este documento comprende la etapa de administrar al

paciente una composición que incluye el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en este documento.

[00213] En cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser administrado a una dosis de 0,001-0,1 mg/kg, por ejemplo, a una dosis de 0,001 mg/kg, 0,0016 mg/kg, 0,0025 mg/kg, 0,0040 mg/kg, 0,0063 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,016 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,040 mg/kg, 0,063 mg/kg, o 0,1 mg/kg. En cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar en una dosis de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1 mg/kg, por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 0,001 mg/kg de unión a antígeno, alrededor de 0,0016 mg/kg, alrededor de 0,0025 mg/kg, alrededor de 0,0040 mg/kg, alrededor de 0,0063 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,016 mg/kg, aproximadamente 0,025 mg/kg, aproximadamente 0,040 mg/kg, aproximadamente 0,063 mg/kg, o aproximadamente 0,1 mg/kg.

[00214] En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por vía intravenosa. En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por vía subcutánea. En formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por infusión durante un período de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos.

[00215] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo a BMP6 que comprende una CDR enumerada en la Tabla 1. La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a BMP6 enumerados en la Tabla 1. La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a BMP6 que comprende una CDR enumeradas en la Tabla 1. En una realización de la presente invención, se aisló un polinucleótido o ácido nucleico. En una realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se aísla.

[00216] DEFINICIONES

[00217] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención.

[00218] “BMP6”, como se usa aquí, se refiere a la proteína morfogenética ósea 6 (BMP6) o a un gen o un ácido nucleico que codifica BMP6. Hahn et al. 1992 Genomics 14: 759-62; Sauermann et al. 1993 J. Neurosci. Res. 33: 142-7; NCBI Gene ID: 654. BMP6 is also known as: BMP-6; VGR; VGR1; External IDs: OMIM: 112266 MGI: 88182; HomoloGene: 1300; GeneCards: BMP6 Gene. Ortologos: Especies: Humana: Entrez: 654; Ensembl: ENSG00000153162; UniProt: P22004; RefSeq (mRNA): NM_001718; RefSeq (protein): NP_001709; Location (UCSC): Chr 6: 7.73 – 7.88 Mb; Especies: Raton: Entrez: 12161; Ensembl: ENSMUSG00000039004; UniProt: P20722; RefSeq (mRNA): NM_007556; RefSeq (protein): NP_031582; Ubicación (UCSC): Chr 13: 38.35 – 38.5 Mb. Como se describe aquí, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 se une a la proteína BMP6.

[00219] “BMP2”, como se usa aquí, hace referencia a la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) o a un gen o ácido nucleico que codifica BMP2. BMP2 también se conoce como: BDA2; y BMP2A; IDs OMIM Externo: 112261 MGI: 88177 HomoloGene: 926 GeneCards: BMP2 Gene. Especies: Humano; Entrez: 650; Ensembl: ENSG00000125845; UniProt: P12643; RefSeq (mRNA): NM_001200; RefSeq (proteina): NP_001191; Ubicación (UCSC): Chr 20: 6.75 – 6.76 Mb. Especies: Mouse; Entrez: 12156; Ensembl: ENSMUSG00000027358; UniProt: P21274; RefSeq (mRNA): NM_007553; RefSeq (protein): NP_031579; Ubicación (UCSC): Chr 2: 133.55 – 133.56 Mb. Como se describe aquí, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que se une a BMP 2 se une a la proteína BMP 2.

[00220] “BMP5”, como se usa aquí, hace referencia a la proteína morfogenética ósea 5 (BMP5) o un gen o ácido nucleico que codifica

BMP5. BMP5 también se conoce como: MGC34244; IDs OMIM Externo: 112265 MGI: 88181 HomoloGene: 22412 GeneCards: BMP5 Gene. Species: Human; Entrez: 653; Ensembl: ENSG00000112175; UniProt: P22003; RefSeq (mRNA): NM_021073; RefSeq (protein): NP_066551; Location (UCSC): Chr 6: 55.62 – 55.74 Mb. Especies: Raton; Entrez: 12160; Ensembl: ENSMUSG00000032179; UniProt: P49003; RefSeq (mRNA): NM_007555; RefSeq (protein): NP_031581; Location (UCSC): Chr 9: 75.78 – 75.9 Mb. Como se describe aquí, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que se une a BMP 5 se une a la proteína BMP 5.

[00221] “BMP7”, como se usa aquí, hace referencia a la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7) o a un gen o ácido nucleico que codifica BMP7. BMP7 también se conoce como: la proteína osteogénica-1; OP-1; IDs OMIM Externo: 112267 MGI: 103302 HomoloGene: 20410 GeneCards: BMP7 Gene. Species: Human; Entrez: 655; Ensembl: ENSG00000101144; UniProt: P18075; RefSeq (mRNA): NM_001719; RefSeq (protein): NP_001710; Location (UCSC): Chr 20: 55.74 – 55.84 Mb. Species: Mouse; Entrez: 12162; Ensembl: ENSMUSG00000008999; UniProt: P23359; RefSeq (mRNA): NM_007557; RefSeq (protein): NP_031583; Location (UCSC): Chr 2: 172.87 – 172.94 Mb. Como se describe aquí, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que se une a BMP 7 se une a la proteína BMP 7.

[00222] “Hepcidina” hace referencia a el gen de hepcidina o la proteína hepcidina, una hormona peptídica. La hepcidina es también conocida como: HAMP (proteína antimicrobiana hepcidina o péptido); HEPC; HFE2B; LEAP1 (LEAP-1); PLTR; OMIM: 606464; HomoloGene: 81623; GeneCards: HAMP Gene; Entrez 57817; Ensembl ENSG00000105697; UniProt P81172; RefSeq (mRNA) NM_021175; RefSeq (protein) NP_066998; Location (UCSC) Chr 19: 35.77 – 35.78 Mb. Krause et al. FEBS Lett. 480: 147-150; and Pigeon et al. 2001 J. Biol. Chem. 276: 7811-9. See also: Ganz 2003 Blood 102: 783-8; Roy et al. 2005 Curr. Opin. Hemat. 12: 107-111; Fleming et al. 2006 Semin. Liver Dis. 25: 411-9; Park et al. 2001 J. Biol. Chem. 276: 7806-10; Majore et al. 2002 Haematologica 87: 221-2;

Kluver et al. 2002 J. Pept. Res. 59 : 241-8; Hunter et al. 2002 J. Biol. Chem. 277 : 37597-603; Weinstein et al. 2003 Blood 100 : 3776-81; Nemeth et al. 2003 Blood 101: 2461-3; Roetto et al. 2003 Nat. Genet. 33: 21-2; Strausberg et al. 2003 Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 16899-903; Gehrke et al. 2003 Blood 102: 371-6;
5 Merryweather-Clarke et al. 2004 Human Mol. Genet. 12:2241-7; Clark et al. 2003 Genome Res. 13: 2265-70; Roetto et al. 2004 Blood 103: 2407-9; Jacolot et al. 2004 Blood 103: 2835-40; and Ota et al. 2004 Nat. Genet. 36: 40-45.

[00223] "Anemia", como se usa aquí, significa una disminución en el número de células rojas de la sangre, o una disminución en la cantidad de hemoglobina o
10 de hierro en la sangre, con una disminución de la capacidad de la sangre para transportar oxígeno.

[00224] La anemia puede ser diagnosticada mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, como un ejemplo no limitativo, en niveles de hemoglobina en base a hombres de menos de aproximadamente 130 a 140 g/L
15 (13 a 14 g/dL) y en las mujeres, de menos de aproximadamente 120 a 130 g/L (12 a 13 g/dL). Janz et al. 2013 Emerg.Medicina. Pract. 15: 1-15; y Smith 2010 Am. J. hombre. Cuidado 16 Supp. S59-66.

[00225] Tal como se utiliza aquí, los términos "anticuerpo BMP6," "anticuerpo anti-humano BMP6", "anticuerpo de unión a BMP6", "anticuerpo BMP6
20 antagonista" y similares (y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos) incluyen anticuerpos (y fragmentos de unión al antígeno) que se unen a la proteína BMP6.

[00226] Los términos "anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno del mismo", "porción de unión a antígeno" y similares, como se usa aquí, incluyen
25 anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") o cadenas simples de los mismos. Un "anticuerpo" de origen natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena
30 pesada (abreviada en este 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 cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son las regiones más conservadas, denominadas marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino-terminal al carboxi-terminal 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 interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos del huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

[00227] Los términos “fragmentos de unión al antígeno”, “fragmento de unión al antígeno del mismo” “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, y similares, como se usa aquí, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, BMP6). Las funciones de unión a un antígeno de un anticuerpo pueden ser realizadas por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión implicados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen 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 categoría de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward et al, 1989 Nature 341: 544 a 546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

[00228] Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador artificial péptidico que les permite ser realizados como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; and Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla incluyen una o más "porciones de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se rastrean en busca de utilidad, de la misma manera que los anticuerpos intactos.

[00229] Las porciones de unión a antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126 -1,136). Porciones de anticuerpos de unión a antígeno se pueden injertar en los andamios basados en polipéptidos tales como fibronectina tipo III (Fn3) (véase el documento US Pat. No. 6,703,199, que describe monocuerpos polipeptídicos fibronectina).

[00230] Porciones de unión a antígeno se pueden incorporar en moléculas de cadena sencilla que comprenden un par de segmentos de Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8 (10): desde 1057 hasta 1062; y la Patente US No. 5.641.870).

[00231] Tal como se utiliza aquí, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en los sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo "categoria" interactúa a través de fuerzas débiles no covalentes con antígenos en numerosos sitios; entre más interacciones, más fuerte es la afinidad.

[00232] Tal como se utiliza aquí, el término "avidez" se refiere a una medida informativa sobre la estabilidad general o la fuerza del complejo anticuerpo-

antígeno. Es controlada por tres factores principales: la afinidad del epítopo de anticuerpo; la valencia de tanto el 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 enlace a un epítopo preciso del antígeno.

[00233] El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintético, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son más tarde modificados, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O- fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina sulfonio metilo. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a la de un aminoácido de origen natural.

[00234] El término "especificidad de unión", como se usa aquí se refiere a la capacidad de un sitio de combinación individual de un anticuerpo para reaccionar con solamente un determinante antigénico. El sitio de combinación del anticuerpo se encuentra en la porción Fab de la molécula y se construye a partir de las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras. La afinidad de unión de un anticuerpo es la fuerza de la reacción entre un único determinante antigénico y un único sitio de combinación del anticuerpo. Es la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas que operan entre el determinante antigénico y el sitio de combinación del anticuerpo.

[00235] La unión específica entre dos entidades significa una unión con una constante de equilibrio (K_A o K_A) de al menos 1×10^7 , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , o 10^{11} M^{-1} . La frase "específicamente (o selectivamente) se une" a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de unión a BMP6) se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de un antígeno afín (por ejemplo, una proteína BMP6 humana) en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Además de la constante de equilibrio (K_A) denotada anteriormente, un anticuerpo de unión a BMP6 de la invención típicamente también tiene una constante de velocidad de disociación (K_d o K_D o K_D) de aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, o menos, y se une a BMP6 con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BMP2, BMP5 o BMP7). Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

[00236] La unión específica entre dos entidades significa una unión con una constante de equilibrio (K_A) (k_{on}/k_{off}) de al menos 10^2 M^{-1} , al menos $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^3 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^4 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^5 M^{-1} , al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^6 M^{-1} , por lo menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^7 M^{-1} , al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^8 M^{-1} , al menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^9 M^{-1} , al menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{10} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{11} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{12} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{13} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{14} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, por lo menos 10^{15} M^{-1} , o al menos $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$.

[00237] El término "anticuerpo quimérico" (o fragmento de unión al antígeno del mismo) es una molécula de anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada de modo que el sitio de unión del antígeno (región variable) está unida a una región constante de clase diferente o alterada,

función efectora y/o especies, o una molécula completamente diferente que le confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, farmacos, etc .; o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón puede ser modificado mediante la sustitución de su región constante con la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido a la sustitución con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad en el reconocimiento del antígeno, mientras que tiene antigenicidad reducida en humanos en comparación con el anticuerpo de ratón original.

[00238] El término "variante modificada de forma conservada" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservada se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde 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 funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservada. Cada secuencia de ácido nucleico en este 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 es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por

consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

[00239] Para las secuencias de polipéptidos, las "variantes modificadas de manera conservadora" incluyen sustituciones individuales, deleciones o adiciones

5 a una secuencia de polipéptido que dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidos en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora se suman a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de
10 la invención. 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) Asparagina (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
15 (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)). En una realización, el término "modificaciones de secuencias conservativas" se usa para referirse a las modificaciones de los amino ácidos que no afectan o ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

20 [00240] El término "bloquea" como se utiliza aquí se refiere a detener o prevenir una interacción o un proceso, por ejemplo, detener la señalización ligando-dependiente o independiente de ligando.

[00241] El término "reconoce" como se usa aquí se refiere a un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno del mismo que se encuentra e interactúa (por
25 ejemplo, se une) con su epítipo conformacional.

[00242] Los términos "reacción cruzada", "reacciona cruzadamente", "reaccionando cruzadamente", "compite" "compite cruzadamente" y términos relacionados se usan indistintamente en el presente documento para referirse a la capacidad de un anticuerpo u otro agente de unión para interferir con la unión de

otros anticuerpos o agentes de unión a BMP6 en un ensayo de unión competitivo estándar.

[00243] La habilidad o grado en el que un anticuerpo u otro agente de unión es capaz de interferir con la unión de otro anticuerpo o molécula de unión a BMP6, y por lo tanto reaccionar cruzadamente de acuerdo con la invención, puede ser determinada usando ensayos de competición de unión estándar. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore (por ejemplo, utilizando el instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia)), que puede medir el alcance de las interacciones utilizando la tecnología de resonancia de plasmón superficial. Otro ensayo para medir las reacciones cruzadas utilizan un enfoque basado en ELISA.

[00244] El término “neutraliza” significa que un anticuerpo, al unirse a su objetivo, reduce la actividad, el nivel o la estabilidad del objetivo; por ejemplo, un anticuerpo BMP6, tras la unión a BMP6, neutraliza a BMP6 mediante la reducción de por lo menos parcialmente la actividad, nivel o la estabilidad de BMP6, tal como la señalización o su papel en los niveles de hepcidina y anemia.

[00245] El término “epítopo” significa una proteína determinante capaz de unirse a un anticuerpo específico. Los epítopos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión de los primeros pero no la de los últimos se pierde en presencia de disolventes de desnaturalización.

[00246] El término “epítopo” incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o interactuar de otra manera con una molécula. Los determinantes epitópicos consisten generalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos BMP6 o hidratos de carbono o cadenas laterales de azúcares y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como

características de carga específicas. Un epítopo puede ser “lineal” o “conformacional”.

[00247] El término “epítopo lineal” se refiere a un epítopo con todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula de interacción (como un anticuerpo) encontrándose linealmente lo largo de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína (continua).

[00248] Tal como se utiliza aquí, el término "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, o 10^{-10} M, o 10^{-11} M o menos para un antígeno diana, por ejemplo, BMP6. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de 10^{-7} M o menos, o 10^{-8} M o menos.

[00249] El término "anticuerpo humano" (o fragmento de unión al antígeno del mismo), como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos (y sus fragmentos de unión a antígeno) que tienen regiones variables en donde tanto el marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva también de tales secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de las secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención pueden incluir residuos 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).

[00250] Las frases “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” (o su fragmento de unión a antígeno) tal como se utiliza aquí, se refiere a polipéptidos, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, etc., que tienen una secuencia sustancialmente idéntica de aminoácidos o que se derivan de la misma fuente genética. Este término también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpo de composición

molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

[00251] El término "anticuerpo monoclonal humano" (o su fragmento de unión al antígeno) se refiere a anticuerpos (y sus fragmentos de unión al antígeno) que presentan una sola especificidad de unión, la cual tiene regiones variables en las que tanto el marco como las regiones CDR se derivan a partir de secuencias humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada .

[00252] La frase "anticuerpo recombinante humano" (o su fragmento de unión a antígeno), tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos (y sus fragmentos de unión al antígeno) que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tal como los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes humanos de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de derivados de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humana combinatoria, recombinante y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de la totalidad o una porción de las secuencias de un gen de inmunoglobulina humana, en otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que el marco y las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque

derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

[00253] Un anticuerpo "humanizado" (o su fragmento de unión al antígeno),
5 como se usa aquí, es un anticuerpo (o su fragmento de unión al antígeno) que
retiene la reactividad de un anticuerpo no humano mientras que es menos
inmunogénico en los seres humanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante
la retención de las regiones CDR no humanas y la sustitución de las partes
10 restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos (es decir, la región
constante, así como las porciones de marco de la región variable). Véase, por
ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison
and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536,
1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; and Padlan, Molec. Immun.,
31:169-217, 1994. Otros ejemplos de la tecnología de la ingeniería humana
15 incluyen, pero no se limita a la tecnología Xoma descrita en la patente de Estados
Unios. N° 5.766.886.

[00254] Los términos "idéntico", o porcentaje de "identidad" en el contexto de
dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más
secuencias o subsecuencias que son la misma. Dos secuencias son
20 "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje específico de
residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, la identidad de
60%, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad
sobre una región determinada, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia),
cuando son comparados y alineados para una correspondencia máxima sobre una
25 ventana de comparación, o una región designada según se mida usando uno de
los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineamiento
manual e inspección visual. Opcionalmente, existe la identidad sobre una región
que es al menos de aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de
longitud, o más preferiblemente sobre una región que es de 100 a 500 o 1000 o
30 más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más amino ácidos) de longitud. Opcionalmente,

la identidad existe sobre una región que es de al menos 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente sobre una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

[00255] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de ensayo. 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 los parámetros del programa de algoritmo de secuencia se designan. Los parámetros por defecto del programa se pueden utilizar, o los parámetros alternativos pueden ser designados. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

[00256] Una "ventana de comparación", como se usa aquí, incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste de 20 a 600, por lo general aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 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 se alinean de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Mates. 2: 482c, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol.Biol. 48: 443, 1970, por la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante alineación

manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003)).

[00257] Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el

porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos

5 BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:

3.389 a 3402, 1977; y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 a 410, 1.990,

respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible

públicamente a través del Centro Nacional de Información sobre

Biotecnología. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de

10 alta valores (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia

problema, que coinciden o satisfacen algún valor T de umbral de valor positivo

cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de

base de datos. T es referido como el valor de umbral de la palabra vecina (Altschul

et al., Supra). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para

15 iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. Las palabras

se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como la

valores de alineamiento acumulativa se pueda aumentar. Los valores

acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros

M (valores de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N

20 (valores de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para

secuencias de aminoácidos, una matriz de valores se utiliza para calcular los

valores acumulativos. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección

se detiene cuando: los valores de alineamiento acumulativos disminuyen en la

cantidad X de su valor máximo alcanzado; los valores acumulativos llegan a cero o

25 menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de valor

negativo; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del

algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la

alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto

una longitud de palabra (N) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una

30 comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa

BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de valores BLOSUM62 (ver Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) alineaciones (B) de los 50, la expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas.

5 [00258] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos
10 secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la menor probabilidad de suma en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.2, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.01, y lo más preferiblemente
15 menos de aproximadamente 0.001.

[00259] El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988), versión que ha sido incorporada en el programa ALIGN (2,0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una
20 penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) algoritmo que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz BLOSUM62 o
25 una matriz PAM250, 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.

[00260] Además del porcentaje de identidad de secuencia que se ha indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el
30 primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con los

anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como esta descrito abajo. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Sin embargo, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden usarse para amplificar la secuencia.

[00261] El término "anticuerpo aislado" (o su fragmento de unión al antígeno), como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo (o su fragmento de unión al antígeno), que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo un anticuerpo aislado que específicamente se une a BMP6 y está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos BMP6). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material y/o producto químico celular.

[00262] El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG4) que es proporcionado por los genes de la región constante de la cadena pesada. Isotipo también incluye versiones modificadas de una de estas clases, donde se han realizado modificaciones para alterar la función Fc, por ejemplo, para aumentar o reducir las funciones efectoras o de unión a los receptores Fc.

[00263] El término "Kassoc" o "Ka" o "KA" o " K_A ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno en particular, mientras que el término "Kdis" o "Kd", como se usa aquí, pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. En una realización, el término " K_D ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene de la proporción de Kd para Ka (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una

concentración molar (M). Los valores K_D para los anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón superficial, o utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore ®.

5 [00264] Los términos "anticuerpo monoclonal" (o su fragmento de unión al antígeno) o "composición de anticuerpo monoclonal (o su fragmento de unión a antígeno) " tal como se utilizan aquí, se refieren a una preparación de una molécula de anticuerpo (o su fragmento de unión a antígeno) de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una
10 sola especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

[00265] El término "ácido nucleico" se usa aquí de forma intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono- o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos o residuos o enlaces
15 del esqueleto 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 la de los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación a fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales,
20 ribonucleótidos-2-O-metilo, ácidos nucleicos peptídicos (PNAS).

[00266] A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular abarca también implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada
25 explícitamente. Específicamente, como se detalla a continuación, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o (o todos) los codones seleccionados están sustituidos con una base mixta y/o residuos de desoxiinosina (Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608,
30 1985; and Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

[00267] El término "unido operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor o secuencia intensificadora está unida operativamente a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias promotoras reguladoras de la transcripción que se unen operativamente a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, son de actuación cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, tales como los potenciadores, no necesitan estar físicamente contiguas o localizadas en estrecha proximidad a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

[00268] Tal como se utiliza aquí, el término, "optimizado" significa que una secuencia de nucleótidos ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos usando los codones que son preferidos en la célula u organismo de producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada está diseñada para retener completamente o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "parental". Las secuencias optimizadas en este documento han sido diseñadas para tener los codones preferidos en células de mamíferos. Sin embargo, la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas o células procariotas también se prevé en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos optimizadas también se referencian como optimizadas.

[00269] Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de

aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de origen natural de aminoácidos y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de polipéptido particular abarca también implícitamente
5 variantes modificadas de manera conservadora de la misma.

[00270] El término "anticuerpo humano recombinante" (o su fragmento de unión al antígeno), como se usa aquí, incluye todos los anticuerpos humanos (y sus fragmentos de unión a antígeno) que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por
10 ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado de la misma, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinante, combinatoria, y anticuerpos preparados,
15 expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique empalme de la totalidad o de una porción de secuencias de un gen de inmunoglobulina humana, a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que el marco y las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, sin
20 embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con la línea germinal
25 humana, las secuencias VH y VL, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

[00271] El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que tales términos pretenden referirse
30 no sólo a la célula en particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que

pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance de la expresión "célula huésped" como se usa en el presente documento.

5 [00272] 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, pollos, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indique, los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan aquí de forma intercambiable.

10 [00273] El término "tratamiento" incluye la administración de composiciones o anticuerpos para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones, o indicios bioquímicos de una enfermedad (por ejemplo, anemia), aliviando los síntomas o deteniendo o inhibiendo un mayor desarrollo de la enfermedad, afección, o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para evitar o retrasar la
15 aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o una supresión o un alivio terapéutico de los síntomas tras la manifestación de la enfermedad.

[00274] El término "vector" pretende referirse a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha unido. Un tipo
20 de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos
25 que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo replicarse junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a
30 los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan aquí como

"vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales y otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

[00275] El un término "hematocrito" o "haematocrito", como se usa en este documento, también se conoce como un volumen de células empaquetadas (PCV) o fracción de volumen de eritrocitos (EVF) y es el volumen (%) de las células rojas de la sangre en sangre. Se trata normalmente de alrededor del 45% para los hombres y un 50% para las mujeres. Se considera una parte integral del resultados del hemograma completo de una persona, junto con la concentración de hemoglobina, recuento de glóbulos blancos, y conteo de plaquetas. En una realización, la anemia se refiere a un hematocrito anormalmente bajo, en contraste con la policitemia, que es un hematocrito anormalmente alto.

[00276] BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[00277] Fig. 1A muestra una inhibición de la actividad de BMP por los anticuerpos antagonistas 5, 6 y 7 en ensayos de gen reportero. Se muestra actividad contra BMP2, BMP5, BMP6 y BMP7. La Fig. 1B muestra un ensayo de unión ELISA poniendo a prueba la unión del anticuerpo 7 a BMP6 humana, BMP7 humana, BMP5 humana, BMP6 de ratón, hBaffR, BSA y Neu. En esta figura y varias otras figuras, y en otra parte en la especificación, Ab 5 = Anticuerpo 5; Ab 6 = Anticuerpo 6; y Ab 7 = Anticuerpo 7.

[00278] Fig. La figura 2 muestra los perfiles de farmacodinamia de un estudio de dosis única de selección PK de rata. Los anticuerpos 5, 6 y 7 se utilizaron. Los niveles de hepcidina y de hierro en suero se midieron a 1 hora, a 6 horas, 1, 2, 4, 8, 16 días después de la dosis (10 mg/kg, IV).

[00279] La Fig. 3 muestra los efectos dependientes de la dosis de un anticuerpo BMP6 sobre los biomarcadores séricos del metabolismo del hierro. Arriba: La concentración sérica de hlgG en el tiempo después de una única inyección intravenosa del anticuerpo 6 a las dosis indicadas. Abajo: El panel izquierdo es un análisis cuantitativo de la concentración de hepcidina sérica después de una única inyección de anticuerpo 6 o de la IgG humana control, mientras que el panel derecho es la concentración de hierro sérico.

[00280] La figura 4 muestra el tratamiento terapéutico del anticuerpo BMP6 en una anemia ESA resistente del modelo de inflamación ratón. Arriba: esquema experimental de anemia BA inducida ESA resistente de modelo inflamatorio. Abajo: Los parámetros de la eritropoyesis en 13 días después del tratamiento BA. HGB: hemoglobina; HCT: hematocrito; RETA: recuento de reticulocitos; RET-HE: hemoglobina de reticulocitos equivalente. * P <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001 frente a BA + EPO + hlgG1.

[00281] Fig. La figura 5 muestra el mapeo de epítomos lineales por HDxMS (intercambio de hidrógeno/deuterio junto con espectrometría de masas). El epítomo de BMP6 unido por el anticuerpo 7 se muestra (residuos 88-102 de BMP6 humana (QTLVHLMNPEYVPKP)). Se encontró, usando HDxMS, que el anticuerpo 676, una versión humanizada de un anticuerpo BMP6 disponible comercialmente, se une a un epítomo constituido por los residuos 23-35 de BMP6 humana (VSSASDYNSSSELK).

[00282] La figura 6 muestra el protocolo para la Parte 1 del programa clínico para investigar la seguridad y eficacia de los anticuerpos BMP6.

[00283] La figura 7 muestra el árbol de decisión de ajuste de dosis en el programa clínico para investigar la seguridad y la eficacia de los anticuerpos BMP6.

[00284] La figura 8 muestra el protocolo para la Parte 2 del programa clínico para investigar la seguridad y eficacia de los anticuerpos BMP6.

[00285] La Fig. 9 muestra los perfiles farmacocinéticos de una sola dosis de anticuerpo 7 en ratas macho.

[00286] La Fig. 10 muestra los efectos dependientes de la dosis del anticuerpo 7 sobre biomarcadores séricos del metabolismo del hierro en ratas. Se muestra el análisis cuantitativo de la concentración de hepcidina en suero después de una única inyección del anticuerpo 7 o del control (transportador) a la dosis indicada. El panel izquierdo muestra una vista ampliada de los efectos en las primeras 24 horas después de la administración.

[00287] La Fig. 11 muestra los efectos dependientes de anticuerpo 7 en hierro sérico en ratas. Se muestra el análisis cuantitativo de la concentración de hierro sérico después de una única inyección del anticuerpo 7 o del control (transportador) a la dosis indicada. El panel izquierdo muestra una vista ampliada de los efectos en las primeras 24 horas después de la administración.

[00288] La Fig. 12 muestra el perfil de concentración-tiempo de la inyección intravenosa de dosis única de Anticuerpo 7 (3 mg/kg) en monos cynomolgus. Se grafica la concentración total de anticuerpo 7 (tanto libre como unido a BMP6).

[00289] La Fig. 13 muestra la hepcidina sérica y la concentración de Fe en monos cynomolgus macho después de una sola inyección intravenosa de anticuerpos 7 a una dosis de 3 mg/kg. Los datos de tres monos diferentes se muestran, junto con la media.

[00290] DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[00291] La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a la proteína BMP6, composiciones farmacéuticas, métodos de producción y métodos de uso de tales anticuerpos y composiciones.

[00292] ANTICUERPOS BMP6 Y SUS FRAGMENTOS DE UNIÓN A ANTÍGENO

[00293] La presente invención proporciona anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a BMP6 humano.

[00294] BMP6, un ligando secretado de la familia del factor de crecimiento BMP, se ha identificado como un regulador endógeno crítico de la expresión hepática de la hormona del metabolismo del hierro hepcidina. Sin estar limitada por ninguna teoría particular, esta divulgación sugiere un anticuerpo antagonista BMP6, como una terapia que disminuye la hepcidina para beneficiar a los pacientes con anemia por deficiencia de hierro mediante la superación de la resistencia a agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), lo que aumenta sustancialmente la morbilidad de una enfermedad subyacente y es a menudo un factor predictivo de resultados adversos.

[00295] Ejemplos de tales anticuerpos BMP6 anti-humanos son los anticuerpos 3, 5, 6 y 7, cuyas secuencias se enumeran en la Tabla 1.

[00296] Los anticuerpos 5, 6 y 7 se unen con alta afinidad a BMP6 humana, con alta selectividad sobre BMP7 humana, BMP5 humana y BMP2 humana (véase Fig. 1 A). Estos anticuerpos también demuestran generar disminución de la hepcidina en suero y un aumento de hierro en suero en ratas (ver Fig. 2).

[00297] Para proporcionar una prueba más de que la orientación de esta vía puede conferir la mejora de criterios de valoración funcionales, hemos probado la capacidad de los anticuerpos BMP6 específicos, anticuerpos 5 a 7, para modular los biomarcadores séricos para el metabolismo del hierro en ratones y ratas normales, y para revertir la anemia resistente a ESA en un modelo de ratón de anemia inflamatoria. Hemos encontrado que una sola inyección de animales con anticuerpos BMP6 resultó en un aumento sostenido de los niveles de hierro sérico, acompañado por una potente supresión de hepcidina circulante. Además, el tratamiento terapéutico de los ratones sometidos a la anemia inducida por la inflamación mejoró significativamente los parámetros eritropoyéticos en respuesta al tratamiento con eritropoyetina concurrente.

[00298] En esta descripción, la inhibición de la señalización de BMP6 en un modelo de ratón de la anemia inflamatoria sustancialmente mejoró los parámetros de las células rojas dependientes de hierro.

[00299] Los anticuerpos antagonistas de BMP6 descritos en este documento representan un nuevo enfoque terapéutico para mejorar con seguridad la anemia con una hipo-respuesta a eritropoyetina. Sin estar limitado por ninguna teoría particular, esta divulgación sugiere que esto puede ocurrir a través de la movilización y la disponibilidad de las reservas de hierro a la demanda desde el compartimiento de eritroides.

[00300] En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos aislados o sus fragmentos de unión al antígeno que se unen con una afinidad 100, 500 o 1000 veces mayor por la proteína BMP6 humana, que a cualquiera: BMP5 humana o proteína BMP7 humana. Una especificidad en cuanto a BMP6 sin que este se una a BMP7 es importante, ya que el knock-out de BMP6 no es letal para ratones. Sin embargo, los ratones knock-out para BMP7 mueren después de nacer con defectos renales, oculares y de los huesos. knock-outs individuales de uno u otro gen no alteran la cardiogénesis, pero un doble knock-out de BMP6 y BMP7 demostró varios defectos y retrasos en el corazón; los embriones murieron de insuficiencia cardíaca. BMP7 es importante en la prevención de la progresión de la enfermedad cardíaca crónica asociada con la fibrosis. Por lo tanto, la reactividad cruzada de un anticuerpo anti-BMP6 con BMP7 no es deseable. Los anticuerpos proporcionados en este documento son específicos para BMP6 sobre BMP7; Véase, por ejemplo, la Tabla 4A. la Fig. 1B también muestra evidencia de la especificidad de unión a BMP6 humana sobre las proteínas humanas BMP2, BMP5 y BMP7. En contraste, un anticuerpo BMP6 disponible comercialmente de R & D Systems, por ejemplo, reveló tener una fuerte reactividad cruzada con BMP7 en un ensayo de gen reportero, e inhibir tanto BMP6 como BMP7.

[00301] Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos monoclonales humanos, aislados como se describe, en los ejemplos (véase la Sección 6 más adelante).

[00302] Ejemplos de tales anticuerpos BMP6 anti-humanos son los anticuerpos 3, 5, 6 y 7, cuyas secuencias se enumeran en la Tabla 1.

[00303] El anticuerpo 7 madurado se deriva del generador de línea germinal/removedor de PTM NOV0442_VL (YGQ), el cual se deriva de un IgG
5 HIT parental NOV0442 (VH3_3-15, VI1_1e). El anticuerpo 7 se une con alta afinidad a BMP6 humana en un ensayo de unión ELISA, con selectividad sobre BMP7 humana de más de 500 veces (es decir, una afinidad a BMP6 humana 500 veces mayor que para BMP7 humana). Este anticuerpo tampoco tiene actividad detectable contra BMP2 humana o BMP5. El péptido BMP6 reconocido por la IgG
10 parental NOV0442 7 y el anticuerpo 7 se muestra en la Fig. 5. El péptido comprende los aminoácidos QTLVHLMNPEYVPKP (SEQ ID NO: 211) de BMP6 humana. En contraste con IgG NOV0442 y el anticuerpo 7, mAb507 humanizado (R & D Systems) se une a la secuencia VSSASDYNSSSELK (SEQ ID NO: 214) de BMP6 humano. Por lo tanto, el epítipo reconocido por IgG NOV0442 y el
15 anticuerpo 7 representa un nuevo epítipo BMP6. El anticuerpo 7 también inhibe la unión de BMP6 a receptores in vitro. La unión de BMP6 a BMPR1A se inhibe máximo un 59%; la unión a BMPR1B se inhibe máximo 85%; y la unión a RGM-c se inhibe un máximo del 72%. Un solo tratamiento 10 mg/kg en ratas condujo a la supresión sostenida de la hepcidina circulante. La dosis eficaz mínima estimada
20 en ratones es inferior o igual a 0,1 mg/kg. El hierro sérico también mostró un aumento, y la hepcidina mostró una disminución después de una dosis única de anticuerpos en monos de 3 mg/kg. En ratones, en donde el antígeno de *Brucella abortus* se utilizó para simular la anemia, el efecto del tratamiento del anticuerpo 7 (2 mg/kg) es coherente con la respuesta eritropoyética clínicamente significativa a
25 la terapia crónica EPO, con un aumento de la hemoglobina gradual > 2,0 g/dl a partir de la línea de base.

[00304] En el anticuerpo 7, un sitio potencial de modificación post-traducciona se eliminó por una mutación N51Q dentro de LCDR2 para aumentar la homogeneidad del producto posterior. El anticuerpo derivado del marco
30 lambda1/VH3 se ha diseñado con el fin de que coincida con la secuencia de la

línea germinal humana más cercana: en VH por una mutación V40A, en VL por las mutaciones D1Q y I2S y la introducción de aminoácidos Y49 y G50 para reparar el marco en el que estos 2 residuos se encontraban inicialmente faltantes.

[00305] Este trabajo dio lugar al anticuerpo 7 (= NOV0958 = NOV0806_VH [V40A]_VL [D1Q, I2S, Y49, G50, N51Q]).

[00306] Los anticuerpos 3, 5, 6 y 7 todos muestran una alta especificidad para la proteína BMP6 humana en comparación con las proteínas humanas BMP2, BMP5 o BMP7. Se prevé que el epítipo de todos estos anticuerpos que sea el mismo ya que se derivan de un único Fab parental antes de la maduración

de afinidad. El anticuerpo 3, por ejemplo, comparte el mismo clon Fab con ambos anticuerpos 5 y 7 antes de la maduración de afinidad de HCDR2. El anticuerpo 5 se deriva de NOV0442 (VH3_3-15, VI1_1e) → NOV0442_VL(YGQ) → (HCDR2 maduración de afinidad) → Anticuerpo 5. El anticuerpo 3 se deriva de NOV0442 (VH3_3-15,VI1_1e) → NOV0442_VL(YGS) → (HCDR2 maduración de afinidad) →

Anticuerpo 3. Los detalles adicionales con respecto a la generación de los anticuerpos descritos en este documento se proporcionan en los ejemplos.

[00307] La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a BMP6 (por ejemplo, la proteína humana BMP6), dichos anticuerpos comprenden un dominio VH enumerado en la Tabla 1. La presente

invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la proteína BMP6, dichos anticuerpos que comprende una VH CDR tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs de VH enumeradas en la Tabla 1. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la proteína BMP6, dichos anticuerpos que comprenden (o

alternativamente, que consisten en) uno, dos, tres, cuatro, cinco o más VH de CDRs que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de los VH CDRs enumerados en la Tabla 1.

[00308] La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a BMP6, dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno comprenden (o

alternativamente, consiste en) una secuencia VH de aminoácidos enumerados en la Tabla 1, en la que no más de aproximadamente 10 amino ácidos en una secuencia de marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) han sido mutados (en donde una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una
5 adición, sustitución o supresión). La invención también proporciona anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a BMP6, dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno comprenden (o
alternativamente, consisten en) una secuencia VH de aminoácidos enumerados en la Tabla 1, en la que no más de 10 aminoácidos en una secuencia de marco (por
10 ejemplo, una secuencia que no es una CDR) se han mutado (en la que una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una adición, sustitución o supresión).

[00309] La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a BMP6, dichos
15 anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno del mismo que comprenden (o
alternativamente, que consiste en) una secuencia VH de aminoácidos enumerados en la Tabla 1, en la que no más de aproximadamente 20 amino ácidos en una
secuencia de marco (por ejemplo, una secuencia que no es un CDR) han sido mutados (en la que una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una
20 adición, sustitución o supresión). La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a BMP6, dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que comprenden
(o
alternativamente, que consiste en) una secuencia de aminoácidos VH enumerados en la Tabla 1, en la que no más de 20 aminoácidos en una secuencia
25 de marco (por ejemplo, una secuencia que no es un CDR) se han mutado (en la que una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una adición, sustitución o supresión).

[00310] La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a BMP6, dichos
30 anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno comprenden (o

alternativamente, consisten en) una secuencia VL de aminoácidos enumerados en la Tabla 1, en la que no más de aproximadamente 10 amino ácidos en una secuencia de marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) han sido mutados (en la que una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una
5 adición, sustitución o supresión). La invención también proporciona anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a BMP6, dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno del mismo comprenden (o alternativamente, que consisten en) una secuencia VL de aminoácidos enumerados en la Tabla 1, en la que no más de 10 aminoácidos en una secuencia
10 de marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) se han mutado (en la que una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una adición, sustitución o supresión).

[00311] La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a BMP6, dichos
15 anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno comprenden (o alternativamente, consisten en) una secuencia VL de aminoácidos enumerada en la Tabla 1, en la que no más de aproximadamente 20 amino ácidos en una secuencia de marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) han sido mutados (en la que una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una
20 adición, sustitución o supresión). La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a BMP6, dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que comprenden (o alternativamente, que consiste en) una secuencia VL de aminoácidos enumerados en la Tabla 1, en la que no más de 20 aminoácidos en una secuencia
25 de marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) se han mutado (en la que una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una adición, sustitución o supresión).

[00312] La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a la proteína BMP6,
30 dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden

un dominio VL enumerado en la Tabla 1. La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la proteína BMP6, dichos anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que comprenden una CDR VL que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VL enumerados en la Tabla 1. En particular, la invención proporciona anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a la proteína BMP6, dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden (o alternatively, consiste en) uno, dos, tres o más CDR de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs de VL enumeradas en la Tabla 1.

[00313] Otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención incluyen aminoácidos que han sido mutados, sin embargo, tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 1. Una realización, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones CDR cuando se comparan con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1.

[00314] La presente invención también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa, y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a la proteína BMP6. Tales secuencias de ácido nucleico pueden ser optimizadas para su expresión en células de mamífero (por ejemplo, la Tabla 1 muestra un ejemplo de secuencias de ácidos nucleicos para la cadena pesada y la cadena ligera de los anticuerpos 3, 5, 6 y 7).

Tabla 1. Ejemplos de anticuerpos BMP6 de la presente invención

ANTICUERPO 3			SEQ ID NO:
Kabat	HCDR1	SYVVH	9
Kabat	HCDR2	RIKDHKQGYTTAYAASVKG	10

Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	11
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	12
Chothia	HCDR2	KDHKQGYT	13
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	14
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVHWVRQAPGKGLEW VGRIKDHKQGYTTAYAASVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVERSKSGFDNWGQGTTLVTV SS	15
	ADN de	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGG CGGTGGCCTGGTGAACAGGC GGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCG CCGCCTCCGGATTCACCTTTTCTT CTTACGTTGTTCAATTGGGTGCGC CAGGCCCGGGCAAAGGTCTCGA GTGGGTGGGCCGTATCAAAGACC ACAAACAGGGCTACACTACTGCTT ATGCCGCCTCTGTGAAAGGCCGC TTTACCATTAGCCGCGATGATTG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAAAACCGAAGATAC GGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG TTGAACGTTCTAAATCTGGTTTCG ATAACTGGGGCCAAGGCACCCTG GTGACTGTTAGCTCA	16
	Cadena pesada VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVHWVRQAPGKGLEW VGRIKDHKQGYTTAYAASVKGRFTI	17

		SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVERSKSGFDNWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	ADN de cadena pesada	CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGG CGGTGGCCTGGTGAAACCAGGC GGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCG CCGCCTCCGGATTACCTTTTCTT CTTACGTTGTTCAATTGGGTGCGC CAGGCCCCGGGCAAAGGTCTCGA GTGGGTGGGCCGTATCAAAGACC ACAAACAGGGCTACACTACTGCTT ATGCCGCCTCTGTGAAAGGCCGC TTTACCATTAGCCGCGATGATTG AAAAACACCCTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAAAACCGAAGATAC GGCCGTGTATTATTGCGCGCGTG	18

		TTGAACGTTCTAAATCTGGTTTCG ATAACTGGGGCCAAGGCACCCTG GTGACTGTTAGCTCAGCCTCCAC CAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCCGGCTGTC CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACCTCACACATGCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGG GGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGGGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA	
--	--	--	--

		GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	19
Kabat	LCDR2	GSSERPS	20
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	21
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	22
Chothia	LCDR2	GSS	23
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	24
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTG SSSNIGAGYSVHWYQQLPGTAPKL LIYGSSERPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQAEDEADYYCQSWDSS QTLVVFGGGTKLTVL	25

	ADN VL	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCC GAGCGTGAGCGGTGCACCGGGC CAGCGCGTGACCATTAGCTGTAC CGGCAGCAGCAGCAACATTGGTG CTGGTTACTCTGTGCATTGGTACC AGCAGCTGCCGGGCACGGCGCC GAAACTGCTGATCTATGGTAGCTC TGAACGCCCCGAGCGGCGTGCCG GATCGCTTTAGCGGATCCAAAAG CGGCACCAGCGCCAGCCTGGCG ATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGA CGAAGCGGATTATTACTGCCAGT CTTGGGACTCTTCTCAGACTCTG GTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAA GTTAACCGTCCTA	26
	Cadena ligera	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTG SSSNIGAGYSVHWYQQLPGTAPKL LIYGSSERPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQAEDEADYYCQSWDSS QTLVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	27
	ADN de Cadena ligera	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCC GAGCGTGAGCGGTGCACCGGGC CAGCGCGTGACCATTAGCTGTAC CGGCAGCAGCAGCAACATTGGTG CTGGTTACTCTGTGCATTGGTACC	28

		AGCAGCTGCCGGGCACGGCGCC GAAACTGCTGATCTATGGTAGCTC TGAACGCCCCGAGCGGCGTGCCG GATCGCTTTAGCGGATCCAAAAG CGGCACCAGCGCCAGCCTGGCG ATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGA CGAAGCGGATTATTACTGCCAGT CTTGGGACTCTTCTCAGACTCTG GTTGTGTTTGGCGGCGGCACGAA GTTAACCGTCCTAGGTCAGCCCA AGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTG TTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCT TCAAGCCAACAAGGCCACACTGG TGTGTCTCATAAGTGACTTCTACC CGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG GAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCA AGGCGGGAGTGGAGACCACCAC ACCCTCCAAACAAAGCAACAACAA GTACGCGGCCAGCAGCTATCTGA GCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAG TCCACAGAAGCTACAGCTGCCA GGTCACGCATGAAGGGAGCACCG TGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTCA	
ANTICUERPO 5			
Kabat	HCDR1	SYVWH	29
Kabat	HCDR2	RIKRESSSYTTMYAAPVKG	30
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	31
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	32

Chothia	HCDR2	KRESSSYT	33
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	34
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVHWVRQAPGKGLEW VGRIKRESSSYTTMYAAPVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVERSKSGFDNWGQGTLVTV SS	35
	ADN de VH	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGG CGGCGGACTGGTCAAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGC TGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAG CTACGTGGTGCACTGGGTCAGAC AGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTCGGACGGATTAAGAGAGA GTCCTCTAGCTACACTACTATGTA CGCCGCTCCCGTGAAGGGCCGG TTCACTATCTCTAGGGACGACTCT AAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGA GTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTAGC	36
	Cadena pesada	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVHWVRQAPGKGLEW VGRIKRESSSYTTMYAAPVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVERSKSGFDNWGQGTLVTV	37

		SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGG CGGCGGACTGGTCAAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGC TGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAG CTACGTGGTGCACTGGGTCAGAC AGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTCGGACGGATTAAGAGAGA GTCCTCTAGCTACACTACTATGTA CGCCGCTCCCGTGAAGGGCCGG TTCACTATCTCTAGGGACGACTCT AAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGA GTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCC	38

		TGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGC ACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTA CTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTT CCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTT GGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACA GCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTG CCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAGACCCACACCTGCCC CCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGC TGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTG TTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGTCCCACGAGGACCCAGAGGT GAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGT CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATA CAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGG CCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAG	
--	--	---	--

		ACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTC TACCCCAGCGATATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGA CCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAG CGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	39
Kabat	LCDR2	GQSERPS	40
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	41
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	42
Chothia	LCDR2	GQS	43
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	44
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTG SSSNIGAGYSVHWYQQLPGTAPKL LIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQAEDEADYYCQSWDSS QTLVVFGGGTKLTVL	45
	ADN VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCC TAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTC	46

		AGAGAGTGACTATTAGCTGCACC GGCTCTAGCTCTAATATCGGCGC TGGCTATAGCGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCCCGGCACCGCCCCT AAGCTGCTGATCTACGGTCAGTC AGAGCGGCCTAGCGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGCTCTAAGTC AGGCACTAGCGCTAGTCTGGCTA TCACCGGCCTGCAGGCTGAGGAC GAGGCCGACTACTACTGTCAGTC CTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAG CTGACCGTGCTG	
	Cadena ligera	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTG SSSNIGAGYSVHWYQQLPGTAPKL LIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQAEDEADYYCQSWDSS QTLVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	47
	ADN de Cadena ligera	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCC TAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTC AGAGAGTGACTATTAGCTGCACC GGCTCTAGCTCTAATATCGGCGC TGGCTATAGCGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCCCGGCACCGCCCCT AAGCTGCTGATCTACGGTCAGTC	48

		AGAGCGGCCTAGCGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGCTCTAAGTC AGGCACTAGCGCTAGTCTGGCTA TCACCGGCCTGCAGGCTGAGGAC GAGGCCGACTACTACTGTCAGTC CTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAG CTGACCGTGCTGGGTCAGCCTAA GGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGT TCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTG CAGGCCAACAAGGCCACCCTGGT GTGCCTGATCAGCGACTTCTACC CAGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCCGTG AAGGCCGGCGTGGAGACCACCA CCCCCAGCAAGCAGAGCAACAAC AAGTACGCCGCCAGCAGCTACCT GAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGA AGAGCCACAGGTCCTACAGCTGC CAGGTGACCCACGAGGGCAGCA CCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCA ACCGAGTGCAGC	
ANTICUERPO 6			
Kabat	HCDR1	SYVVH	49
Kabat	HCDR2	RTRHSDMGYATSYAAPVKG	50
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	51
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	52
Chothia	HCDR2	RHSDMGYA	53
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	54

	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVHWVRQAPGKGLEW VGRTRHSDMGYATSYAAPVKGRFT ISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVERSKSGFDNWGQGTLVTV SS	55
	ADN de VH	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGG CGGCGGACTGGTCAAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGC TGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAG CTACGTGGTGCAGTGGGTCAGAC AGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTCGGACGGACTAGACACTC AGATATGGGCTACGCTACTAGCT ACGCCGCTCCCGTGAAGGGCCG GTTCACTATCTCTAGGGACGACTC TAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGA GTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTAGC	56
	Cadena pesada	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVHWVRQAPGKGLEW VGRTRHSDMGYATSYAAPVKGRFT ISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVERSKSGFDNWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL	57

		TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGG CGGCGGACTGGTCAAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGC TGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAG CTACGTGGTGCAGTGGGTCAGAC AGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTCGGACGGACTAGACACTC AGATATGGGCTACGCTACTAGCT ACGCCGCTCCCGTGAAGGGCCG GTTCACTATCTCTAGGGACGACTC TAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGA GTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGC ACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCC	58

		CCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTA CTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTT CCCCGAGCCCGTGACAGTGTCT GGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACA GCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTG CCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAGACCCACACCTGCCC CCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGC TGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTG TTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGTCCCACGAGGACCCAGAGGT GAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGT CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATA CAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGG CCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAG ACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA	
--	--	---	--

		CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTC TACCCAGCGATATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGA CCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTCACTGCAG CGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	59
Kabat	LCDR2	GQSERPS	60
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	61
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	62
Chothia	LCDR2	GQS	63
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	64
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTG SSSNIGAGYSVHWYQQLPGTAPKL LIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQAEDEADYYCQSWDSS QTLVVFGGGTKLTVL	65
	ADN VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCC TAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTC AGAGAGTGACTATTAGCTGCACC GGCTCTAGCTCTAATATCGGCGC	66

		TGGCTATAGCGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCCCGGCACCGCCCCT AAGCTGCTGATCTACGGTCAGTC AGAGCGGCCTAGCGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGCTCTAAGTC AGGCACTAGCGCTAGTCTGGCTA TCACCGGCCTGCAGGCTGAGGAC GAGGCCGACTACTACTGTCAGTC CTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAG CTGACCGTGCTG	
	Cadena ligera	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTG SSSNIGAGYSVHWYQQLPGTAPKL LIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQAEDEADYYCQSWDSS QTLVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	67
	Cadena ligera ADN	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCC TAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTC AGAGAGTGACTATTAGCTGCACC GGCTCTAGCTCTAATATCGGCGC TGGCTATAGCGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCCCGGCACCGCCCCT AAGCTGCTGATCTACGGTCAGTC AGAGCGGCCTAGCGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGCTCTAAGTC	68

		AGGCACTAGCGCTAGTCTGGCTA TCACCGGCCTGCAGGCTGAGGAC GAGGCCGACTACTACTGTCAGTC CTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAG CTGACCGTGCTGGGTCAGCCTAA GGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGT TCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTG CAGGCCAACAAGGCCACCCTGGT GTGCCTGATCAGCGACTTCTACC CAGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCCGTG AAGGCCGGCGTGGAGACCACCA CCCCCAGCAAGCAGAGCAACAAC AAGTACGCCGCCAGCAGCTACCT GAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGA AGAGCCACAGGTCCTACAGCTGC CAGGTGACCCACGAGGGCAGCA CCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCA ACCGAGTGCAGC	
ANTICUERPO 7			
Kabat	HCDR1	SYVVH	69
Kabat	HCDR2	RIRLETHGYAAEYAASVKG	70
Kabat	HCDR3	VERSKSGFDN	71
Chothia	HCDR1	GFTFSSY	72
Chothia	HCDR2	RLETHGYA	73
Chothia	HCDR3	VERSKSGFDN	74
	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA	75

		SGFTFSSYVHWVRQAPGKGLEW VGRIRLETHGYAAEYAASVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVERSKSGFDNWGQGTLVTV SS	
	ADN de VH	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGG CGGCGGACTGGTCAAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGC TGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAG CTACGTGGTGCAGTGGGTCAGAC AGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTCGGACGGATTAGACTGGA AACTCACGGCTACGCCGCCGAGT ACGCCGCTAGTGTGAAGGGCCG GTTCACTATCTCTAGGGACGACTC TAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGA GTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTAGC	76
	Cadena pesada	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYVHWVRQAPGKGLEW VGRIRLETHGYAAEYAASVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVERSKSGFDNWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV	77

		PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGAATCAGG CGGCGGACTGGTCAAGCCTGGC GGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGC TGCTAGTGGCTTCACCTTCTCTAG CTACGTGGTGCACTGGGTCAGAC AGGCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTCGGACGGATTAGACTGGA AACTCACGGCTACGCCGCCGAGT ACGCCGCTAGTGTGAAGGGCCG GTTCACTATCTCTAGGGACGACTC TAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGA GTGGAACGGTCTAAGTCAGGCTT CGATAACTGGGGTCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGC ACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTA	78

		CTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTT CCCCGAGCCCGTGACAGTGTCT GGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACA GCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTG CCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAGACCCACACCTGCCC CCCCTGCCAGCTCCAGAACTGC TGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTG TTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGTCCACGAGGACCCAGAGGT GAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGT CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATA CAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGG CCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAG ACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGA	
--	--	--	--

		GATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTC TACCCAGCGATATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGA CCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAG CGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG	
Kabat	LCDR1	TGSSSNIGAGYSVH	79
Kabat	LCDR2	GQSERPS	80
Kabat	LCDR3	QSWDSSQTLVV	81
Chothia	LCDR1	SSSNIGAGYS	82
Chothia	LCDR2	GQS	83
Chothia	LCDR3	WDSSQTLV	84
	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTG SSSNIGAGYSVHWYQQLPGTAPKL LIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQAEDEADYYCQSWDSS QTLVVFGGGTKLTVL	85
	ADN VL	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCC TAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTC AGAGAGTGACTATTAGCTGCACC GGCTCTAGCTCTAATATCGGCGC TGGCTATAGCGTGCCTGGTATC	86

		AGCAGCTGCCCCGGCACCGCCCCCT AAGCTGCTGATCTACGGTCAGTC AGAGCGGCCTAGCGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGCTCTAAGTC AGGCACTAGCGCTAGTCTGGCTA TCACCGGCCTGCAGGCTGAGGAC GAGGCCGACTACTACTGTCAGTC CTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAG CTGACCGTGCTG	
	Cadena ligera	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTG SSSNIGAGYSVHWYQQLPGTAPKL LIYGQSERPSGVPDRFSGSKSGTS ASLAITGLQAEDEADYYCQSWDSS QTLVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	87
	ADN ligera Cadena	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCC TAGCGTCAGCGGCGCTCCCGGTC AGAGAGTGACTATTAGCTGCACC GGCTCTAGCTCTAATATCGGCGC TGGCTATAGCGTGCACTGGTATC AGCAGCTGCCCCGGCACCGCCCCCT AAGCTGCTGATCTACGGTCAGTC AGAGCGGCCTAGCGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGCTCTAAGTC AGGCACTAGCGCTAGTCTGGCTA	88

		TCACCGGCCTGCAGGCTGAGGAC GAGGCCGACTACTACTGTCAGTC CTGGGACTCTAGTCAGACCCTGG TGGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAG CTGACCGTGCTGGGTCAGCCTAA GGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGT TCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTG CAGGCCAACAAGGCCACCCTGGT GTGCCTGATCAGCGACTTCTACC CAGGCGCCGTGACCGTGGCCTG GAAGGCCGACAGCAGCCCCGTG AAGGCCGGCGTGGAGACCACCA CCCCCAGCAAGCAGAGCAACAAC AAGTACGCCGCCAGCAGCTACCT GAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGA AGAGCCACAGGTCCTACAGCTGC CAGGTGACCCACGAGGGCAGCA CCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCA ACCGAGTGCAGC	
--	--	---	--

[00315] Otros anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención incluyen aquellos en los que los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos se han mutado, sin embargo, tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 1 . En una realización, se incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones variables cuando se compara con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, al tiempo que conserva sustancialmente la misma actividad terapéutica.

[00316] En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de unión al antígeno, que se une a BMP6 humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 9, 10 y 11, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 19, 20 y 21, respectivamente.

[00317] En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de unión al antígeno, que se une a BMP6 humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente.

[00318] En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de unión al antígeno, que se une a BMP6 humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 29, 30 y 31, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 39, 40 y 41, respectivamente.

[00319] En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de unión al antígeno, que se une a BMP6 humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 32, 33 y 34, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente.

[00320] En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a BMP6 humana y comprende a las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 49, 50 y 51, respectivamente, y a las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 59, 60 y 61, respectivamente.

[00321] En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a BMP6 humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 52, 53 y 54, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 62, 63 y 64, respectivamente.

[00322] En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a BMP6 humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 69, 70 y 71, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 79, 80 y 81, respectivamente.

[00323] En otra realización específica, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a BMP6 humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de SEQ ID NOs: 82, 83 y 84, respectivamente.

[00324] Como cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a BMP6, la VH, VL, cadena ligera de longitud completa, y secuencias de cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) puede ser "mezcladas y combinadas" para crear otros anticuerpos de unión a BMP6 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención. Tales anticuerpos De unión a BMP6 "mezclados y combinados" pueden ser probados usando los ensayos de unión conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISA, y otros ensayos descritos en la sección de ejemplos). Cuando estas cadenas están mezcladas y emparejadas, una secuencia de VH de un apareamiento VH/VL particular, debe ser reemplazada con una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un emparejamiento particular de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa debe ser reemplazada con una secuencia estructuralmente similar de cadena pesada de longitud completa. Del mismo modo, una secuencia VL de un apareamiento VH/VL particular, debe ser reemplazada con una secuencia VL estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un emparejamiento particular de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa debe ser reemplazada con una secuencia similar estructuralmente cadena ligera de longitud completa.

[00325] En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos de unión a BMP6 que comprenden la cadena pesada y de cadena ligera de los CDR1s, CDR2s y CDR3 como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de los mismos. Las regiones CDR están delineadas usando el sistema de Kabat (Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación No. 91-3242), o utilizando el sistema de Chothia [Chothia et al. 1987 J. Mol. Biol. 196: 901 hasta 917; y Al-Lazikani et al. 1997 J. Mol. Biol. 273: 927 a 948].

[00326] Teniendo en cuenta que cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a BMP6 y que la especificidad de unión al antígeno se proporciona principalmente por las regiones 2 y 3 de CDR1, las secuencias de VH de CDR1, 2 y 3 y las secuencias VL de CDR1, 2 y 3 se pueden "mezclar y combinar" (es decir, CDRs de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y combinar, aunque cada anticuerpo debe contener una VH de CDR1, 2 y 3 y una VL de CDR1, 2 y 3 para crear otra moléculas de unión que se unan a BMP6 de la invención. Tales anticuerpos unión a BMP6 "mixtos y emparejados" pueden ser probados usando los ensayos de unión conocidos en la técnica y los descritos en los ejemplos (por ejemplo, ELISA). Cuando las secuencias VH CDR están mezcladas y sincronizadas, las secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia particular VH debe ser reemplazada con una(s) secuencia(s) CDR estructuralmente similar (es). Del mismo modo, cuando las secuencias VL CDR están mezcladas y emparejadas, las secuencias de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia VL particular, debe ser reemplazada con una(s) secuencia(s) de CDR estructuralmente similar (es). Será fácilmente evidente para el experto en la materia que nuevas secuencias VH y VL pueden ser creadas a partir de la mutación de uno o más secuencias VH y/o VL CDR de la región con secuencias estructuralmente similares a las secuencias de CDR mostradas en este documento para los anticuerpos monoclonales de la presente invención.

[00327] Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o su región de unión a antígeno que comprende una CDR1 de

la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 29, 49, 69, 12, 32, 52, 72, o 9; una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 10, 30, 50, 70, 13, 33, 53, o 73; una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 11, 31, 51, 71, 14, 34, 54, o 74; una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 19, 39, 59, 79, 22, 42, 62, o 82; una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 20, 40, 60, 80, 23, 43, 63, o 83; y una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, 24, 44, 64, o 84; en la que el anticuerpo se une específicamente a BMP6.

15 [00328] En una realización, un anticuerpo que se une específicamente a BMP6 es un anticuerpo que se describe en la Tabla 1.

[00329] Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas de longitud completa pesadas o ligeras que son "el producto de" o que "derivan de" una

20 secuencia de línea germinal particular, si se obtienen las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo a partir de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humanas. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que llevan genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o el rastreo de una biblioteca de genes de

25 inmunoglobulina humana que se muestra en fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal

30 humana y la selección de la secuencia de la inmunoglobulina de la línea germinal

humana que es más cercana en secuencia (es decir, un mayor % de identidad) con la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana en particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, de mutaciones somáticas de origen natural o a la introducción intencional de mutaciones dirigida al sitio. Sin embargo, en las regiones de marco VH o VL, un anticuerpo humano seleccionado típicamente tiene al menos un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos para una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de inmunoglobulina de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal de murinos). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano recombinante mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en las regiones de marco VH o VL. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 un aminoácido de diferencia de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

25 [00330] MIEMBROS DE LA FAMILIA BMP Y HEPCIDINA

[00331] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que se une específicamente a BMP6 siendo este específicamente un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se describen en la Tabla 1.

[00332] En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión se une específicamente a BMP6 pero no a otras proteínas BMP (tales como BMP2, BMP5 o BMP7).

[00333] BMP6, un factor de crecimiento ligando de la familia BMP secretado, es un homodímero unido por disulfuro de 30 kDa en su forma activa madura. La proteína es un miembro de la superfamilia TGF-beta. Las proteínas morfogenéticas óseas son conocidas por su capacidad para inducir el crecimiento de hueso y cartílago. BMP6 es capaz de inducir todos los marcadores osteogénicos en células madre mesenquimales.

[00334] Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son una familia de moléculas de señalización secretadas que pueden inducir el crecimiento del hueso ectópico. Las BMPs son parte de la superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta (TGF-beta). Los BMPs se identificaron originalmente por su capacidad de desmineralizar extractos de hueso para inducir la osteogénesis endocondral in vivo en un sitio extraesquelético. Basándose en su expresión en la embriogénesis temprana, la BMP codificada por este gen tiene un papel propuesto en el desarrollo temprano. Además, el hecho de que esta BMP este estrechamente relacionada con BMP5 y BMP7 ha llevado a la especulación de la posible actividad inductiva de hueso. Una función adicional de BMP6 ha sido identificada como se describe en Nature Genetics abril; 41 [4]: 386 - 8.

[00335] Los ratones con knock-out de BMP6 son viables y fértiles, y muestran un desarrollo normal del hueso y el del cartílago.

[00336] BMP6 es el regulador clave de la hepcidina, el pequeño péptido secretado por el hígado, que es el principal regulador del metabolismo del hierro en mamíferos. La hepcidina controla tanto la cantidad de hierro de la dieta que se absorbe en el duodeno y el hierro liberado por las células reticuloendoteliales. La hepcidina es sobrerregulada por una variedad de estímulos, incluyendo la inflamación y la sobrecarga de hierro, y es desregulada por la anemia, la hipoxia, y la deficiencia de hierro.

[00337] Sin estar limitada por ninguna teoría particular, esta divulgación sugiere a un anticuerpo antagonista de BMP6 como una terapia de disminución de hepcidina para beneficiar a los pacientes con anemia por deficiencia de hierro mediante la superación de la resistencia a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), lo cual aumenta sustancialmente la morbilidad de una enfermedad subyacente y es a menudo un factor predictivo de resultados adversos. A través de su interacción con los receptores BMPR1 y BMPR2, este induce la dimerización de los receptores y la transcripción de la hepcidina. La BMP6 también se une al co-receptor HJV en las células hepáticas y musculares.

[00338] Por lo tanto, se sabe que BMP6 aumenta la expresión de hepcidina. La hepcidina es conocida por ser una hormona clave implicada en la homeostasis del hierro. Los altos niveles de hepcidina se asocian con la eritropoyesis por deficiencia de hierro de hierro en ACD.

[00339] El documento WO 2010/056981 da a conocer que la administración a ratones de un anticuerpo dirigido a BMP6 disminuyó la hepcidina y aumentó el hierro.

[00340] BMP6 se describe adicionalmente en la técnica, por ejemplo: Hahn et al. 1992 Genomics 14: 759-62; Sauermann et al. 1993 J. Neurosci. Res. 33: 142; Celeste et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9843; Schluesener et al. 1995 Atherosclerosis 113: 153; Gitelman et al. 1994 J. Cell Biol. 126: 1595; Barnes et al. 1997 W. J. Urol. 13: 337; and Hamdy et al. 1997 Cancer Res. 57: 4427.

[00341] BMP2, al igual que otras proteínas morfogenéticas óseas, juega un papel importante en el desarrollo de hueso y cartílago. Está implicado en la vía hedgehog, vía de señalización de TGF-beta, y en la interacción del receptor de citoquina-citoquina. También está implicado en la diferenciación celular cardíaca y en la transición epitelial a mesenquimal. BMP2 tiene muchas funciones esenciales, como señaló Kishimoto et al. 1997 Dev. 124: 4457; Ma et al. 2005 Dev. 132: 5601; Wang et al. Bone 48: 524; and Rosen 2009 Cyt. Growth Fact. Rev. 20: 475. Por tanto, es preferible para un anticuerpo BMP6 no unirse a BMP2.

[00342] BMP2 se describe adicionalmente en, entre otras cosas: Sampath et al. 1990 J. Biol. Chem. 265: 13198; Chen et al. 2004 Growth Factors 22: 233; Marie et al. 2002 Histol. Histopath. 17: 877; Nickel et al. 2001 J. Bone Joint Surg. 83-A Supp. 1: S7-14; Kirsch et al. 2000 FEBS Lett. 468: 215; Kirsch et al. 2000
5 EMBO J. 19: 3314; Gilboa et al. 2000 Mol. Biol. Cell 11: 1023.

[00343] BMP5 es también un miembro de la superfamilia de TGF-Beta. Al igual que otros BMPs, es conocido por su capacidad para inducir el desarrollo de hueso y cartílago. BMP5 se expresa en la malla trabecular y el nervio óptico de la cabeza y puede tener un papel en el desarrollo y la función normal. También se
10 expresa en el pulmón y el hígado.

[00344] Información adicional sobre BMP5 se conoce en la técnica, por ejemplo, Hahn et al. 1992 Genomics 14: 759; Beck et al. 2003 BMC Neurosci. 2: 12; Celeste et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9843; and Sakaue et al. 1996 Biochem. Biophys. Res. Comm. 221: 768.

[00345] BMP7 es también un miembro de la superfamilia de TGF-Beta. Al igual que otros miembros de la familia de proteínas BMP, desempeña un papel clave en la transformación de células mesenquimales en hueso y cartílago. Induce la fosforilación de SMAD1 y SMAD5, que a su vez inducen la transcripción de numerosos genes osteogénicos.

[00346] Como se señaló anteriormente, los ratones con un knock-out de BMP6 son viables y fértiles, y muestran un desarrollo de hueso y cartílago normal. Sin embargo, los ratones knock-out para BMP7 mueren después de nacer con defectos renales, oculares y de los huesos. knock-outs Individuales de uno u
20 otro gen no alteran la cardiogénesis, pero un doble knock-out de BMP6 y BMP7
25 demuestra varios defectos y retrasos en el corazón; muriendo los embriones de insuficiencia cardíaca. BMP7 es importante en la prevención de la progresión de la enfermedad cardíaca crónica asociada con la fibrosis. Por lo tanto, la reactividad cruzada de un anticuerpo anti-BMP6 con BMP7 no es deseable.

[00347] Información adicional relacionada a BMP7 se proporciona en la
30 técnica, por ejemplo, Hahn et al. 1992 Genomics 14: 759; Chen et al. 2004 Growth

Factors 22: 233; Itoh et al. 2001 EMBO J. 20: 4132; Zeisberg et al. 2003 Am. J. Physiol. Renal Physiol. 285: F1060; Kallui et al. 2009 J. Clin. Invest. 119: 1420; and Wang et al. 2001 J. Am. Soc. Neph. 12: 2392.

[00348] La hepcidina es una hormona peptídica también conocida como HAMP (proteína hepcidina antimicrobiana o péptido).

[00349] Un reciente caso de la duplicación de genes en la evolución de ratón ha dado lugar a la presencia de dos genes de hepcidina similares en ratones, Hpcidina1 y Hpcidina2. Ilyin et al. 2003 FEBS Lett. 542: 22-26. El Ratón Hpcidina 2 carece de varios residuos conservados se encuentran en hepcidinas de mamíferos. Lou et al. 2004 Blood 103: 2816-2821.

[00350] El producto del gen hepcidina está involucrado en el mantenimiento de la homeostasis del hierro, y es necesario para la regulación de almacenamiento de hierro en los macrófagos, y para la absorción intestinal de hierro. Estos péptidos presentan actividad antimicrobiana.

[00351] La preproproteína (o preprohormona o preprohepcidina) (84 aa) y la proproteína (o prohormona o prohepcidina) (60 aa) son procesados en péptidos maduros de 20, 22 y 25 aminoácidos. El péptido 25-aa es secretado principalmente por el hígado y es considerado como el “regulador maestro” del metabolismo del hierro. Los metabolitos 20- y 22-aa existen en la orina. La región N-terminal de hepcidina se requiere para la función; delección de los 5 aminoácidos N-terminales que resultan en la pérdida de la función.

[00352] Los péptidos de hepcidina activos son ricos en cisteínas, las cuales forman enlaces intramoleculares que estabilizan sus estructuras laminas beta.

[00353] La hepcidina se sintetiza principalmente en el hígado, siendo encontrado que pequeñas cantidades se sintetizan en otros tejidos. Bekri et al. 2006 Gastroent. 131: 788-96.

[00354] El péptido hepcidina 25-aa es secretado principalmente por el hígado y es considerado como el “regulador maestro” del metabolismo del hierro. La hepcidina inhibe el transporte de hierro mediante la unión al canal de exportación de hierro ferroportina, que se encuentra en la superficie basolateral de los

enterocitos del intestino y la membrana de plasma de las células reticuloendoteliales (macrófagos). Mediante la inhibición de la ferroportina, la hepcidina impide enterocitos de los intestinos secretar hierro en el sistema hepático porta, lo que reduce funcionalmente la absorción de hierro. La liberación de hierro de los macrófagos también se evita mediante la inhibición de ferroportina; Por lo tanto, la hepcidina mantiene la homeostasis del hierro. La actividad de la hepcidina también es parcialmente responsable del secuestro de hierro visto en la anemia inflamatoria crónica como la enfermedad inflamatoria del intestino, insuficiencia cardíaca crónica, carcinomas, la artritis reumatoide y la insuficiencia renal.

[00355] Las mutaciones en el gen de hepcidina causan hemocromatosis tipo 2B, también conocida como hemocromatosis juvenil, una enfermedad causada por severa sobrecarga de hierro que resulta en cardiomiopatía, cirrosis e insuficiencia endocrina. La mayoría de los casos de hemocromatosis juvenil se deben a mutaciones en hemojuvelina, un regulador de la producción de hepcidina.

[00356] Ratones genéticamente modificados por ingeniería genética para sobreexpresar hepcidina mueren poco después del nacimiento con severa deficiencia de hierro, lo que sugiere un papel central y no redundante en la regulación del hierro. La primera evidencia que vinculaba hepcidina a la anemia inflamatoria se produjo cuando los investigadores examinaron los tejidos de dos pacientes con tumores en el hígado con una anemia microcítica severa que no responde a los suplementos de hierro. El tejido tumoral produce en exceso hepcidina, y la eliminación de los tumores quirúrgicamente cura la anemia.

[00357] Hay muchas enfermedades en las que la falta de absorción adecuada del hierro contribuye a la deficiencia de hierro y a la anemia por deficiencia de hierro. El tratamiento dependerá de los niveles de hepcidina, ya que un tratamiento oral probablemente será ineficaz si la hepcidina está bloqueando la absorción enteral.

[00358] En una realización, la administración del anticuerpo o su fragmento de unión a BMP6 reduce la actividad y/o el nivel de hepcidina y es por tanto útil en

un tratamiento para la anemia. En una realización, la invención se refiere a un método para reducir la actividad o nivel de hepcidina en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el método la etapa de administrar al paciente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a BMP6. En una
5 realización, la actividad o nivel de hepcidina se reduce en al menos un 50%.

[00359] Inhibidores a hepcidina, tales como anticuerpos BMP6, se pueden ser utilizados para tratar una enfermedad relacionada con la hepcidina. Esto incluye cualquier enfermedad asociada con la hepcidina y/o una mutación y/o una expresión excesiva de un tipo salvaje y/o mutante de hepcidina, y/o enfermedades
10 en las que progresión de la enfermedad se ve reforzada por o cuyo pronóstico empeoró por la presencia de hepcidina y/o una mutación y/o una sobre expresión de tipo salvaje y/o mutante hepcidina, y/o eliminación renal reducida de hepcidina a través de la orina. Ejemplos de enfermedades relacionadas con la hepcidina no limitativos incluyen: anemia, eritropoyesis deficiente en hierro, hipoferremia,
15 alteración de la absorción de hierro en la dieta, el secuestro de hierro, la anemia inflamatoria(AI), la aterosclerosis, la diabetes y múltiples enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la ataxia de Friedrich, insuficiencia cardíaca, enfermedad renal crónica, síndrome de anemia-cardiorrenal, infección, pérdida de sangre, hemólisis, deficiencia de vitamina B12 o
20 de folato, hiperparatiroidismo, hemoglobinopatías y tumores malignos, el cáncer, el SIDA , cirugía, retraso en el crecimiento, y/o pérdida del cabello. En una realización, el sujeto es un paciente de diálisis. En una realización, la enfermedad relacionada con la hepcidina es la anemia y el sujeto es un paciente de diálisis. La prevalencia de hierro y anemia refractaria ESA es alta en la población de
25 hemodiálisis crónica.

[00360] Anemia incluye, entre otras cosas, la anemia de la enfermedad crónica (ACD), la anemia de la enfermedad renal crónica (ERC), la anemia de cáncer, la anemia resistente a agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), y/o anemia de restricción de hierro.

[00361] La anemia de la ERC es una complicación frecuente y precoz de la enfermedad renal crónica. La anemia de cáncer es causada por neoplasias hematológicas y algunos tumores sólidos. Tal como se define en el presente documento, este término también incluye la anemia inducida por la quimioterapia, que es la anemia causada por agentes quimioterapéuticos. La anemia en las enfermedades crónicas del riñón puede empeorar la neuropatía diabética, enfermedad cardiovascular, retinopatía y otros problemas. La anemia relacionada con el cáncer se asocia con mayor riesgo de muerte.

[00362] Algunas enfermedades crónicas tales como el cáncer, la enfermedad renal y trastornos autoinmunes pueden conducir a anemia. Citoquinas inflamatorias hiperactivas pueden causar la desregulación de la homeostasis del hierro, la reducción de la eritropoyesis, y una disminución en el tiempo de vida de las células rojas de la sangre. Algunos tratamientos para la anemia incluyen la administración de un ESA, eritropoyetina, hierro (como un suplemento dietético) o una transfusión de sangre.

[00363] La hepcidina es una hormona clave implicada en la homeostasis del hierro. Los altos niveles de hepcidina se han asociado con eritropoyesis hierro por deficiencia de hierro in ACD. se sabe que BMP6 aumenta la expresión de hepcidina.

[00364] A continuación se describen varios tipos de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos a BMP6.

[00365] ANTICUERPOS HOMÓLOGOS

[00366] En aún otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias descritas en la Tabla 1, y dicho anticuerpo se une a BMP6, y conserva las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

[00367] Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado (o un fragmento de unión a antígeno funcional del mismo) que comprende

una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% , al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID
5 NOs: 16; 36; 56; o 76; la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 26;46; 66; o 86; el anticuerpo se une específicamente a la proteína BMP6 , y el anticuerpo puede inhibir la lisis de glóbulos rojos en un ensayo
10 hemolítico, en el que un ensayo hemolítico se conoce en la técnica. En un ejemplo específico, tales anticuerpos tienen un valor IC₅₀ en un ensayo hemolítico de 20-200 pM de cuando se utiliza suero humano sin BMP6 que se reconstituye con 100 pM BMP6 humana.

[00368] En una realización, la VH y/o secuencias de aminoácidos de VL
15 puede ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a las secuencias expuestas en la Tabla 1. En una realización, las secuencias de aminoácidos VH y/o VL pueden ser idénticas excepto por una sustitución de aminoácido en no más de más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tienen alta (es decir, 80% o más)
20 identidad con las regiones VH y VL de aquellas descritas en la Tabla 1 se puede obtener por mutagénesis (por ejemplo, dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican las SEQ ID NO: 16; 36; 56; o 76; y 26; 46; 66; o 86 respectivamente, seguidas por la prueba del anticuerpo alterado codificado para retener la función usando los ensayos funcionales
25 descritos en este documento.

[00369] En una realización, las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa y/o cadena ligera de longitud completa pueden ser 50% 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada
30 de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa que tiene una alta

identidad (es decir, 80% o más) a la longitud completa de las cadenas pesadas de cualquiera de las SEQ ID NOs: 18; 38; 58; o 78 y una cadena ligera de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID NOs: 28; 48; 68 o 88, respectivamente, se puede obtener por mutagénesis (por ejemplo, dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, respectivamente, seguidos por la prueba del anticuerpo codificado alterado para la retener la función usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

[00370] En una realización, las secuencias de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa y/o cadena ligera de longitud completa pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1.

[00371] En una realización, las regiones variables de cadena pesada y/o secuencias de nucleótidos de cadena ligera pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias establecidas expuestas en la Tabla 1.

[00372] Como se usa en este documento, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir el % 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 necesitan introducirse para un alineamiento óptimo 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 siguientes.

[00373] Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención además pueden ser utilizadas como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se

pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2.0) de Altschul, et al., 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-10.

[00374] Anticuerpos con modificaciones conservadoras

[00375] En una realización, un anticuerpo de la invención tiene una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en la que una o más de estas secuencias de CDR han especificado secuencias de aminoácidos basadas en los anticuerpos descritos en este documento o sus modificaciones conservadoras, y en las que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de un anticuerpo de unión a BMP6 y de sus fragmentos de unión a antígeno de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión antígeno funcional del mismo, que consiste en una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en las que: una región de cadena pesada variable CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 29, 49, 69, 12, 32, 52, 72, o 9 o variantes conservativas de la misma; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 10, 30, 50, 70, 13, 33, 53, o 73 o variantes conservativas de la misma; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 11, 31, 51, 71, 14, 34, 54, o 74 o variantes conservativas de la misma; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 19, 39, 59, 79, 22, 42, 62, o 82 o variantes conservativas de la misma; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NOs: 20, 40, 60, 80, 23, 43, 63, o 83 o variantes conservativas de la misma; y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada

de cualquiera de SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, 24, 44, 64, o 84 o variantes conservativas de la misma; el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a BMP6, e inhibe la lisis de glóbulos rojos en un ensayo hemolítico.

5 [00376] En una realización, un anticuerpo de la invención optimizado para la expresión en una célula de mamífero tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa y una secuencia de cadena ligera de longitud completa, en las que una o más de estas secuencias tienen secuencias específicas de aminoácidos basadas en los anticuerpos descritos en este documento o modificaciones
10 conservadoras de los mismos, y en el que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de anticuerpos de unión a BMP6 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado optimizado para la expresión en una célula de mamífero que consta de una cadena pesada de longitud completa y
15 una cadena ligera de longitud completa en la que: la cadena pesada de la longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo de la SEQ ID NOs: 18; 38; 58; o 78, y las modificaciones conservativas de la misma; y la cadena ligera de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionados entre el grupo de la SEQ ID NO: 28; 48; 68 o 88, y modificaciones
20 conservadas de los mismos; el anticuerpo se une específicamente a BMP6; y el anticuerpo inhibe la lisis de las células rojas de la sangre en un ensayo hemolítico como se describe en el presente documento. En una realización específica, dichos anticuerpos tienen un valor IC₅₀ en un ensayo hemolítico de 20-200 pM cuando se utiliza suero humano sin BMP6 que se reconstituye con 100 pM BMP6 humana.

25 [00377] ANTICUERPOS QUE SE UNEN AL MISMO EPÍTOPO

[00378] La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo, como lo hacen los anticuerpos de unión a BMP6 listados en la Tabla 1. El epítipo unido por el anticuerpo 7 se muestra en la Fig. 5. Por lo tanto, los anticuerpos adicionales pueden ser identificados en base a su capacidad para
30 competir cruzadamente (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión, de

una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención en ensayos de unión a BMP6. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención a la proteína BMP6 demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo para la unión a BMP6; un anticuerpo de este tipo puede, según la teoría no limitante, unirse al mismo epítipo en BMP6 o uno relacionado (por ejemplo, una estructura similar o espacialmente proximal) así como el anticuerpo con los que compete. En una cierta realización, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en BMP6 como los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en el presente documento.

[00379] Una vez que se determina un epítipo en un antígeno deseado, es posible generar anticuerpos para ese epítipo, por ejemplo, usando las técnicas descritas en la presente invención. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos pueden elucidar información acerca de epítopos deseables. A partir de esta información, es posible entonces detectar competitivamente anticuerpos para la unión al mismo epítipo. Un enfoque para lograr esto es para llevar a cabo estudios de competencia cruzada para encontrar anticuerpos que se unen competitivamente uno con el otro, por ejemplo, los anticuerpos que compiten por la unión al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para “el agrupamiento” de anticuerpos en base a su competencia cruzada se describe en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 2003/48731. Como se apreciará por un experto en la técnica, prácticamente cualquier cosa a la que un anticuerpo puede unirse específicamente podría ser un epítipo. Un epítipo puede comprender aquellos residuos a los que el anticuerpo se une.

[00380] En general, los anticuerpos específicos para un antígeno objetivo particular reconocerán preferentemente un epítopo en el antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

[00381] Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítopo se
5 pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítomos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítomos lineales se pueden determinar mediante, por ejemplo, la síntesis simultánea de grandes números de péptidos
10 sobre soportes sólidos, siendo los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos todavía están unidos a los soportes. Tales metodologías se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.708.871; Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 8: 3.998
15 a 4.002; Geysen et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82: 78 a 182; Geysen et al., (1986) Mol. Immunol. 23: 709-715. De manera similar, los epítomos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de los aminoácidos de BMP6 tales como por, por ejemplo, el intercambio hidrógeno/deuterio, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear
20 bidimensional. Véase, por ejemplo, Protocolos de mapeo de epítomos, supra. Las regiones antigénicas de las proteínas también se pueden identificar usando diagramas de antigenicidad e hidropatía estándar, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omiga versión 1.0 disponible del grupo molecular Oxford. Este programa informático emplea el método de
25 Hopp/Woods, Hopp et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78: 3.824-3.828; para determinar los perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte et al., (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132; para los diagramas de hidropatía.

[00382] Los anticuerpos manipulados y modificados

[00383] Un anticuerpo de la invención además se puede preparar usando un
30 anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL mostradas en el

presente documento como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, aquel anticuerpo modificado podría tener propiedades alteradas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética mediante la modificación de uno o más residuos 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. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de residuos dentro de la(s) región(es) constante (s), por ejemplo para alterar la(s) función(es) efectora (s) del anticuerpo.

[00384] Un tipo de modificación de la región variable que se puede realizar es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que en las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo de origen natural específico injertado en secuencias de entramado a partir de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (ver, por ejemplo, Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; U.S. Pat. No. 5,225,539 to Winter, y U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 a Queen et al.).

[00385] Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen germinales secuencias de genes de anticuerpos. Por ejemplo, las secuencias de ADN de Germine de genes de la región variable de cadena pesada y ligera humanos se pueden encontrar en el "VBase" base de datos de secuencia de la línea germinal humana

(disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, EA, et al, 1991 Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos, NIH Publication No. 91 a 3242 de Estados Unidos.; Tomlinson, IM, et al., 1992 J. fol. Biol. 227: 776-798; y Cox, JPL et al., 1994 Eur. J Immunol. 24: 827 a 836; los contenidos de cada una de las

5 [00386] Un ejemplo de secuencias de marco para su uso en los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias de marco utilizadas por los anticuerpos seleccionados y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención, 10 por ejemplo, secuencias de consenso y/o secuencias estructurales utilizadas por los anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias VH CDR1, 2 y 3 y las secuencias VL CDR1, 2 y 3, pueden ser injertadas en regiones marco que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de la inmunoglobulina de la 15 línea germinal de la cual la secuencia marco deriva, o las secuencias de CDR pueden ser injertadas en regiones estructurales que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar los residuos dentro de las regiones de marco para mantener o mejorar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, las patentes U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 20 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen et al).

[00387] Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los residuos de aminoácidos dentro de las regiones VH y/o VL CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar de ese modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del 25 anticuerpo de interés, conocido como "afinidad maduración." Una mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR se puede realizar para introducir la(s) mutación (es) y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar in vitro o ensayos in vivo como se describe en este documento y se proporciona en los Ejemplos. Modificaciones conservativas (como 30 se discutió anteriormente) se pueden introducir. Las mutaciones pueden ser de

sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. Además, por lo general no más de una, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR se alteran.

5 [00388] INJERTO DE DOMINIOS DE UNIÓN AL ANTÍGENO EN MARCOS O ANDAMIOS ALTERNATIVOS

[00389] Una amplia variedad de marcos o andamios de anticuerpos/inmunoglobulinas pueden ser empleados siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente a
10 BMP6. Tales marcos o andamios incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, sus fragmento de unión a antígeno, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, que tiene preferiblemente aspectos humanizados. Anticuerpos de cadena pesada simple, tales como los identificados en los camélidos son de particular interés en este sentido. Novedosos marcos,
15 andamios y fragmentos continúan siendo descubiertos y desarrollados por los expertos en la técnica.

[00390] En un aspecto, la invención se refiere a un método para generar anticuerpos no basados en inmunoglobulina utilizando andamios que no son de inmunoglobulina en la que las CDR de la invención pueden ser injertadas. Marcos
20 conocidos o futuros marcos que no son de inmunoglobulina y andamios se pueden emplear, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína BMP6 objetivo. Marcos o andamios conocidos que no son de inmunoglobulina incluyen, pero no se limitan a, fibronectina (Terapéutica compuestas, Inc., Waltham, Mass.), Ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de
25 dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, Mass., y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), pequeñas inmuno-farmacéuticos modulares (Trubion Pharmaceuticals Inc., de Seattle, Wash.), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, Calif.), proteína A (Affibody AG, Suecia), y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (SCII Proteínas GmbH, Halle, Alemania).

[00391] Los andamios de fibronectina se basan en dominios de fibronectina de tipo III (por ejemplo, el décimo módulo de tipo III de fibronectina (dominio 10 Fn3)). El dominio de fibronectina de tipo III tiene 7 u 8 hebras beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que a su vez se envuelven una contra la otra para formar el núcleo de la proteína, y bucles contenedores adicionales (análogos a CDRs) que conectan las hebras beta entre sí y están expuestos al disolvente. Hay por lo menos tres de tales bucles en cada borde del sándwich de lámina beta, donde el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta (véase el documento US Pat. No. 6,818,418). Estos andamios a base de fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue global este estrechamente relacionado con la del fragmento más pequeño funcional de anticuerpo, la región variable de la cadena pesada, que comprende toda la unidad de reconocimiento de antígeno en IgG de camello y de llama. Debido a esta estructura, los anticuerpos que no son inmunoglobulinas imitan las propiedades de unión de los antígenos que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos andamios se pueden utilizar en aleatorización de bucle y estrategia de barajado in vitro que es similar al proceso de maduración de la afinidad de anticuerpos in vivo. Estas moléculas a base de fibronectina se pueden utilizar como andamios, donde las regiones de bucle de la molécula se pueden reemplazar con CDR de la invención usando técnicas de clonación estándar.

[00392] La tecnología de anquirina se basa en el uso de proteínas con módulos repetidos derivados de anquirina como andamios para acoger regiones variables que pueden ser utilizadas para la unión a diferentes objetivos. El módulo de repetición anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste en de dos hélices alfa antiparalelas y un -Giro beta. La unión de las regiones variables está optimizada principalmente por el uso de la tecnología de exhibición ribosomal.

[00393] Los avimeros se derivan de una proteína que contiene un dominio A natural como LRP-1. Estos dominios son utilizados naturalmente para interacciones proteína-proteína y en el ser humano más de 250 proteínas se basan estructuralmente de dominios A. Los avimeros consisten en un número de

diferentes monómeros "dominios-A" (2-10) unidos a través de enlazadores de aminoácidos. Los avimeros pueden ser creados de modo que puedan unirse al antígeno diana utilizando la metodología descrita en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040175756.; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

[00394] Los ligandos de afinidad a anticuerpos son proteínas pequeñas y sencillas que se componen de un paquete de tres hélices basado en el andamio 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 del andamio consta de 58 aminoácidos, 13 de los cuales se asignaron al azar para generar bibliotecas de anticuerpos con un gran número de variantes de ligando (Véase, por ejemplo, US Pat. No. 5,831,012). Las moléculas Affibody imitan los anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas de anticuerpo es similar al de un anticuerpo.

[00395] Las Anticalinas son productos desarrollados por la empresa Pieris Proteolab AG. Se derivan de lipocalinas, un grupo generalizado de proteínas pequeñas y robustas que por lo general están involucrados en el transporte fisiológico o almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales se producen en los tejidos humanos o líquidos corporales. La arquitectura de la proteína es una reminiscencia de inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de un marco rígido. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas se componen de una única cadena de polipéptido con de 160 a 180 residuos de aminoácidos, siendo sólo marginalmente más grande que un solo dominio de inmunoglobulina. El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra una pronunciada plasticidad estructural y tolera una variedad de cadenas laterales. El sitio de unión de este modo puede ser reformado en un proceso patentado con el fin de reconocer moléculas diana prescritas de forma diferente con gran afinidad y especificidad. Una proteína de la

familia lipocalina, la proteína de unión a bilina (BBP) de *Pieris brassicae* ha sido utilizada para desarrollar anticalinas mediante la mutación el conjunto de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe anticalinas es en la Publicación PCT No. WO 199916873.

5 [00396] Las moléculas de afilina son pequeñas proteínas no inmunoglobulinas que están diseñadas para afinidades específicas hacia proteínas y moléculas pequeñas. Nuevas moléculas de afilina se pueden seleccionar muy rápidamente a partir de dos bibliotecas, cada una de las cuales está basada en una proteína humana derivada de un andamio diferente. Las moléculas de afilina
10 no muestran ninguna homología estructural con proteínas de inmunoglobulina. Actualmente, se emplean dos andamios de afilina, uno de los cuales es gamma-cristalina, una proteína estructural del lente del ojo humano y el otro es una proteína de la superfamilia de la "ubiquitina". Ambos andamios humanos son muy pequeños, muestran una alta estabilidad a la temperatura y son
15 casi resistentes a los cambios de pH y de agentes desnaturalizantes. Esta alta estabilidad es debida principalmente a la estructura de lámina beta expandida de las proteínas. Ejemplos de proteínas derivadas de gamma cristalina se describen en WO200104144 y los ejemplos de proteínas "tipo ubiquitina" están descritos en WO2004106368.

20 [00397] Los miméticos de epítomos de proteínas (PEM) son moléculas de tamaño medio, similares a péptidos cíclicos (MW 1-2 kDa) que imitan las estructuras secundarias beta-horquilla de proteínas, la principal estructura secundaria implicada en las interacciones proteína-proteína.

[00398] Los anticuerpos de unión a BMP6 humano pueden generarse usando
25 métodos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la tecnología de humanización utilizada para la conversión de anticuerpos no humanos en anticuerpos humanos diseñados. La Publicación de patente US No. 20050008625 describe un método in vivo para la sustitución de una región variable de anticuerpo no humano con una región variable de un anticuerpo humano manteniendo las
30 mismas o proporcionando mejores características de unión con respecto a las del

anticuerpo no humano. El método se basa en la sustitución guiada por epítopo de las regiones variables de un anticuerpo de referencia no humano con un anticuerpo completamente humano. El anticuerpo humano resultante no está generalmente relacionado estructuralmente con el anticuerpo no humano de referencia, pero se une al mismo epítopo en el mismo antígeno como el anticuerpo de referencia. En pocas palabras, el método serial de sustitución de complementariedad guiada por epítopo se activa 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") para la unión a cantidades de antígeno limitadas en presencia de un sistema reportero que responde a la unión del anticuerpo de prueba al antígeno. El competidor puede ser el anticuerpo de referencia o un derivado del mismo tal como un fragmento Fv de una sola cadena. 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 requerimientos del competidor son que se una al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia, y que compita con el anticuerpo de referencia para la unión al antígeno. Los anticuerpos de prueba tienen una región V de unión al antígeno en común con respecto al anticuerpo no humano de referencia, y la otra región V seleccionada al azar de una fuente diversa tal como un repertorio de biblioteca de anticuerpos humanos. La región V común del anticuerpo de referencia sirve como una guía, posicionando los anticuerpos de prueba en el mismo epítopo en el antígeno, y en la misma orientación, de modo que la selección realiza un sesgo con respecto a la fidelidad más alta de unión al antígeno del anticuerpo de referencia.

[00399] Muchos tipos de sistema indicador se pueden utilizar para detectar las interacciones deseadas entre el anticuerpo de prueba y el antígeno. Por ejemplo, los fragmentos complementarios indicadores pueden estar vinculados al antígeno y al anticuerpo de prueba, respectivamente, de modo que la activación del indicador por la complementación del fragmento sólo se produce cuando el anticuerpo de prueba se une al antígeno. Cuando las fusiones de fragmentos

indicadores de anticuerpo de prueba y antígeno son co-expresadas con un competidor, la activación del indicador se vuelve dependiente de la capacidad del anticuerpo de prueba para competir con el competidor, lo cual es proporcional a la afinidad del anticuerpo de prueba por el antígeno. Otros sistemas indicadores que
5 pueden ser utilizados incluyen el reactivador de un sistema de reactivación reportero auto-inhibido (RAIR) como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. Ser. N° 10/208.730 (publicación número 20030198971), o el sistema de activación competitiva descrito en la solicitud de patente de EE.UU. No. 10/076.845 (Publicación No. 20030157579).

10 [00400] Con el sistema de reemplazo de la complementariedad guiado por epítipo en serie, se realiza una selección para identificar las células que expresan un único anticuerpo de prueba junto con el competidor, el antígeno y los componentes del indicador. En estas células, cada anticuerpo prueba compite uno-a-uno con el competidor para la unión a una cantidad limitada de antígeno. La
15 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 para el antígeno y la estabilidad del anticuerpo de prueba. Los anticuerpos de prueba se seleccionan inicialmente en base a su actividad relativa frente a la del anticuerpo de referencia cuando se expresa como el anticuerpo de prueba. El
20 resultado de la primera ronda de selección es un conjunto de anticuerpos "híbridos", cada uno de los cuales está compuesto de 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 epítipo en el antígeno como el anticuerpo de referencia. Uno o más de los anticuerpos híbridos seleccionados en la primera
25 ronda tendrán una afinidad por el antígeno comparable o superior a la del anticuerpo de referencia.

[00401] En el segundo paso de reemplazo de la región V, las regiones V humanas seleccionadas en la primera etapa se utilizan como guía para la selección de sustituciones humanas para las regiones V restantes no humanas del
30 anticuerpo de referencia con una biblioteca diversa de regiones V humanas

cognadas . 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 completamente humanos que difieren estructuralmente de los anticuerpos de referencia, pero que compiten con el anticuerpo de referencia para la unión a antígeno de los mismos. Algunos de los anticuerpos humanos seleccionados se unen al mismo epítipo en el mismo antígeno como el anticuerpo de referencia. Entre estos anticuerpos humanos seleccionados, uno o más se une al mismo epítipo con una afinidad que es comparable o superior a la del anticuerpo de referencia.

5 [00402] Utilizando uno de los anticuerpos de ratón o de los anticuerpos quimérico de unión a BMP6 descritos anteriormente como el anticuerpo de referencia, este método se puede emplear fácilmente para generar anticuerpos humanos que se unan a BMP6 humana con la misma especificidad de unión y la misma o mejor afinidad de unión. Además, dichos anticuerpos de unión a BMP6
15 humanos también se pueden obtener comercialmente de compañías que producen habitualmente anticuerpos humanos, por ejemplo, KaloBios, Inc. (Mountain View, California.).

[00403] ANTICUERPOS DE CAMÉLIDOS

20 [00404] Proteínas de anticuerpos obtenidas de los miembros de la familia del camello y dromedarios (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*) incluyendo nuevos miembros mundiales tales como las especies de llamas (*Paccos Lama*, *glama Lama* y *Lama vicugna*) se han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad para estudios en humanos. Ciertos
25 anticuerpos IgG a partir de esta familia de mamíferos como los encontrados en la naturaleza carecen de cadenas ligeras, y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria típico de cuatro cadenas que tiene dos pesadas y dos cadenas ligeras, como los anticuerpos a partir de otros animales. Ver PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 publicada el 3 de 3 1994).

[00405] Una región del anticuerpo de camélido la cual es el pequeño dominio variable sencillo identificado como VHH se puede obtener por ingeniería genética para producir una pequeña proteína que tiene una alta afinidad por una diana, lo que resulta en una proteína de bajo peso molecular derivada de anticuerpo conocida como un "nanocuerpo de camélido". Véase el documento US Pat. N° 5.759.808 emitido el 02 de junio de 1998.; véase también Stijlemans, B. et al., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. et al. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 Int J Cancer 89: 456-62; and Lauwereys, M. et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Bibliotecas diseñadas de anticuerpos de camélidos y fragmentos de anticuerpos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Ablynx, Ghent, Bélgica. Al igual que con otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede ser alterada de forma recombinante para obtener una secuencia que se asemeje más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede ser "humanizado". Así, la naturalmente baja antigenicidad de los anticuerpos de camélidos en los seres humanos puede reducirse aún más.

[00406] El nanocuerpo de camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de sólo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del tamaño pequeño es la capacidad de los nanocuerpos de camélidos de unirse a sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles para las proteínas de anticuerpo más grandes, es decir, los nanocuerpos de camélidos son útiles como reactivos detectando antígenos que son de otra manera crípticos utilizando técnicas inmunológicas clásicas, y posibles agentes terapéuticos . Todavía otra consecuencia de su tamaño reducido es que un nanocuerpo de camélido puede inhibir como resultado de la unión a un sitio específico en una ranura 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 de bajo peso molecular clásico que a la de un anticuerpo clásico.

[00407] Un bajo peso molecular y un tamaño compacto resultan en nanocuerpos de camélidos extremadamente termoestables, estables a pH extremos y a la digestión proteolítica, y pobremente antigénicos. Otra consecuencia es que los nanocuerpos de camélidos se mueven fácilmente del sistema circulatorio hacia los tejidos, e incluso cruzan la barrera sangre-cerebro y pueden tratar los trastornos que afectan el tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar aún más el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Véase la solicitud de patente 20040161738 publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad a los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas pueden expresarse plenamente en células procariotas tales como E. coli y se expresan como proteínas de fusión con bacteriófagos siendo funcionales.

[00408] En consecuencia, una característica de la presente invención es un anticuerpo camélido o nanocuerpo que tiene una alta afinidad por BMP6. En una forma de realización en el presente documento, el anticuerpo de camélido o nanocuerpo se produce naturalmente en el animal camélido, es decir, se produce por el camélido tras la inmunización con BMP6 o un fragmento peptídico de la misma, utilizando las técnicas descritas en este documento para otros anticuerpos. Alternativamente, el nanocuerpo camélido de unión a BMP6 está diseñado, es decir, producido por selección por ejemplo de una biblioteca de fagos que presenta proteínas nanocuerpo de camélido apropiadamente mutagenizadas utilizando procedimientos de selección por afinidad con BMP6 como un objetivo tal como se describe en los ejemplos en el presente documento. Los nanocuerpos diseñados se pueden personalizar mediante la ingeniería genética para tener una vida media en un sujeto receptor de entre 45 minutos y dos semanas. En una realización específica, el anticuerpo camélido o nanocuerpo se obtiene mediante el injerto de secuencias CDR de lacadena pesada o ligera de anticuerpos humanos de la invención en nanocuerpos o secuencias marco de dominio único de anticuerpo, como se describe por ejemplo en el documento PCT/EP93/02214.

[00409] MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS Y ANTICUERPOS
MULTIVALENTES

[00410] En otro aspecto, la presente invención se caracteriza por moléculas
5 biespecíficas o multiespecíficas que comprenden un anticuerpo de unión a BMP6,
o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o
regiones de unión a antígeno del mismo, se puede derivatizar o ligar a otra
molécula funcional, por ejemplo, a otro péptido o proteína (por ejemplo, otro
anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que
10 se une a más de dos diferentes sitios de unión y/o moléculas diana. El anticuerpo
de la invención puede de hecho ser derivatizado o ligado a más de una otra
molécula funcional para generar moléculas multi-específicas que se unen a más
de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; tales moléculas multi-
específicas también están destinadas a ser abarcadas por el término "molécula
15 biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula
biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ser unido
funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética,
asociación no covalente o de otra manera) a una o más moléculas de unión
diferentes, tales como otro anticuerpos, fragmento de anticuerpos, péptidos o
20 mimético de unión, de manera que resulte una molécula biespecífica.

[00411] Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas
biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para
BMP6 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. Por
ejemplo, el segundo epítipo diana es otro epítipo de BMP6 diferente del primer
25 epítipo diana.

[00412] Además, para la invención en la que la molécula biespecífica es
multi-específica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de
unión, además del primer y segundo epítipo diana.

[00413] En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de
5 cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una constructo de cadena simple como se describe en Ladner et al. Patente de Estados Unidos. No. 4.946.778.

[00414] Los diacuerpos son moléculas bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena simple polipeptídica,
10 conectados por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios VH y VL se aparean con los dominios complementarios de otra cadena, creando así dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poijak et al., 1994 Structure 2:1121-1123). Los
15 diacuerpos se pueden producir mediante la expresión de dos cadenas de polipéptidos, ya sea con la estructura VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VHA-VLB (configuración VL-VH) dentro de la misma célula. La mayoría de ellos se puede expresar de forma soluble en bacterias. Los diacuerpos de cadena sencilla (SCDB) se producen mediante la conexión de dos cadenas de
20 formación de polipeptido formadoras de diacuerpo con un enlazador de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos (véase Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (3-4):128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2 (1):21-36). SCDB puede expresarse en bacterias en forma monomérica soluble, activa (véase Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol.
25 Immunother., 45 (34): 128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2 (1):21-36; Pluckthun and Pack, 1997 Immunotechnology, 3 (2): 83-105; Ridgway et al., 1996 Protein Eng., 9 (7):617-21). Un diacuerpo puede fusionarse a Fc para generar un "di-diacuerpo" (véase Lu et al., 2004 J. Biol. Chem., 279 (4):2856-65).

[00415] Otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

[00416] Las moléculas biespecíficas de la presente invención se pueden preparar mediante la conjugación de las especificidades de unión constituyentes, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación pueden ser utilizados para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-5-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3- (2-piridilditio) propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4- (N-maleimidometil) ciclohaxano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M A et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en 1985 Behring Ins. Mitt. No. 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, Ill.).

[00417] Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden ser conjugados por unión sulfhidrilo de las regiones de la bisagra C-terminal de las dos cadenas pesadas. En un modo de realización particular, la región bisagra se modifica para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, por ejemplo uno, antes de la conjugación.

[00418] Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es un mAb X mAb, mAb X Fab, Fab XF (ab ') ² o proteína de fusión ligando X Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena simple que comprende uno anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de

unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la patente US. N° 5.260.203; Patente de Estados Unidos. N° 5.455.030; Patente de Estados Unidos. N° 4.881.175; Patente de Estados Unidos. N° 5.132.405; Patente de Estados Unidos. N° 5.091.513; Patente de Estados Unidos. N° 5.476.786; Patente de Estados Unidos. N° 5.013.653; Patente de Estados Unidos. N° 5.258.498; y US Pat. N° 5.482.858.

[00419] La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos se puede confirmar mediante, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), el análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

[00420] En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos multivalentes que comprenden al menos dos porciones de unión a antígeno idénticas o diferentes de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de unión a BMP6 invención. Las porciones de unión al antígeno pueden ser unidos entre sí a través de la fusión de proteínas o enlace covalente o no covalente. Alternativamente, métodos de ligamiento han sido descritos para las moléculas biespecíficas. Compuestos tetravalentes se pueden obtener por ejemplo por anticuerpos de reticulación y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a las regiones constantes de los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención, por ejemplo la Fc o una región bisagra.

[00421] El dominio de trimerización se describen por ejemplo en la patente Boreana EP 1 012 280B1. Módulos de pentamerización se describen por ejemplo en el documento PCT/EP97/05897.

[00422] ANTICUERPOS CON VIDA MEDIA PROLONGADA

[00423] La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a BMP6 que tienen una vida media prolongada in vivo.

[00424] Muchos factores pueden afectar la vida media de una proteína in vivo. Por ejemplo, la filtración del riñón, el metabolismo en el hígado, la degradación por enzimas proteolíticas (proteasas), y las respuestas inmunogénicas (por ejemplo, neutralización proteica por anticuerpos y captación por macrófagos y células dendríticas). Una variedad de estrategias puede ser utilizadas para extender la vida media de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Por ejemplo, por unión química a polietilenglicol (PEG), reCODE PEG, andamio de anticuerpo, ácido polisiálico (PSA), almidón hidroxietil (HES), ligandos de unión a albúmina, y escudos de hidratos de carbono; por fusión genética a proteínas que se unen a las proteínas séricas, tales como albúmina, IgG, FcRn, y transferencia; por acoplamiento (genéticamente o químicamente) a otras fracciones de unión que se unen a las proteínas séricas, tales como nanocuerpos, Fabs, DARPs, avimers, aficuerpos, y anticalins; por fusión genética a rPEG, albúmina, el dominio de la albúmina, proteínas de unión a la albúmina, y Fc; o por incorporación en nanotransportadores, formulaciones de liberación lenta, o dispositivos médicos.

[00425] Para prolongar la circulación en suero de anticuerpos in vivo, moléculas de polímeros inertes, tales como PEG de alto peso molecular se pueden unir a los anticuerpos o a un fragmento del mismo con o sin un enlazador multifuncional sea a través de la conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C -terminal de los anticuerpos o por medio de grupos épsilon amino presentes en los residuos de lisina. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un aldehído derivado de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se adhieren al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación puede llevarse a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un

polímero reactivo soluble en agua análogo). Tal como se utiliza aquí, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que han sido utilizadas para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi o ariloxi polietilenglicol o – polietilenglicol maleimida. En una realización, el anticuerpo pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Se utilizará una derivatización de polímero lineal o ramificado que tiene como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se puede controlar de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de moléculas de PEG a los anticuerpos. PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG por exclusión por tamaño o por cromatografía de intercambio iónico. Anticuerpos derivados de PEG pueden ser probados para la actividad de unión, así como para la eficacia in vivo utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por los inmunoensayos descritos en este documento. Métodos para la pegilación de proteínas se conocen en la técnica y pueden ser aplicados a los anticuerpos y a sus fragmentos de unión a antígeno de la invención. Véase, por ejemplo, EP 0 154 316 por Nishimura et al. y EP 0 401 384 por Ishikawa et al.

[00426] Otras tecnologías de pegilación modificadas incluyen la tecnología de diseño ortogonal dirigida reconstructiva químicamente (ReCODE® PEG), que incorpora cadenas laterales químicamente definidas en proteínas biosintéticas a través de un sistema reconstituido que incluye tRNA sintetasa y ARNt. Esta tecnología permite la incorporación de más de 30 nuevos aminoácidos dentro de proteínas biosintéticas en E. coli, levadura y células de mamífero. El tRNA incorpora un aminoácido normativo en cualquier lugar que un codón ámbar está posicionado, lo que convierte el ámbar de un codón de parada a uno que indica la incorporación del aminoácido químicamente definido.

[00427] La tecnología de la pegilación recombinante (RPEG) también se puede utilizar para la extensión de vida media en suero. Esta tecnología consiste en 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 tal proteína no estructurada es de aproximadamente 15 veces más grande que su peso molecular real, la vida media en suero de la proteína se incrementa en gran medida. En contraste con la PEGilación tradicional, que requiere la conjugación química y repurificación, el proceso de fabricación es en gran medida simplificado y el producto es homogéneo.

[00428] La Polisialición es otra tecnología, que utiliza el polímero natural ácido polisiálico (PSA) para prolongar la vida activa y mejorar la estabilidad de los péptidos y proteínas terapéuticos. El PSA es un polímero de ácido siálico (un azúcar). Cuando se utiliza para la entrega de fármacos de péptido terapéuticos y proteínas, el ácido polisiálico proporciona un microambiente protector sobre la conjugación. Esto aumenta la vida activa de la proteína terapéutica en la circulación y evita que sea reconocida por el sistema inmune. El polímero de PSA se encuentra naturalmente en el cuerpo humano. Fue adoptado por ciertas bacterias que evolucionaron durante millones de años para cubrir sus paredes con él. Estas bacterias polisialiladas naturalmente fueron capaces, en virtud de mimetismo molecular, de frustrar el sistema de defensa del cuerpo. El PSA, la última tecnología de sigilo de la naturaleza, se puede producir fácilmente de estas bacterias en grandes cantidades y con características físicas predeterminadas. El PSA bacteriano es completamente no inmunogénico, incluso cuando se acopla a las proteínas, ya que es químicamente idéntico al PSA en el cuerpo humano.

[00429] Otra tecnología incluye el uso de derivados del hidroxietil almidón ("HES") vinculados a anticuerpos. El HES es un polímero natural modificado derivado de almidón de maíz ceroso y que puede ser metabolizado por las enzimas del cuerpo. Soluciones de HES se administran generalmente para sustituir el volumen de sangre deficiente y para mejorar las propiedades reológicas de la sangre. La HESilación de un anticuerpo permite la prolongación de la vida media en la circulación por el aumento de la estabilidad de la molécula, así como mediante la reducción del aclaramiento renal, resultando en un aumento de la actividad biológica. Mediante la variación de diferentes parámetros, tales como el

peso molecular de HES, una amplia gama de conjugados de anticuerpos HES se pueden personalizar.

[00430] Los anticuerpos que tienen una vida media aumentada in vivo también se pueden generar introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o delecciones) en un dominio constante de IgG, o en un fragmento de unión FcRn del mismo (preferiblemente un Fc o un fragmento de dominio de bisagra Fc) . Véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 98/23289; Publicación Internacional Nº WO 97/34631; y US Pat. Nº 6.277.375.

[00431] Además, los anticuerpos se pueden conjugar a la albúmina con el fin de hacer que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo sea más estable in vivo o tenga una vida media más larga in vivo. Las metodologías son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Nº WO 93/15199, WO 93/15200, WO 01/77137 y.; y en la patente europea EP 413.622.

[00432] Las estrategias para aumentar la vida media son especialmente útiles en nanocuerpos, aglutinantes a base de fibronectina, y otros anticuerpos o proteínas para las cuales el incremento de vida media in vivo es deseado.

[00433] LOS CONJUGADOS DE ANTICUERPOS

[00434] La presente invención proporciona anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a BMP6 fusionados recombinantemente o conjugados químicamente (incluyendo tanto covalentemente como conjugaciones no covalentes) a una proteína heteróloga o polipéptido (o su fragmento de unión a antígeno, preferiblemente a 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 particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo descrito en el presente documento (por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fd,

fragmento Fv, fragmento F (ab)₂, un dominio VH, una CDR VH, un dominio VL o una VL CDR) y una proteína heteróloga, polipéptido, o péptido. Los métodos para fusionar o conjugar las proteínas, polipéptidos, o péptidos a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, US Pat. Nos. 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.112.946 y; Patente Europea N° EP 307434 y EP 367166.; Publicación Internacional N° WO 96/04388 y WO 91/06570.; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154: 5590-5600; y Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 11337-11341.

10 [00435] Proteínas adicionales de fusión pueden ser generadas a través de las técnicas de barajamiento de genes, barajamiento de motivos, barajamiento de exónes y/o barajamiento de codónes (denominados colectivamente como "barajamiento de ADN"). El barajado de ADN puede emplearse para alterar las actividades de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la

15 invención (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos con mayor afinidad y una menor velocidad de disociación). Véase, en general, US Pat.Nos. 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252, 5.837.458 y; 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;

20 and Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2):308-313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan por referencia en su totalidad). Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno del mismo, o los anticuerpos codificados y sus fragmentos de unión al antígeno, puede ser alterados por ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a error, inserción de

25 nucleótidos aleatoria u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un fragmento de unión a antígeno de anticuerpo del mismo que se une específicamente a BMP6 puede ser recombinado con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas.

[00436] Además, los anticuerpos y fragmentos del mismo puede ser fusionados a secuencias indicadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación de unión al antígeno. En una realización, la secuencia de aminoácidos indicadora es un péptido hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al, 1984, Cell 37:767), y la marca "flag".

[00437] En una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención fueron conjugados a un agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia en particular. Tal diagnóstico y la detección pueden ser logrados mediante el acoplamiento del anticuerpo a las sustancias detectables incluyendo, pero no limitándose a, diversas enzimas, tales como, pero no limitándose a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no limitados a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no limitados a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no limitados a, la luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero no limitados a, el yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I y ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), el tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In y ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga),

paladio (103Pd), molibdeno (99Mo), xenón (133Xe), flúor (18F), 153Sm, 177Lu, 159Gd, 149 m, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 186Re, 188Re, 142Pr, 105Rh, 97Ru, 68Ge, 57Co, 65Zn, 85Sr, 32P, 153Gd, 169Yb, 51Cr, 54mn, 75Se, 113Sn y 117Tin; y metales emisores de positrones usando varias tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

[00438] La presente invención abarca además los usos de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos conjugados a una fracción terapéutica. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo del mismo puede conjugarse a un fracción terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, por ejemplo, alfa-emisores. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células.

[00439] Además, un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo del mismo puede conjugarse a una fracción terapéutica o fracción de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Las fracciones terapéuticas o fracciones de fármacos no han de interpretarse como limitadas a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera, o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón beta, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, un agente anti-angiogénico; o, un modificador de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, una linfoquina.

[00440] Por otra parte, un anticuerpo puede conjugarse con fracciones terapéuticas tales como un ion metálico radiactivo, emisores alfa como 213Bi o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, incluyendo pero no limitandose a, 131In, 131LU, 131Y, 131Ho, 131Sm, para los polipéptidos. En una realización, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N''' - tetraacético (DOTA) el cual puede unirse al anticuerpo a través de

una molécula de engarce. Dichas moléculas enlazadoras 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. Medicina. Biol. 26 (8): 943-50, cada uno
5 incorporado por referencia en su totalidad.

[00441] Las técnicas para conjugar fracciones terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985);
10 Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 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.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The
15 Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. (1985).

[00442] Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son
20 particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

[00443] MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS DE LA INVENCIÓN

25 [00444] Ácidos nucleicos que codifican a los anticuerpos

[00445] La invención proporciona moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de las cadenas de anticuerpos unión a BMP6 descritas anteriormente. Algunos de los ácidos nucleicos de la invención comprenden la
30 secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada

mostrada en cualquiera de SEQ ID NO s: 16; 36; 56; o 76, y/o la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera mostrada en cualquiera de SEQ ID NOs: 26; 46; 66; o 86. En una realización específica, las moléculas de ácido nucleico son las identificadas en la Tabla 1. Algunas otras moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos 65, 80%, 95%, o 99%) a las secuencias de nucleótidos identificadas en la Tabla 1. Cuando se expresa a partir de vectores de expresión apropiados, los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos son capaces de exhibir la capacidad de unión al antígeno BMP6.

[00446] También se proporcionan en la invención polinucleótidos que codifican al menos una región CDR y por lo general las tres regiones CDR de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de unión a BMP6 expuesta en la Tabla 1. Algunos otros polinucleótidos que codifican la totalidad o sustancialmente la totalidad de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo de unión a BMP6 expuesto en la Tabla 1. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codificará cada una de las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina.

[00447] Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de la región variable de cadena pesada madura expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOs: 16; 36; 56; o 76. Algunas otras secuencias de ácido nucleico comprenden nucleótidos que codifica una secuencia de la región variable de la cadena ligera madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de la región variable de la cadena ligera madura que se expone en cualquiera de las SEQ ID NOs : 26; 46; 66; o 86.

[00448] Las secuencias de polinucleótidos pueden ser producidas por síntesis de ADN de novo de en fase sólida o por mutagénesis por PCR de una secuencia existente (por ejemplo, las secuencias como se describen en los Ejemplos a continuación) que codifica un anticuerpo de unión a BMP6 o su
5 fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo por 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., Meth. Enzymol. 68: 109, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., Tetra. Lett, 22: 1859, 1981; y el método de soporte sólido de la patente
10 US. Nº 4.458.066. La introducción de mutaciones a una secuencia de polinucleótidos mediante PCR se puede realizar como se describe en, por ejemplo, PCR Technology: Principios y Aplicaciones para la Amplificación de ADN, HA Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif.,
15 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; and Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991

[00449] También se proporcionan en la invención vectores de expresión y células huésped para producir los anticuerpos de unión a BMP6 descritos anteriormente. Varios vectores de expresión se pueden emplear para expresar los
20 polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos de unión a BMP6 o fragmentos de unión. Ambos vectores de expresión basados en virus y no virales se pueden utilizar para producir los anticuerpos en una célula huésped de mamífero. Vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o
25 ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington et al, Nat Genet 15: 345, 1997). Por ejemplo, los vectores no virales útiles para la expresión de polinucleótidos y polipéptidos de unión a BMP6 en células de mamíferos (por ejemplo, humanos) incluyen pThioHis A, B y C, pcADN3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego , Calif.), los vectores de MPSV, y
30 numerosos otros vectores conocidos en la técnica para la expresión de otras

proteínas. Vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores de virus vaccinia y el virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent et al., Supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49: 807, 1995; y Rosenfeld et al, Cell 68: 143, 1992.

[00450] La elección del vector de expresión depende de las células huésped deseadas en el que el vector se va a expresar. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores) que están unidas operativamente a los polinucleótidos que codifican un fragmento de unión a antígeno de cadena de anticuerpo de unión a BMP6. En una realización, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados se pueden expandir en condiciones no inductoras sin sesgar la población para las secuencias de codificación cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huésped. Además de los promotores, otros elementos reguladores también pueden ser necesarios o deseados para la expresión eficaz de un fragmento de unión a antígeno de cadena de anticuerpo de unión a BMP6. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y el sitio de unión al ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficiencia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; and Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Por ejemplo, el potenciador de SV40 o promotor de CMV se pueden usar para aumentar la expresión en células huésped de mamíferos.

[00451] Los vectores de expresión también pueden proporcionar una secreción de señal de posición de la secuencia para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpo de unión a BMP6 insertadas. Más a menudo, las secuencias de anticuerpos de unión a BMP6

insertada están ligadas a una secuencia de señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se utilizan para recibir las secuencias que codifican los anticuerpos de unión a BMP6 y los dominios de cadena ligera y pesada a veces también codifican regiones constantes o partes de las mismas. Tales vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes lo que conduce a la producción de anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Típicamente, tales regiones constantes son humanas.

[00452] Las células huésped para albergar y expresar cadenas de anticuerpo de unión a BMP6 pueden ser procariotas o eucariotas. *E. coli* es un huésped procariota útil para la clonación y expresión de los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariotas, uno también puede hacer vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estará presente, 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 típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitio de unión al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. Otros microorganismos, tales como levaduras, se pueden emplear también para expresar polipéptidos de unión a BMP6 de la invención. Las células de insecto en combinación con vectores de baculovirus también se pueden utilizar.

[00453] En una realización, las células huésped de mamíferos se utilizan para expresar y producir polipéptidos de unión a BMP6 de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser o bien una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógenos (por ejemplo, el mieloma 1D6.C9 clon de hibridoma como se describe en los Ejemplos) o una línea celular de

mamífero que alberga un vector de expresión exógeno (por ejemplo, las células de mieloma SP2/0 ejemplificadas a continuación). Estas incluyen cualquier animal inmortal mortal, normal, anormal normal o célula humana. Por ejemplo, un número de líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas

5 intactas se han desarrollado incluyendo las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso de cultivo de células de tejido de mamífero para expresar polipéptidos se discute en general en, por ejemplo, Winnacker, de los genes a Clones, VCH Publishers, Nueva York, NY, 1987. Los vectores de

10 expresión para células huésped de mamífero pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen, et al, Rev. Immunol 89: 49-68, 1986.), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias

15 terminadoras de la transcripción. Estos vectores de expresión usualmente contienen promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos para un tipo de células, específicos para etapa, y/o modulable o regulable. Los promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de metalotioneína, el

20 promotor tardío principal constitutivo de adenovirus, el promotor MMTV inducible con dexametasona, el promotor SV40, el promotor de MRP polIII, el promotor MPSV constitutivo, el promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor humano temprano inmediato CMV), el promotor de CMV constitutivo, y combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

25 [00454] Los métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación pueden utilizarse para otros huéspedes celulares. (Véase en

30 general Sambrook, et al., Supra). Otros métodos incluyen, por ejemplo,

electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, policación: conjugados de ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural del virus del herpes VP22 (Elliott y O'Hare, Cell 88: 223, 1997), la absorción de ADN mejorada por agente, y la transducción ex vivo. Para largo plazo, en la producción de alto rendimiento de proteínas recombinantes, a menudo se desea la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente cadenas de anticuerpos de unión a BMP6 o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Tras la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas de manera estable se pueden proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

20

[00455] GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE LA INVENCION

[00456] Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden ser producidos por una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, 1975 Nature 256: 495. Muchas de las técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales se pueden emplear por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

[00457] Un sistema animal para la preparación de hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se
5 conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

[00458] Los anticuerpos quiméricos o humanizados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describe
10 anteriormente. ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede ser obtenido a partir del hibridoma murino de interés y diseñado para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden estar vinculadas a
15 regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, US Pat. No. 4,816,567 a Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, US Pat. No. 5.225.539 de Invierno, y US. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a
20 Queen et al.

[00459] En una cierta realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra BMP6 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del
25 sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyendo a los ratones denominados en este documento como los ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y que se denominan colectivamente en este documento como "ratones de Ig humana."

[00460] El Ratón HuMAb ® (Medarex, Inc.) contiene el miniloci del gen de
30 inmunoglobulina humana que codifica unas cadenas de secuencias reordenadas

humanas de inmunoglobulina pesadas (mu y gamma) y ligeras kappa, junto con mutaciones dirigidas que inactivan el loci endógeno de la cadena mu y kappa (ver . por ejemplo, Lonberg, et al, 1994 Nature 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de IgM de ratón o K, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar alta afinidad a IgG –kappa-humana monoclonal (Lonberg, N. et al., 1994 supra; reviewed in Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de los ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas realizadas por dichos ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuaille et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuaille et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; and Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, los contenidos de todos los cuales se incorporan específicamente por referencia en su totalidad. Ver más, US Pat. Nos. 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; todos a Lonberg y Kay; Patente de Estados Unidos. No. 5.545.807 de Surani et al .; . Publicación PCT N° WO 99/45962 WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y, todo para Lonberg y Kay; y la Publicación PCT N° WO 01/14424 a Korman et al.

[00461] En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden cultivarse usando un ratón que lleve secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas tal como un ratón que lleva un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Tales ratones, denominados aquí como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 a Ishida et al.

[00462] Aún más, los sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para generar anticuerpos de unión a BMP6 y fragmentos de unión a antígeno del mismo de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico
5 alternativo conocido como el Xenomouse (Abgenix, Inc.) se puede utilizar. Tales ratones se describen en, por ejemplo, US Pat. Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 a Kucherlapati et al.

[00463] Además, los sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se
10 pueden utilizar para generar anticuerpos de unión a BMP6 de la invención. Por ejemplo, los ratones que llevan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana, conocidos como "ratones TC" se pueden utilizar; tales ratones se describen en Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 722-727. Además, las vacas que llevan
15 transcromosomas de cadena pesada y ligera humanas se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al, 2002 Nature Biotechnology 20: 889-894) y se puede utilizar para generar anticuerpos vinculante a BMP6 de la invención.

[00464] Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando métodos de phage display para el rastreo de bibliotecas
20 de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de phage display para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica o descritos en los ejemplos siguientes. Véase, por ejemplo: Pat. Nos. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al; Patente de Estados Unidos. Nos. 5.427.908 y 5.580.717 a Dower et al; Patente de Estados Unidos. Nos. 5.969.108 y 6.172.197
25 a McCafferty et al; y US Pat. Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

[00465] Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los que las células inmunes humanas han sido reconstituidas de manera que una respuesta de anticuerpos humanos

puede ser generada tras la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, US Pat. Nos. 5.476.996 y 5.698.767 a Wilson et al.

[00466] DISEÑO DEL MARCO O Fc

[00467] Los anticuerpos manipulados y fragmentos de unión al antígeno de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los residuos del marco dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retromutar" uno o más residuos de marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sido objeto de mutación somática puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia de línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos se pueden identificar mediante la comparación de las secuencias marco de anticuerpos con las secuencias de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio. Tales anticuerpos "retromutados" también están destinados a ser abarcados por la invención.

[00468] Otro tipo de modificación marco implica la mutación de uno o más residuos de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de células T para reducir por ello la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20030153043 por Carr et al.

[00469] En adición o alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser diseñados para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, la fijación del complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de

antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas se pueden unir al anticuerpo) o ser modificados para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas formas de
5 realización se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

[00470] En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, es aumentado o disminuido. Este enfoque se describe adicionalmente en
10 la patente de EE.UU. No. 5.677.425 por Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el montaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

[00471] En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo está
15 mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácidos se introducen en la interface de la región de dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de tal manera que el anticuerpo haya deteriorado la unión de la proteína A (spa) Staphylococcyi relativa al dominio Fc-bisagra nativo vinculante a SpA. Este
20 enfoque se describe con más detalle en la patente US. No. 6.165.745 de Ward et al.

[00472] En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones se pueden introducir: T252L, T254S, T256F, como se
25 describe en la patente US. N° 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión a receptor de salvamento tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en la patente US. Nos. 5.869.046 y 6.121.022 por Presta et al.

[00473] En una realización, la región Fc se altera mediante la sustitución de al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras de anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser sustituidos con un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector, pero conserva la capacidad de unión al 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 la patente US. Nos. 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter et al.

[00474] En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados de residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos con un residuo aminoácido diferente, tal que el anticuerpo haya alterado la unión de C1q y/o reduzca o elimine la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en la patente US. No. 6.194.551 por Idusogie et al.

[00475] En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos son alteradas para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo de fijarse en el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer et al.

[00476] En aún otra realización, 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 para un receptor Fc-gamma mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Por otra parte, los sitios de unión en la IgG1 humana para Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII y FcRn se han mapeado y variantes con unión mejorada han sido descritas (ver Shields, RL et al., 2001 J. Biol. . Chen 276: 6.591 hasta 6.604).

[00477] En aún otra realización, la glicosilación de un anticuerpo se modifica. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado puede ser realizado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo para "antígeno". Tales modificaciones

de hidratos de carbono se puede lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de la glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos se pueden hacer y resultan en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del marco de la región variable y así eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Este enfoque se describe con más detalle en la patente US. Nos. 5.714.350 y 6350861 por Co et al.

[00478] Adicional o alternativamente, un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación puede ser hecho, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosil o un anticuerpo que tiene más estructuras de bisectriz GlcNAc. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se puede lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células huésped en donde expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con la glicosilación alterada. Por ejemplo, EP 1176195 por Hang et al. describen una línea celular con un gen FUT8 alterado funcionalmente, que codifica una fucosiltransferasa, de modo que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiban una hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una variante de la línea celular CHO, las células Lec13, con una disminución de su capacidad para fijar la fucosa a hidratos de carbono unidos a Asn (297), también resultando en la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (Shields, R. L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación PCT WO 99/54342 por Umana et al. describe líneas celulares de ingeniería genética para expresar transferasas modificantes de glicoproteínas glicosiltransferasas (por ejemplo, beta (1,4) - N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas exhiban más estructuras de

bisectrices GlcNAc lo que se traduce en un aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

[00479] MÉTODOS DE DISEÑO DE ANTICUERPOS ALTERADOS

5 [00480] Como se discutió anteriormente, los anticuerpos de unión a BMP6 que tienen secuencias de VH y VL o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa mostradas en este documento puede utilizarse para crear nuevos anticuerpos de unión a BMP6 mediante la modificación de las secuencias de cadena pesada y/o de cadena ligera de longitud completa, VH y/o secuencias
10 de VL, o la(s) región(es) constante (s) unidas al mismo. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se utilizan las características estructurales del anticuerpo de unión a BMP6 de la invención para crear anticuerpos de unión a BMP6 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención,
15 tales como la unión a BMP6 humana y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de BMP6 (por ejemplo, inhibir la lisis de glóbulos rojos en un ensayo hemolítico).

[00481] Por ejemplo, una o más regiones CDR de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención, o
20 mutaciones de los mismos, se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco conocidas y/u otras CDRs para crear, de forma recombinante por ingeniería, anticuerpo de unión a BMP6 adicionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, tal como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de
25 partida para el método de ingeniería es uno o más de las secuencias VH y/o VL proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo manipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL proporcionadas en este documento, o una o más regiones

CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la(s) secuencia (s) se utiliza como el material de partida para crear secuencia(s) de "segunda(s) generación(es)"asderivado de la(s) secuencia(s) original(es) y luego la(s) secuencia(s) de "segunda(s) generación(es)" se prepara y se expresan como una

[00482] La secuencia de anticuerpo alterado también se puede preparar mediante el rastreo de bibliotecas de anticuerpos que tienen secuencias de CDR3 fijas o determinantes de unión esenciales mínimas como se describe en US20050255552 y diversidad en secuencias CDR1 y CDR2. El rastreo se puede realizar de acuerdo con cualquier tecnología de detección adecuada para el rastreo de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos, tales como la tecnología phage display.

[00483] Técnicas de biología molecular estándar se puede utilizar para preparar y expresar la secuencia del anticuerpo alterado. El anticuerpo codificado por la(s) secuencia (s) del anticuerpo alterado es una que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos de unión a BMP6 descritos en este documento, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a, específicamente unirse a la proteína BMP6 humana; y que el anticuerpo inhiba la lisis de glóbulos rojos en un ensayo hemolítico.

[00484] Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en este documento, tales como los expuestos en los ejemplos (por ejemplo, ELISA).

[00485] En una realización de los métodos de ingeniería de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, se pueden introducir mutaciones al azar o selectivamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia de codificación de un anticuerpo de unión a BMP6 y los anticuerpo de unión a BMP6 modificados resultantes pueden ser rastreados para actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe aquí. Los métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 por Short describe métodos para la creación y el rastreo de

mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis de saturación, el conjunto de ligadura sintética, o una combinación de las mismas. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 por Lazar et al. describe métodos de uso de métodos de rastreo computacionales para optimizar las propiedades
5 fisicoquímicas de anticuerpos.

[00486] CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS DE LA INVENCION

[00487] Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden caracterizarse mediante diversos ensayos funcionales. Por
10 ejemplo, pueden ser caracterizados por su capacidad para inhibir BMP6.

[00488] La capacidad de un anticuerpo para unirse a BMP6 puede detectarse marcando el anticuerpo de interés directamente, o el anticuerpo puede estar sin marcar y la unión detectarse indirectamente usando diversos formatos de ensayo sándwich conocidos en la técnica.

15 [00489] En una realización, el anticuerpo de unión a BMP6 y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención bloquean o compiten con un anticuerpo de unión a BMP6 de referencia con un polipéptido BMP6. Estos pueden ser anticuerpos de unión a BMP6 completamente humanos descritos anteriormente. También pueden existir otros, anticuerpos de unión a BMP6
20 quiméricos de raton o humanizados que se unan al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. La capacidad para bloquear o competir con la unión del anticuerpo de referencia indica que el anticuerpo de unión a BMP6 bajo ensayo se une al mismo o similar epítipo que el definido por el anticuerpo de referencia, o a un epítipo que es suficientemente proximal al epítipo al que se une el anticuerpo
25 de unión BMP6 de referencia. Dichos anticuerpos son especialmente propensos a compartir 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, el anticuerpo bajo ensayo se examina para
30 evaluar su capacidad de inhibir la unión específica del anticuerpo de referencia a

un antígeno común, tal como el polipéptido BMP6. Un anticuerpo de ensayo compite con el anticuerpo de referencia para la unión al antígeno si un exceso del anticuerpo de ensayo inhibe sustancialmente la unión del anticuerpo de referencia específico. Inhibición sustancial significa que el anticuerpo de ensayo reduce la unión específica del anticuerpo de referencia por lo general por lo menos 10%, 25%, 50%, 75%, o 90%.

[00490] Hay un número de ensayos de competencia de unión conocidos que se pueden utilizar para evaluar la competencia de un anticuerpo con un anticuerpo de referencia para la unión a una proteína en particular, en este caso, BMP6. Estos incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayo en fase sólida directa o indirecta (RIA), inmunoensayo enzimático en fase sólida directa o indirecta (EIA), ensayo de competición de sandwich (ver Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242-253, 1983); EIA biotina-avidina directa en fase sólida (véase see Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619, 1986); ensayo en fase sólida de marcaje directo, ensayo sándwich en fase sólida de marcaje directo (véase Harlow y Lane, *supra*); RIA en fase sólida con marcaje directo utilizando el marcador I-125 (ver Morel et al., *Molec. Immunol.* 25:7-15, 1988); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (Cheung et al., *Virology* 176: 546-552, 1990); y RIA de marcado directo (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82, 1990). Típicamente, un ensayo tal implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de éstos, un anticuerpo de unión a BMP6 de prueba no marcado 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. Por lo general, el anticuerpo de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo de competición (anticuerpos en competencia) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo como el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido al anticuerpo de referencia para que se produzca un impedimento estérico.

[00491] Para determinar si los anticuerpos monoclonales de unión a BMP6 seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos comercialmente disponibles (por ejemplo, reactivos de Pierce, Rockford, Ill.). Estudios de competición utilizando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados se pueden realizar usando 5 placas recubiertas con polipeptídicos BMP6 ELISA. La unión a MAb biotinilado puede ser detectada con una sonda estrep-avidina-fosfatasa alcalina. Para determinar el isotipo de un anticuerpo de unión a BMP6 purificado, ELISAs de isotipo se pueden realizar. Por ejemplo, los pozos de placas de microtitulación 10 pueden recubrirse con 1 µg/ml de IgG anti-humana durante la noche a 4grados C. Después de bloquear con 1% BSA, las placas reaccionan con 1 µg/ml o menos del anticuerpo monoclonal de unión a BMP6 o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante de una a dos horas. Se puede hacer reaccionar los pocillos ya sea con IgG1 humana o sondas alcalinas conjugadas con fosfatasa 15 IgM-específicas humanas. Las placas son, entonces desarrolladas y analizadas de manera que el isotipo del anticuerpo purificado se puede determinar.

[00492] Para demostrar la unión de anticuerpos monoclonales de unión a BMP6 en células vivas que expresan el polipéptido BMP6, la citometría de flujo puede ser utilizada. Brevemente, las líneas celulares que expresan BMP6 20 (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar) se pueden mezclar con diversas concentraciones de anticuerpo de unión a BMP6 en PBS que contiene 0,1% de BSA y 10% de suero de ternera fetal, para ser incubado a 37 grados C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con el anticuerpo anti-IgG humana marcado con fluoresceína en las mismas condiciones 25 que la tinción de un anticuerpo primario. Las muestras pueden ser analizadas mediante un instrumento FACScan usando luz y propiedades de dispersión lateral a la puerta(to gate) en las células individuales. Un ensayo alternativo usando microscopia de fluorescencia se puede usar (además de o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células se pueden teñir exactamente como se describió 30 anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia. Este método

permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

[00493] Anticuerpos de unión a BMP6 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden ser además probados en cuanto a reactividad con el polipéptido BMP6 o fragmento antigénico por Western Blot. Brevemente, polipéptidos BMP6 purificados o proteínas de fusión, o extractos celulares de células que expresan BMP6 pueden ser preparados y sometidos a electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato poliacrilamida. Después de la electroforesis, los antígenos separados son transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con 10% de suero de ternera fetal, y se sondearon con los anticuerpos monoclonales a ensayar. La unión a IgG humana puede ser detectada usando IgG fosfatasa alcalina anti-humana y desarrollandose con las tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

[00494] Ejemplos de ensayos funcionales se describen también en la sección de Ejemplos a continuación.

[00495] USOS PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

[00496] La presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con una mayor actividad de BMP6 mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención. En una realización específica, la presente invención proporciona un método de tratamiento de la anemia mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención.

[00497] Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden utilizar, entre otras cosas, para prevenir la progresión de la anemia. También se puede utilizar en combinación con otras terapias para el tratamiento de pacientes con anemia.

[00498] En una realización, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con BMP6 mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención. Ejemplos de enfermedades o trastornos conocidos relacionados con BMP6 incluyen: anemia, incluyendo, como ejemplos no limitativos: la anemia de la enfermedad crónica (ACD), la anemia de (por ejemplo, asociada a) la enfermedad renal crónica (ERC), la anemia de cáncer, la anemia inflamatoria, Anemia resistente a los agente estimulantes de la eritropoyesis (AEE) (por ejemplo, la anemia eritropoyetina resistente (EPO) , anemia de hiporrespuesta ESA (por ejemplo, la EPO anemia hiporrespuesta), la anemia por deficiencia de hierro funcional y/o anemia por deficiencia de hierro.

[00499] En una realización específica, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con BMP6 mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención, en el que dicha enfermedad o trastorno es anemia. En una realización la anemia, es la anemia de la enfermedad crónica. En una realización la enfermedad crónica es la enfermedad renal crónica. En una realización la enfermedad crónica es el cáncer. En una realización, la enfermedad es la inflamación crónica. En una realización, la anemia (por ejemplo, la anemia de enfermedad crónica) es la una anemia resistente a ESA (por ejemplo, la EPO). En una realización, la anemia (por ejemplo, la anemia de enfermedad crónica) es una (por ejemplo, la EPO) anemia de hiporespuesta a ESA. En una realización, la anemia (por ejemplo, la anemia de enfermedad crónica) es la anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, incluyendo en cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica (HD). En formas de realización, incluyendo cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene la enfermedad renal, por ejemplo, la enfermedad renal en etapa terminal.

[00500] En una realización específica, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con BMP6 mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de la invención, en el que dicha enfermedad o trastorno es anemia por deficiencia de hierro funcional. En una forma de realización, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica tratado con ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica tratados con ESA (por ejemplo, EPO) con enfermedad renal crónica.

[00501] En una realización específica, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de la anemia mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención. En una realización específica, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de la anemia mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención. En una realización de la anemia es la anemia de la enfermedad renal crónica. En una realización, la anemia es anemia resistente a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es una anemia de hiporrespuesta a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es la anemia por deficiencia de hierro. En una realización, la anemia es la anemia asociada con una enfermedad renal, por ejemplo, la enfermedad renal crónica. En formas de realización, incluyendo en cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica (HD). En formas de realización, incluyendo en cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene la enfermedad renal, por ejemplo, enfermedad renal en etapa terminal.

[00502] En una realización específica, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con BMP6 mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención, en el que

dicha enfermedad o trastorno es la anemia por deficiencia de hierro funcional. En una realización, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica tratado con ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica tratados con ESA (por ejemplo, EPO) con enfermedad renal crónica.

5 [00503] En una realización específica, la presente invención proporciona métodos para tratar la anemia.

[00504] En una realización específica, la presente invención proporciona un método para reducir la dosis necesaria de ESA (por ejemplo, EPO) de un sujeto mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad
10 eficaz de un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de la invención. En una realización la anemia es la anemia de la enfermedad crónica. En una realización la enfermedad crónica es la enfermedad renal crónica. En una realización la enfermedad crónica es el cáncer. En una realización, la enfermedad es la inflamación crónica. En una realización, la anemia (por ejemplo, la anemia de
15 enfermedad crónica) es anemia resistente a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es una anemia de hiporrespuesta a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es la anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, incluyendo en cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica (HD). En formas de realización,
20 incluyendo cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene la enfermedad renal, por ejemplo, enfermedad renal en etapa terminal.

[00505] En una realización específica, la presente invención proporciona métodos para reducir la dosis necesaria de ESA (por ejemplo, EPO) de un sujeto mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad
25 eficaz de un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de la invención, en donde que dicho sujeto tiene la anemia por deficiencia de hierro funcional. En una realización, el sujeto es un paciente tratado por hemodiálisis crónica ESA (por ejemplo, la EPO). En una realización, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica tratado con ESA (por ejemplo, la EPO) con enfermedad renal crónica.

[00506] En una realización específica, la presente invención proporciona un método para reducir la dosis necesaria de ESA (por ejemplo, EPO) de un sujeto mediante la administración a un sujeto en necesidad de la misma una cantidad eficaz de un anticuerpo. En una realización, el sujeto tiene anemia. En una
5 realización la anemia es la anemia de enfermedad crónica. En una realización la enfermedad crónica es la enfermedad renal crónica. En una realización la enfermedad crónica es el cáncer. En una realización, la enfermedad crónica es la inflamación. En una realización, la anemia (por ejemplo, la anemia de enfermedad crónica) es anemia resistente a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la
10 anemia es una anemia de hiporrespuesta a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es la anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, incluyendo en cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica (HD). En formas de realización, incluyendo cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene la enfermedad renal, por
15 ejemplo, enfermedad renal en etapa terminal.

[00507] En una realización específica, la presente invención proporciona un método para reducir la dosis necesaria de ESA (por ejemplo, EPO) de un sujeto mediante la administración a un sujeto en necesidad de la misma una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención, donde dicho sujeto tiene anemia
20 por deficiencia de hierro funcional. En una realización, el sujeto es un paciente tratado por hemodiálisis crónica ESA (por ejemplo, la EPO). En una realización, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica tratado con ESA (por ejemplo, la EPO) con enfermedad renal crónica.

[00508] En una realización específica, la presente invención proporciona un método para reducir la dosis necesaria de hierro (por ejemplo, hierro intravenoso)
25 de un sujeto mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno. En una realización, el sujeto tiene anemia. En una realización de la anemia es la anemia de la enfermedad crónica. En una realización la enfermedad crónica es la
30 enfermedad renal crónica. En una realización la enfermedad crónica es el cáncer.

En una realización, la enfermedad crónica es la inflamación. En una realización, la anemia (por ejemplo, la anemia de enfermedad crónica) es anemia resistente a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es una anemia de hiporrespuesta a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es la anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, incluyendo en cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica (HD). En formas de realización, incluyendo cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene la enfermedad renal, por ejemplo, enfermedad renal en etapa terminal.

[00509] En una realización específica, la presente invención proporciona un método para reducir la dosis necesaria de hierro (por ejemplo, hierro intravenoso) de un sujeto mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno de la invención, en el que dicho sujeto tiene la anemia por deficiencia de hierro funcional. En formas de realización, el sujeto es un paciente tratado de hemodiálisis crónica (HD). En una realización, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica tratado con ESA (por ejemplo, la EPO) con enfermedad renal crónica.

[00510] En una realización específica, la presente invención proporciona un método para reducir la dosis necesaria de hierro (por ejemplo, hierro intravenoso) de un sujeto mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención. En una realización, el sujeto tiene anemia. En una realización de la anemia es la anemia de la enfermedad crónica. En una realización, la enfermedad crónica es la inflamación. En una realización, la anemia (por ejemplo, la anemia de enfermedad crónica) es anemia resistente a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es una anemia de hiporrespuesta a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es la anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, incluyendo en cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica (HD). En formas de realización,

incluyendo cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene la enfermedad renal, por ejemplo, enfermedad renal en etapa terminal.

[00511] En una realización específica, la presente invención proporciona un método para reducir la dosis necesaria de hierro (por ejemplo, hierro intravenoso) de un sujeto mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención, en el que dicho sujeto tiene la anemia por deficiencia de hierro funcional. En formas de realización, el sujeto es un paciente tratado de hemodiálisis crónica (HD). En una realización, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica tratado con ESA (por ejemplo, la EPO) con enfermedad renal crónica

[00512] En una realización específica, la presente invención proporciona un método para reducir la dosis necesaria de hierro (por ejemplo, hierro intravenoso) de un sujeto y reducir la dosis necesaria de ESA (por ejemplo, EPO) de un sujeto mediante la administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención o una composición que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En una realización la anemia es la anemia de enfermedad crónica. En una realización la enfermedad crónica es la enfermedad renal crónica. En una realización la enfermedad crónica es el cáncer. En una realización el sujeto tiene anemia. En una realización, la enfermedad crónica es la inflamación. En una realización, la anemia (por ejemplo, la anemia de enfermedad crónica) es anemia resistente a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es una anemia de hiporrespuesta a ESA (por ejemplo, EPO). En una realización, la anemia es la anemia por deficiencia de hierro. En formas de realización, incluyendo en cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto es un paciente de hemodiálisis crónica (HD). En formas de realización, incluyendo cualquiera de las realizaciones anteriores, el sujeto tiene la enfermedad renal, por ejemplo, enfermedad renal en etapa terminal.

[00513] En una realización, la presente invención proporciona métodos de movilización de hierro secuestrado por la administración a un sujeto que lo

necesite una cantidad eficaz de los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno de la invención.

[00514] En una realización, la presente invención proporciona métodos de movilización de hierro secuestrado por la administración a un sujeto que lo
5 necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención.

[00515] En una realización, la presente invención proporciona un método para mejorar (por ejemplo, aumentar) el nivel de hemoglobina en un sujeto con anemia, al tiempo que reduce la necesidad de la dosificación con eritropoyetina
10 y/o hierro (por ejemplo, hierro IV), comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad del mismo un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de la invención. En una realización, la anemia es la anemia asociada con la enfermedad crónica. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel a un nivel especificado por una guía de práctica
15 clínica, por ejemplo, la enfermedad renal: Mejora de los resultados globales (KDIGO) Grupo de Trabajo de la anemia. KDIGO Guía de Práctica Clínica para la anemia en la enfermedad renal crónica. . Kidney inter., Suppl. 2012; 2: 279–335, cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel de la
20 hemoglobina hasta al menos aproximadamente 11,0 g/dl, por ejemplo, desde aproximadamente 11,0 g/dl a aproximadamente 12,5 g/dL. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel de la hemoglobina para al menos 11,0 g/dl, por ejemplo, a partir de 11,0 g/dl a 12,5 g/dL.

[00516] En una realización, la presente invención proporciona un método
25 para mejorar (por ejemplo, aumentando) el nivel de hemoglobina en un sujeto con anemia, al tiempo que reduce la necesidad de la dosificación con eritropoyetina y/o hierro (por ejemplo, hierro IV), comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición que comprende un anticuerpo de la invención. En una realización, la anemia es la anemia asociada con la
30 enfermedad crónica. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina

comprende la mejora del nivel a un nivel tal como se especifica en una guía de práctica clínica, por ejemplo, la enfermedad renal: Mejora de los resultados globales (KDIGO) Grupo de Trabajo de la anemia. KDIGO Guía de Práctica Clínica para la anemia en la enfermedad renal crónica. *Kidney inter.*, Suppl. 2012; 2: 279–335, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel de la hemoglobina hasta al menos aproximadamente 11,0 g/dl, por ejemplo, desde aproximadamente 11,0 g/dl a aproximadamente 12,5 g/dL. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel de la hemoglobina para al menos 11,0 g/dl, por ejemplo, a partir de 11,0 g/dl a 12,5 g/dL.

[00517] En una realización, la presente invención proporciona un método para mantener el nivel de hemoglobina en un sujeto con anemia, al tiempo que reduce la necesidad de la dosificación con eritropoyetina y/o hierro (por ejemplo, hierro IV), dicho método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. En una realización, la anemia es la anemia asociada con la enfermedad crónica. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel a un nivel especificado por una guía de práctica clínica, por ejemplo, la enfermedad renal: Mejora de los resultados globales (KDIGO) Grupo de Trabajo de la anemia. KDIGO Guía de Práctica Clínica para la anemia en la enfermedad renal crónica. *Kidney inter.*, Suppl. 2012; 2: 279–335, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel de la hemoglobina hasta al menos aproximadamente 11,0 g/dl, por ejemplo, desde aproximadamente 11,0 g/dl a aproximadamente 12,5 g/dL. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel de la hemoglobina para al menos 11,0 g/dl, por ejemplo, a partir de 11,0 g/dl a 12,5 g/dL.

[00518] En una realización, la presente invención proporciona un método para mantener el nivel de hemoglobina en un sujeto con anemia, al tiempo que

reduce la necesidad de la dosificación con eritropoyetina y/o hierro (por ejemplo, hierro IV), dicho método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición que comprende un anticuerpo de la invención. En una realización, la anemia es la anemia asociada con la enfermedad crónica. En una
5 realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel a un nivel especificado por una guía de práctica clínica, por ejemplo, la enfermedad renal: Mejora de los resultados globales (KDIGO) Grupo de Trabajo de la anemia. KDIGO Guía de Práctica Clínica para la anemia en la enfermedad renal crónica. *Kidney inter., Suppl.* 2012; 2: 279–335, cuyos contenidos se incorporan
10 aquí como referencia en su totalidad. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel de la hemoglobina hasta al menos aproximadamente 11,0 g/dl, por ejemplo, desde aproximadamente 11,0 g/dl a aproximadamente 12,5 g/dL. En una realización, la mejora del nivel de hemoglobina comprende la mejora del nivel de la hemoglobina para al menos 11,0
15 g/dl, por ejemplo, a partir de 11,0 g/dl a 12,5 g/dL.

[00519] En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se describe en la Tabla 1 se pueden administrar a un paciente en necesidad del mismo en combinación con un método o procedimiento terapéutico, tal como se describe en este documento o como es conocido en la
20 técnica. Tal método o procedimiento incluye, como ejemplos no limitativos: la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ESA (por ejemplo, EPO), eritropoyetina, o hierro, y la transfusión de sangre. El tratamiento suele continuarse en intervalos durante un período de una semana, un mes, tres meses, seis meses o un año. En algunos pacientes, se administra un tratamiento de hasta
25 el resto de la vida de un paciente.

[00520] Cuando se administran los agentes terapéuticos de la presente invención junto con otro agente, los dos pueden administrarse secuencialmente en cualquier orden o simultáneamente. En algunos aspectos, un anticuerpo de la presente invención se administra a un sujeto que también está recibiendo
30 tratamiento con un segundo agente o método (por ejemplo, ESA, eritropoyetina,

hierro, transfusión de sangre). En otros aspectos, la molécula de unión se administra junto con tratamientos quirúrgicos.

[00521] Los agentes adecuados para el tratamiento de combinación con Anticuerpo de unión a BMP6 incluyen agentes conocidos en la técnica que inhibir o
5 reducir la expresión, el nivel, la estabilidad y/o actividad de BMP6. Tales agentes incluyen anticuerpos, siRNAs y pequeñas moléculas a BMP6.

[00522] Varios anticuerpos a BMP6 son conocidos en la técnica, incluyendo, entre otros, los descritos en:

[00523] Andriopoulos et al. 2009 Nat. Gineta. 41: 482-487;

10 [00524] Arndt et al. 2010 Gastroent. 138: 372-382;

[00525] Bames et al. 1995 Mundial J. Urol. 13: 337-343;

[00526] Camaschella et al. 2009 Nat. Gineta. 41: 386-388;

[00527] Celement et al. 1999 Int. J. Cancer 80: 250 hasta 256;

[00528] Corradini et al. 2011 Hepatol. 54: 273-284;

15 [00529] Crews et al. 2010 J. Neuro. 30: 12252 a 12.262;

[00530] Dai et al. 2.005 Cancer Res. 65: 8274;

[00531] Darby et al. 2007 J. Pathol. 214: 394-404;

[00532] Hadziahmetovic et al. 2011 179: 335-348;

[00533] Hamdy et al. 1997 Cancer Res. 57: 4427;

20 [00534] Haudenschild et al. 2004 Cancer Res. 64: 8276;

[00535] Hee et al. 2008 J. Orth. Res. 27: 162-168;

[00536] Herrera et al. 2.009 Cell Biol BMC. 10: 20;

[00537] Inagaki et al. 2005 Endocrin. 147: 2,681 mil hasta 2.689 mil;

[00538] Jung et al. 2008 Células madre 26: 2042 a 2051;

25 [00539] Kaiser et al. 1998 J. Invest. Cuero. 111: 1145 hasta 1152;

[00540] Kautz et al. 2011 Haematol. 96: 199-203;

[00541] Khalaf et al. 2.012 Eur. J. Endocrin. 168: 437-444;

[00542] Kochanowska et al. 2002 Exp. Biol. Medicina. 227: 57-62;

[00543] Li et al. 2006 Int. J. Med. Sci. 3: 97-105;

30 [00544] Meynard et al. 2.011 Blood 118: 747 a 756;

- [00545] Pederson et al. 2.008 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 105: 20764-69;
- [00546] Plant et al. 2.002 J. Bone Min. Res. 17: 782-790;
- [00547] Schluesener et al. 1994 Atheroscl. 113: 153-156;
- [00548] Schluesener et al. 2004 GLIA 12: 161-164;
- 5 [00549] Shi et al. 2009 Fert. Steril. 92: 1794-1798;
- [00550] Varley et al. 1996 Exp. Neur. 140: 84-94;
- [00551] Wang et al. 2,007 Mol. Celda. Neurosci. 34: 653-661; y
- [00552] Zhang et al. 2006 Neurosci. 138: 47-53;
- [00553] Patente de Estados Unidos. N° 8.795.665; y
- 10 [00554] WO 2010/056981;
- [00555] Anticuerpos adicionales a BMP6 son conocidos en la técnica; muchos están disponibles comercialmente.
- [00556] Varios siRNAs a BMP6 son conocidos en la técnica, incluyendo, entre otros, los descritos en:
- 15 [00557] He et al. 2.003 Cell. Señal. 25: 1372-78;
- [00558] Ikeda et al. 2012 PLoS 0040465;
- [00559] Kautz et al. 2.008 Blood 112: 1.503;
- [00560] Mi et al. 2011 J. Cancer Res. Clin. Oncol. 137: 245;
- [00561] Xia et al. 2007 J. Biol. Chem. 282: 18.129 a 18140;
- 20 [00562] Xia et al. 2.008 Blood 111: 5195; y
- [00563] Yang et al. 2009 Int. J. Bioch. Cell Biol. 41: 853 hasta - 861
- [00564] Son conocidos inhibidores adicionales de BMP6. Cualquiera de estos puede ser utilizado en combinación con cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en este documento.
- 25 [00565] Un régimen de terapia de combinación puede ser aditiva, o puede producir resultados sinérgicos (por ejemplo, reducciones en la actividad de BMP6 más de lo esperado para el uso combinado de los dos agentes). En una realización, la presente invención proporciona una terapia de combinación para prevenir y/o tratar la anemia u otra enfermedad relacionada con BMP6 como se
- 30 describió anteriormente con un anticuerpo de unión a BMP6 de la invención y un

agente anti-anemia o método, como ESA, eritropoyetina, hierro o transfusión de sangre.

[00566] **USOS DE DIAGNÓSTICO**

- 5 [00567] En un aspecto, la invención abarca ensayos de diagnóstico para la determinación BMP6 y/o expresión de ácido nucleico así como la función BMP6, en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, células, tejido) o de un individuo quien está aquejado de una enfermedad o trastorno, o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la anemia.
- 10 [00568] Los ensayos de diagnóstico, tales como ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo marcado (el "trazador") para competir con el analito de la muestra de prueba para un número limitado de sitios de unión en una pareja de unión común. La pareja de unión generalmente se insolubiliza antes o después de la competición y luego el trazador y el analito unidos a la pareja de
- 15 unión se separan del trazador y analito no unido. Esta separación se realiza mediante decantación (en la que se preinsolubiliza la pareja de unión) o por centrifugación (donde la pareja de unión se precipita después de la reacción competitiva). La cantidad de analito de la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unido tal como se mide por la cantidad de
- 20 sustancia marcadora. Las curvas de dosis-respuesta con cantidades conocidas de analito se preparan y se comparan con los resultados de las pruebas a fin de determinar cuantitativamente la cantidad de analito presente en la muestra de ensayo. Estos ensayos se denominan sistemas ELISA cuando las enzimas se utilizan como marcadores detectables. En un ensayo de esta forma, la unión
- 25 competitiva entre los anticuerpos y anticuerpos de unión a BMP6 resulta en la unión a BMP6, preferiblemente los epítopos BMP6 de la invención, siendo una medida de anticuerpos en la muestra de suero, más particularmente, neutralizando los anticuerpos en la muestra de suero.
- [00569] Una ventaja significativa del ensayo es que la medición es de
- 30 anticuerpos neutralizantes directamente (es decir, aquellos que interfieren con la

unión de BMP6, específicamente, epítomos). Tal ensayo, particularmente en la forma de una prueba ELISA tiene considerables aplicaciones en el entorno clínico y en el rastreo de sangre rutinario.

[00570] En el diagnóstico clínico o un control de los pacientes con trastornos asociados con la anemia, la detección de proteínas BMP6 en comparación con los niveles en una muestra biológica correspondiente a partir de un sujeto normal es indicativo de un paciente con trastornos asociados con anemia.

[00571] Un diagnóstico in vivo o por imagen se describe en US2006/0067935. Brevemente, estos métodos generalmente comprenden administrar o introducir a un paciente una cantidad diagnósticamente efectiva de molécula de unión BMP6 que está unida operativamente a un marcador o etiqueta que es detectable por métodos no invasivos. El conjugado anticuerpo-marcador se deja suficiente tiempo para localizar y unirse a BMP6. El paciente se expone entonces a un dispositivo de detección para identificar el marcador detectable, formando así una imagen de la localización de las moléculas de unión a BMP6 en el tejido de un paciente. La presencia de anticuerpo de unión a BMP6 o un fragmento de unión a antígeno del mismo se detecta mediante la determinación de si un anticuerpo se une al marcador de un componente del tejido. La detección de un nivel de aumento en las proteínas BMP6 o una combinación de proteína en comparación con un individuo normal sin anemia es indicativo de una predisposición a y/o un set de trastornos asociados con anemia. Estos aspectos de la invención son también para su uso en métodos de imagen de tejidos y métodos de diagnóstico y tratamiento combinados.

[00572] La invención también se refiere al campo de la medicina predictiva en la que los ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, farmacogenómica y el seguimiento de los ensayos clínicos se utilizan con fines de pronóstico (predictivos) para tratar de ese modo un individuo profilácticamente.

[00573] La invención también proporciona ensayos de pronóstico (o predictivos) para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la desregulación de la actividad de la vía BMP6. Por

ejemplo, las mutaciones en el gen BMP6 pueden ensayarse en una muestra biológica. Tales ensayos pueden usarse con fines de pronóstico o predictivo para tratar así profilácticamente un individuo antes de la aparición de un trastorno caracterizado por o asociado con BMP6, la expresión del ácido nucleico o la actividad.

[00574] Otro aspecto de la invención proporciona métodos para determinar la expresión de ácido nucleico BMP6 o la actividad de BMP6 en un individuo para seleccionar de ese modo agentes terapéuticos o profilácticos apropiados para ese individuo (denominado en este documento como "farmacogenómica"). La farmacogenómica permite la selección de agentes (por ejemplo, fármacos) para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo basándose en el genotipo del individuo (por ejemplo, el genotipo del individuo examinado para determinar la capacidad del individuo para responder a un agente particular).

[00575] Aún otro aspecto de la invención proporciona un método de monitorización de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos) sobre la expresión o actividad de BMP6 en ensayos clínicos.

[00576] **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS**

[00577] La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo de unión a BMP6 o fragmento de unión del mismo formulados junto con un transportador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más de otros agentes terapéuticos que son adecuados para tratar o prevenir una enfermedad asociada a BMP6 (por ejemplo, anemia). Los transportadores farmacéuticos pueden potenciar o estabilizar la composición, o facilitar la preparación de la composición. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

[00578] Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. La ruta y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. La administración puede ser intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, o proximal administrada al sitio de la diana. El transportador farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede estar recubierta con un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

[00579] La composición debe ser estéril y fluida. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

[00580] Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos y practicados rutinariamente en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones GMP. Típicamente, una dosis terapéuticamente eficaz o dosis eficaz del anticuerpo de unión a BMP6 se emplea en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los anticuerpos de unión a BMP6 se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales

conocidos por los expertos en la técnica. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un único bolo puede ser administrado, varias dosis divididas pueden ser administradas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria como se usa aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido.

[00581] Niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del particular compuesto que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares.

[00582] Un médico o veterinario puede comenzar la dosis de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, las dosis eficaces de las

composiciones de la presente invención, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio alérgico descrito en el presente documento varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis de tratamiento deben titularse para optimizar la seguridad y la eficacia. Para la administración sistémica con un anticuerpo, los intervalos de dosificación deben ser de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 15 mg/kg, de peso corporal del huésped. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración sistémica de una vez por cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Para la administración intravítrea con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10 mg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración sistémica de una vez por cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

[00583] El anticuerpo se administra generalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpos de unión a BMP6 en el paciente. En algunos métodos de administración sistémica, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de 25-500 µg/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, caso en el que se requiere una administración menos frecuente. La dosis y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran media vida más larga que la de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de sus

vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos a veces se requiere hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces,
5 al paciente se puede administrar un régimen profiláctico.

[00584] En una realización específica, la composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se administra a una dosis (anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) de entre 0,001 mg/kg y 0,1 mg/kg. En una realización específica, la composición que comprende
10 el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 0,1 mg/kg. En una realización específica, la composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se administra a una dosis de 0.001 mg/kg, 0,0016 mg/kg, 0,0025 mg/kg, 0,0040 mg/kg, 0,0063 mg/kg, 0,01 mg/kg,
15 0,016 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,040 mg/kg, 0,063 mg/kg, o 0,1 mg/kg. En una realización específica, la composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se administra a una dosis de aproximadamente 0,001 mg/kg, aproximadamente 0,0016 mg/kg, alrededor de 0,0025 mg/kg, alrededor de 0,0040 mg/kg, aproximadamente 0,0063 mg/kg,
20 aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,016 mg/kg, aproximadamente 0,025 mg/kg, aproximadamente 0,040 mg/kg, aproximadamente 0,063 mg/kg, o aproximadamente 0,1 mg/kg. En una realización, se administra la composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, incluyendo, por ejemplo, en cualquiera de las dosis citadas anteriormente, por vía
25 intravenosa. En realizaciones, la administración intravenosa es una infusión intravenosa. En formas de realización, la infusión tiene lugar durante 30-60 minutos. En formas de realización, la infusión tiene lugar durante unos 30-60 minutos.

30 [00585] **EJEMPLOS**

[00586] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención pero no para limitar su ámbito de aplicación. Otras variantes de la invención serán fácilmente evidentes para un experto normal en la técnica y son abarcadas por las reivindicaciones adjuntas.

5 EJEMPLO 1

[00587] Los ejemplos describen, entre otros, los anticuerpos 3, 5, 6 y 7.

[00588] Esto describe la relación entre éstos y los anticuerpos de los padres:

Clon parental	NOV0442 (VH3_3-15, VI1_1e)			
PTM-extracción + FW-LCDR2 reparación	NOV0442_VL [Y49, G50, N51Q]			NOV0442_VL [Y49, G50, N51S]
Clon Madurado con el nuevo HCDR2	NOV0787	NOV0798	NOV0806	NOV0800
Clon Diseñado (línea germinal)	NOV0951	NOV0954	NOV0958	NOV0961
Número de NVP	Anticuerpo 5	Anticuerpo 6	Anticuerpo 7	Anticuerpo 3

[00589] Todos los clones son anticuerpos IgG1 humana.

lista de abreviaturas

Abreviatura	Descripción
μ	Micro
Aa	Aminoácidos
ACD	Anemia por enfermedad crónica
Amp	Ampicilina
AP	Fosfatasa alcalina
BMP	Proteína morfogénica ósea
BMPR	Receptor de la proteína morfogenética ósea

bp	Par de bases
BRE	Elemento de sensible a BMP
BSA	Albúmina de suero bovino
Cam	El cloranfenicol
CDR	Región determinante de la complementariedad
CKD	La enfermedad renal crónica
Cy	Cynomolgus
Da	Dalton
DMEM	Medio Eagle de Dulbecco modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleósido trifosfato
DTT	DL-ditiotreitol
EC50	Concentración efectiva media
ECL	Quimioluminiscencia aumentada
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático

EPO	Eritropoyetina
ESA	Agente estimulante de la eritropoyesis
Fab	Fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo
Fc	Fragmento cristizable
F-DAS	Evaluación de revelado final
Glu	Glucosa
HEK cells	Células de riñón de embriones humanos
HGB	Hemoglobina
HP	fago ayudante, VCSM13
HRP	Peroxidasa de rábano picante
Hu	Humano
IC50	Concentración media de inhibición
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil β -D- tiogalactósido
KD	Constante de equilibrio de disociación
koff	Constante de velocidad de disociación
kon	Tasa de asociación constante
LB	Luria-Bertani

LP	Fase líquida
Luc	Luciferasa
M	Molar
min	Minutos
MS	Espectrometría de masas
MSD	Descubrimiento de mesoescala
NaCl	Cloruro de sodio
Ni-NTA	Ácido-Níquel nitrilotriacético
O/n	Durante la noche
OD	Densidad óptica
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino más 0,1% de Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PEM	Medio Expresión de proteínas
Pen/Strep	Penicilina/estreptomicina
PK/PD	Farmacocinética/farmacodinámica

POD	Peroxidasa
PTM	Sitio de modificación postraducciona
RE	Enzima de restricción
RGA	Ensayo de gen reportero
Rpm	Rounds por minuto
RT	Temperatura ambiente
RU	Unidades de resonancia
s	Segundos
S-DAS	Análisis de habilidad de desarrollo de seleccción
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SET	Titulación de equilibrio de la solución
SP	Fase sólida
SPR	Resonancia de plasmones superficiales
Tm	Temperatura de fusión
UV	Ultravioleta
VH	Fragmentos de dominio variable de la cadena pesada
VL	Fragmentos dominio variable de la cadena ligera

[00590] Resumen

[00591] En este trabajo se han identificado con éxito anticuerpos específicos anti-humanos BMP6 mediante la aplicación de la tecnología phage display utilizando una biblioteca de phage display humana.

5 **[00592] Introducción**

[00593] La anemia es frecuente en los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y se asocia con una menor calidad de vida y un mayor riesgo de resultados adversos, incluyendo enfermedad cardiovascular y muerte.

[00594] Uno de los objetivos de los anticuerpos BMP6 es que como una
10 terapia reductora de hepcidina beneficie a los pacientes con anemia con restricción de hierro aumentando simultáneamente la hemoglobina al tiempo que reduce los requerimientos de los agentes estimulantes de la eritropoyesis, como la eritropoyetina y el hierro intravenoso. Los agentes reductores de hepcidina pueden ser una estrategia eficaz para mejorar la anemia de hiporrespuesta a ESA en esta
15 población de pacientes y en otras formas de anemia por enfermedad crónica (ACD) que se caracterizan por la restricción de hierro.

[00595] Un objetivo general del proyecto es identificar y desarrollar anticuerpos contra BMP6 que sean capaces de reducir el nivel de hepcidina, y por lo tanto beneficiar a los pacientes con anemia de restricción de hierro al reducir el
20 requerimiento de agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA). En este trabajo, hemos aplicado la tecnología phage display para identificar un enlazador específico de BMP6.

[00596] Anticuerpos BMP6 preferidos se encuentran la mayor parte o la totalidad de los criterios que se enumeran a continuación:

25 [00597] Las constantes de disociación (valores K_D) de los fragmentos Fab en la BMP6 humana deben ser inferiores a 1 nM.

[00598] Valores K_D en el antígeno BMP6 de cyno no más de 5 veces más débil que para BMP6 humana.

[00599] Valores K_D en antígeno BMP6 de ratón no más de 5 veces más
30 débil que para BMP6 humano.

[00600] Selectividad para BMP6 humana sobre BMP5 humana y BMP7 humana con más de 100 veces de diferencia.

[00601] Capacidad de unirse y neutralizar la actividad de señalización de BMP6 en un ensayo del gen reportero HEP3B-BRE-Luc. Las células Hep3B
5 transfectadas establemente con el gen reportero BRE2-luc2 fueron inducidas con proteínas hBMP (I + D) y tratadas con anticuerpos anti-BMP6. El ensayo BrightGlo se hizo 24h después del tratamiento.

[00602] La capacidad para inhibir la expresión de hepcidina inducida por BMP6 en líneas de células hepáticas y células hepáticas humanas primarias.

10 [00603] Bajo a moderado riesgo de revelado. Un formato final de anticuerpo es la IgG1 humana.

[00604] Los anticuerpos se generaron utilizando una biblioteca phage display comercialmente disponible como se ha descrito previamente (Knappik et al. 2000 J. Mol. Biol. 296: 57-86, Prassler et al. 2011 J. Mol. Biol. 413: 261-278) y employs
15 technology for displaying the Fab on the phage surface (Rothe et al. 2008 J. Mol. Biol. 376: 1182-1200). Técnicas de selección por afinidad y rastreos iniciales de ELISA se realizaron en hBMP6 de R & D Systems. El rastreo ELISA para detección de aciertos de unión de la proteína como resultado la identificación de ligantes específicos para hBMP6. Los fragmentos de anticuerpo Fab se
20 caracterizaron adicionalmente para reactividad cruzada de especies con homólogos de BMP6 ratón y se determinaron sus afinidades de unión a BMP6 humano. La especificidad del Fab también se comprobó utilizando las proteínas hBMP2, hBMP5 y hBMP7 en ELISA. La actividad específica de BMP6 de los Fab también se evaluó en un ensayo de gen reportero.

25 [00605] Basándose en esta caracterización inicial, varios clones fueron convertidos en el formato de IgG1 humana y se caracterizaron utilizando los mismos ensayos de unión, especificidad y actividad. El resultado de esta caracterización funcional en combinación con los perfiles resultantes de la evaluación de revelado condujo a la selección de 3 clones para la maduración de
30 afinidad (NOV0429, NOV0441 y NOV0442).

[00606] Los clones fueron asignados al azar ya sea dentro de su LCDR3 o en su HCDR2, produciendo 2 nuevas bibliotecas Fab por clon parental. Se realizaron técnicas de selección por afinidad en fase sólida utilizando hBMP6 de Peptotech, así como técnicas de selección por afinidad en fase líquida usando hBMP6 biotinilado al azar de Peptotech. El rastreo MSD-SET de lisados Fab de *E. coli* combinados con un ELISA de especificidad en las proteínas hBMP7 hBMP5 resultó en la identificación de ligantes específicos para hBMP6 con afinidad mejorada en comparación con los clones parentales. Estos derivados mejorados fueron entonces convertidos en formato de IgG1 humana y caracterizados además ELISA y en RGA para evaluar su actividad de especificidad a hBMP6.

[00607] 18 clones de anticuerpos madurados con propiedades deseadas y buenos perfiles de revelado se seleccionaron para el diseño (extirpación de los sitios PTM potenciales y de la línea germinal). Las 28 variantes resultantes se produjeron como hIgG1s en la expresión de micro-escala y se caracterizaron como se describió previamente.

[00608]

[00609] El resultado de esta caracterización funcional en combinación con los perfiles resultantes de la evaluación de revelado condujo a la selección de los principales candidatos.

ELISA de detección en antígenos directamente recubiertos

[00610] Usando el rastreo ELISA, los clones Fab individuales se identificaron a partir de los resultados de la selección por afinidad para la unión al antígeno diana. Los fragmentos Fab se sometieron a pruebas Fab que contienen lisados crudos de *E. coli* (ver Sección 2.3.3).

[00611] El rastreo primario se realizó utilizando placas Maxisorp de 384 pocillos recubiertas o/n a 4°C con hBMP6_RD a una concentración de 1.5 µg/mL en 50 mM de buffer citrato pH 4,7.

[00612] El rastreo secundario de los aciertos primarios se realizó utilizando placas de 96 pocillos Maxisorp recubiertas con hBMP6_RD (1.5 µg/mL en 50 mM de buffer citrato pH 4,7), así como placas de 96 pocillos Maxisorb revestidas con hBMP7 (3 µg/ml en 50 mM citrato pH 4,7) para la verificación de la especificidad.

5 [00613] Después del lavado, las placas se bloquearon durante 2 horas con 5% de leche desnatada en PBS. Los lisados de Fab que contenían *E. coli* se añadieron y la unión fue permitida durante 2 h a RT. Para detectar fragmentos Fab unidos las placas se lavaron 5x con TBST y se añadió el anticuerpo AP-anti humano F(ab')₂ en una dilución 1/5000. Después de la incubación de 2 h a RT,
10 las placas se lavaron 5x con TBST y se añadió sustrato AttoPhos de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Las placas se leyeron en un lector de ELISA a 10 minutos después de añadir el sustrato.

Rastreo SET después de la maduración de afinidad

15 [00614] La clasificación por afinidad se llevó a cabo, en principio, como se describe a continuación. Para la clasificación de los aglutinantes madurados por titulación de equilibrio basados en los principios descritos por (Haenel et al., 2005), una cantidad constante de extracto diluido BEL se equilibró durante la noche con diferentes concentraciones de antígeno.

20 [00615] A continuación, la mezcla se transfirió a placas MSD que habían sido recubiertas previamente con antígeno, y después de la incubación y el lavado, se añadió un anticuerpo de detección adecuado etiquetado con un marcador sulfo - MSD.

[00616] Posteriormente, la concentración de Fab no unido se cuantificó a
25 través de detección ECL con el Sector Imager 6000 (Meso Escala Discovery, Gaithersburg, MD, USA).

[00617] Los resultados fueron procesados utilizando un software XLfit (IDBS), aplicando los modelos de ajuste correspondientes (Sección 2.6.2.2) para estimar las afinidades y así identificar los mejores clones perfeccionados por la
30 maduración de afinidad.

Ensayos *In vitro*

Evaluación de la Selectividad y reactividad cruzada por ELISA

5 [00618] Para determinar las especies de reactividad cruzada de los anticuerpos anti-BMP6, proteínas humanas y de ratón BMP6 recombinantes fueron unidas a una placa y la capacidad de los anticuerpos para unirse a las proteínas recombinantes se determinó por ELISA. Para evaluar la selectividad, la unión a homólogos de BMP5 y BMP7 humanas más cercano fue evaluada
10 también.

[00619] Reactivos de antígeno se recubrieron con placas de ELISA por inmovilización directa a 3-5 ug/ml o/n a 4°C. hBMP6 (Peprotech) se diluyó en Tris 50 mM pH 8,0 para el recubrimiento. hBMP6, mBMP6 y hBMP5 (R & D Systems) se diluyeron en buffer 50 mM citrato de pH 4,7. hBMP7 (Peprotech) se diluyó en
15 buffer 50 mM citrato de pH 4,7. Como antígeno no relacionado, hDKK1-His se revistió a 5 ug/ml en PBS.

[00620] Al día siguiente, las soluciones de antígeno se descartaron y las placas se lavaron tres veces con TBST 100 uL. Cada pocillo se bloqueó posteriormente con 100 uL 5% de leche en TBST durante 2 h a RT. En
20 experimentos posteriores, el bloqueo se realizó con 100 uL de buffer de bloqueo Superblock.

[00621] Después de lavar las placas tres veces con TBST 100 uL, cada antígeno se incubó con 40 uL de muestras de Fab o IgG purificada a una concentración de 1 uM y 0,2 uM respectivamente (en buffer PBST).

25 [00622] Después de la incubación de 2 h a RT, las placas se lavaron de nuevo tres veces y los Fabs/IgG unidos fueron detectados mediante la adición de 40 uL de una dilución 1: 5000 de un anticuerpo F (ab₂) conjugado con AP- anti-IgG humana secundario. Después de 1 h a RT, la señal se desarrolló mediante la adición de 40 uL sustrato AttoPhos acuerdo con el protocolo del proveedor y las
30 placas se analizaron inmediatamente usando una longitud de onda de excitación

de 430 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm con un lector de placas ELISA.

Evaluación de la afinidad

5 Curvas de unión ELISA

[00623] El antígeno hBMP6 (Peprotech) fue revestido en placas ELISA por inmovilización directa a 1,5 ug/ml en buffer Tris 50 mM pH 8,0 y se incubo o/n a 4°C. El día siguiente, solución de antígeno se descartó y las placas se lavaron tres veces con 100 uL TBST. Cada pocillo se bloqueó con 100 uL de leche en TBST
10 5% durante 2 h a RT. En experimentos posteriores, el bloqueo se realizó con 100 uL de buffer de bloqueo Superblock.

[00624] Después de lavar las placas tres veces con 100 uL TBST, el antígeno se incubó con 30 uL de diluciones seradas de muestras purificadas de Fab o IgG, a partir de 1 uM a 0,03 nM en PBST para los Fab, a partir de 0,5 uM a 0,01 nM en
15 PBST para la IgG.

[00625] Después de la incubación de 2 h a RT, las placas se lavaron de nuevo tres veces y los conjugados Fabs/IgG fueron detectados mediante la adición de 30 uL de una dilución 1: 5000 de un anticuerpo F (Ab2) IgG anti-humano conjugado con AP secundario. Después de 1 h a RT, la señal se
20 desarrolló mediante la adición de 30 uL de sustrato AttoPhos acuerdo con el protocolo del Proveedor y las placas se analizaron inmediatamente usando una longitud de onda de excitación de 430 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm con un lector de placas de ELISA.

25 Método de titulación de equilibrio de la solución (SET) para la determinación de K_D usando Sector Imager 6000 (MSD)

[00626] La determinación de afinidad en solución se realizó básicamente como se describe en la literatura (Friquet et al., 1985). Con el fin de mejorar la sensibilidad y la precisión del método SET, este fue transferido de la ELISA clásica a la tecnología basada en ECL (Haenel et al., 2005).

[00627] 1 mg/mL de fragmentos específicos de anticuerpos IgG (Fab)₂ de cabra anti-humano se marcaron con MSD sulfo-TAGTH NHS-Ester (Meso Escala de Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

[00628] Los experimentos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de polipropileno y PBS que contienen BSA 0,5% (w/v) y Tween 20 0,02% (v/v) como buffer de ensayo. Antígeno sin marcar se diluyó en una serie 2n, comenzando con una concentración al menos 10 veces más alta que la K_D esperada. Pocillos sin antígeno se utilizaron para determinar los valores B_{max}; Los pozos que contienen sólo buffer de ensayo se utilizaron para determinar el fondo. Después de la adición de la cantidad apropiada de aglutinante (concentración de anticuerpo similar o por debajo del K_D esperado, con 60 µL de volumen final), la mezcla se incubó durante la noche a RT.

[00629] Las placas MSD se revistieron con antígeno (30 µL por pocillo). Después de lavar la placa con PBS que contenía Tween 20 0,05% (v/v), las muestras equilibradas fueron transferidas a esas placas (30 µl por pocillo) y se incubaron durante 20 min. Después del lavado, se añadió 30 µl por pocillo del anticuerpo de detección marcado MSD-sulfo-tag ((Fab)₂ anti-humano, dilución final típicamente 1: 2.000) a la placa de MSD y se incubó durante 30 min a RT en un agitador Eppendorf (700 rpm).

[00630] Después de lavar la placa de MSD y adicionar 30 µL/pocillo las señales de electroquimioluminiscencia de MSD Leer Buffer T con surfactante, se detectaron utilizando un Imager Sector 6000 (Meso Escala Descubrimiento, Gaithersburg, MD, EE.UU.).

[00631] Los datos se evaluaron con XLfit software (IDBS) aplicando el ajuste de modelos personalizados. Para la determinación de K_D de las moléculas de Fab el siguiente modelo de ajuste fue utilizado (de acuerdo con (Haenel et al, 2005), modificado de acuerdo a (Abraham et al, 1996)):

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

[Fab]_t: concentración de Fab total aplicada

x: concentración de antígeno soluble total aplicada (sitios de unión)

B_{max}: Señal máxima de Fab sin antígeno

K_D: afinidad

- 5 [00632] Para la determinación de K_D de las moléculas de IgG se utilizó el siguiente modelo de ajuste (modificada de acuerdo con (Piehler et al., 1997)):

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

[IgG]: concentración total de IgG aplicada

- 10 x: concentración de antígeno soluble total aplicado (sitios de unión)

B_{max}: Señal máxima de IgG sin antígeno

K_D: afinidad

Ajustes experimentales:

- 15 [00633] La determinación de K_D de los Fab se realizó básicamente de la siguiente manera: se recubrieron placas MSD o/n a 4°C con 10 uL por pocillo de hBMP6 al 1 - 3 ug/ml en buffer Tris 10 mM pH 8. Posteriormente, las placas fueron bloqueadas durante 1 h con PBS que contenía BSA 5%. El antígeno hBMP6 se utilizó para la titulación de fragmentos Fab libres. La solución antigénica de
20 almacenamiento fué pre-diluida 1:40 en 10 mM Tris pH 8,0 a 475 nM antes de ajustar con buffer de ensayo a la concentración de partida destinada a la titulación.

Medición ForteBio Octeto Cinética

[00634] Evaluaciones de afinidad mediante la determinación de parámetros cinéticos fueron realizadas a través de la tecnología de Interferometría Bio-Layer.

- 25 [00635] Se midieron muestras purificadas de Fab utilizando estreptavidina Dip y biosensores de lectura. La placa se colocó en un instrumento Octet QK

(ForteBio) y se dejó equilibrar a 25 ° C en la cámara termostatzada. La lectura se inició mediante la colocación de los sensores en los pocillos que contienen 15 ug/ml de antígeno hBMP6 biotinilado durante 600 s. Los sensores se colocaron en los pocillos que contienen ya sea 0, 200, 400, 800, 1.600 nM de muestra de Fab purificado. Una concentración de 0 nM de Fab se utilizó para la determinación de la señal inespecífica. Las asociaciones y disociaciones de Fab fueron registradas cada una midiendo el cambio de espesor de la capa (en nanómetros, nm) con un tiempo de 800 s cada una, todo bajo control de una computadora. Los datos se procesaron automáticamente utilizando el usuario del Software Octet versión 3.0.

10

Medición de la cinética Biacore

[00636] Las mediciones se realizaron con las muestras purificadas Fab y IgGs y los antígenos BMP6 y BMP7 humanos.

15 Preclasificación de epítipo por ELISA

[00637] La preclasificación de epítipo por ELISA de competición se llevó a cabo para clasificar los anticuerpos en grupos de epítipos superpuestos idénticos o significativamente, es decir, anticuerpos que fueran capaces de inhibir la unión del otro.

20 [00638] IgG Anti-BMP6 se recubrieron en una placa de 384 pocillos Maxisorp con 20 uL a 66 nM en PBS. La placa se incubó o/n a 4°C. Después de lavar dos veces con TBST, la placa se bloqueó con 100 uL por pocillo de buffer de bloqueo Superblock durante 2,5 h a RT, luego se lavó dos veces con TBST.

[00639] Durante el bloqueo de la placa, el hBMP6 Peprotech a 66 nM en PBST se mezcló previamente con Fabs anti-BMP6 purificados (marcados con Flag-His) a 300 nM en PBST en tubos Eppendorf (se mencionan concentraciones finales en la mezcla). Después de la incubación de 2 h a RT, 20 uL de los hBMP6/Fab pre-mezclados se añadieron a los pocillos recubiertos con IgG anti-

25

BMP6 bloqueadas, de acuerdo con la disposición de la placa y se incubó durante 20 min a RT máxima.

[00640] La placa se lavó cuatro veces con TBST y conjugados de anticuerpo anti-His6-POD diluido 1/1000 en PBST se añadieron a la placa. Después de la incubación de 1 h a RT, la placa se lavó 5 veces con TBST. Una solución de sustrato quimioluminiscente ELISA se añadió a cada pocillo, y se leyó la luminiscencia sin tiempo de incubación usando un lector de placas Tecan.

Potencia *in Vitro* en ensayo de gen reportero (RGA)

10 [00641] Los clones de anticuerpos se evaluaron en el ensayo de gen reportero (RGA) como fragmentos Fab purificados y/o muestras IgGs.

[00642] Brevemente, la línea celular de hepatoma HEP3B fue transfectada establemente con el vector lentiviral pGL4-BRE2-Luc2, que contenía un elemento BRE sensible a BMP en el promotor responsable de luciferasa de luciérnaga. Las proteínas BMP de los sistemas R&D se utilizaron para inducir la señalización. El ensayo BrightGlo se hizo 24h después del tratamiento.

Evaluación de la actividad fuera de objetivo

20 [00643] EP Progen UNlchip® AV-VAR contiene 384 proteínas extracelulares o secretoras purificadas expresadas como una proteína de fusión en *E. coli* His-etiquetadas en el N-terminal.

[00644] Después de la incubación con anticuerpos anti-hBMP6 a 5 ug/ml, los anticuerpos unidos se detectan mediante el uso de un fragmento de anticuerpo específico conjugado DyLight649 F(ab')₂ de cabra anti hIgG F(ab')₂.

25 [00645] La señal de control interno hIgG fijada al 100%; La actividad fuera del objetivo se normalizó a hIgG; un acierto se considera como positivo cuando la señal es igual o superior al 4% (la línea de corte corresponde a m + 3s medidos en la señal inespecífica).

30 **La eficacia *In vivo* en modelo de ratón**

[00646] Los anticuerpos purificados 5, 6 y 7 han sido probados en un modelo de ratón ESA anemia resistente.

5 Resultados

Caracterización de Anticuerpos Anti-BMP6

Evaluación Especificidad de IgG diseñados

[00647] Los 28 IgG anti-hBMP6 diseñados (de la línea germinal y con PTM removido) se produjeron en micro-escala y fueron probados en ELISA de especificidad a una concentración de 0,2 uM.

[00648] Las variantes diseñadas que retuvieron una reactividad cruzada limitada a otras proteínas BMP y una fuerte afinidad para hBMP6 en comparación con el clon madurado no diseñado fueron seleccionadas para la caracterización adicional.

- 15 • Todas las variantes IgG diseñadas NOV0429 mostraron un aumento en la unión a BSA altamente inespecífico.
- Variantes IgG diseñadas NOV0441 mostraron un ligero aumento de reactividad cruzada a hBMP5 en comparación con sus parentales madurados.
- 20 • Variantes IgG diseñadas NOV0442 retuvieron su reactividad cruzada limitada a hBMP7 y hBMP5.

Tabla 0. ELISA de Especificidad de clones de anticuerpo IgG diseñados; **están resaltadas en gris los 3 anticuerpos principales**

ID de las IgG diseñadas	IgG (0,2 uM) ELISA de especificidad: La señal sobre la señal inespecífica				
	hBMP6	mBMP6_RD	hBMP7	hBMP5_RD	BSA
NOV0429	60	20	3	12	2
NOV0939	65	43	41	70	24
NOV0940	63	47	43	71	26
NOV0941	63	45	29	63	15

NOV0942	70	47	24	64	12
NOV0441	70	27	3	5	1
NOV0943	68	26	2	7	1
NOV0944	68	27	3	6	6
NOV0945	68	30	4	10	4
NOV0946	65	31	7	21	1
NOV0947	65	37	17	52	7
NOV0442	46	7	2	2	1
NOV0442_VL [YGS]	42	10	2	4	1
NOV0442_VL [YGQ]	42	8	2	2	1
NOV0959	52	17	5	2	1
NOV0948	55	16	11	1	1
NOV0960	57	16	8	5	1
NOV0949	56	18	15	2	1
NOV0963	56	21	4	1	1
NOV0950	65	19	11	2	1
NOV0951	65	24	8	6	1
NOV0964	61	20	4	2	1
NOV0952	72	25	9	2	1
NOV0965	30	23	2	2	1
NOV0953	39	20	4	3	1
NOV0954	38	29	3	2	1
NOV0961	48	29	2	1	1
NOV0955	40	33	3	2	1
NOV0966	55	32	3	1	1
NOV0956	49	38	8	3	1
NOV0962	53	31	2	2	1
NOV0957	48	30	6	2	1
NOV0958	59	32	7	1	1
Control de IgG	61	18	14	4	1

La actividad en ensayo del gen repotero (RGA)

[00649] Los 28 IgG diseñados anti-hBMP6 producidos en micro-escala (de la línea germinal y con PTM removido) se pusieron a prueba, como se ha descrito antes. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

- Las variantes de IgG diseñadas NOV0429 mostraron de 3 a 5 veces mejor actividad BMP6, pero a cambio ganaron actividad agonística con el resto todas las demás BMP.
- Las variantes de IgG diseñadas NOV0441 ganaron algo de reactividad cruzada con las otras tres BMPs.
- Las variantes de IgG diseñadas NOV0442 mostraron una mejoría de la actividad BMP, pero también mostraron alguna inhibición del sistema inducido por BMP7 a la mayor concentración de 25 ug/ml.

Tabla 3. Actividad de los clones de anticuerpo IgG diseñados en RGA; **Los valores de IC50 están en [ug/ml]. NOV0951, NOV0954 y NOV0958 fueron seleccionados como los anticuerpos principales.**

IgG ID	BMP6			BMP7			BMP5			BMP2		
	min	max	IC50	min	max	IC50	min	max	IC50	min	max	IC50
NOV0429	0.03	1.0	0.9	0.8	1.2	> 25	0.9	1.1	> 25	0.8	1.1	> 25
NOV0939	0.02	0.9	0.3	1.0	1.9	8	1.0	15	5	1.0	1.2	> 25
NOV0940	0.01	0.9	0.3	1.0	1.9	7	0.9	15	5	0.9	1.2	> 25
NOV0941	0.02	0.9	0.2	1.0	1.7	6	0.9	15	4	1.1	1.3	> 25
NOV0942	0.02	1.0	0.2	1.0	1.7	> 25	0.2	1.0	20	1.0	1.1	> 25
NOV0441	0.02	1.0	0.6	0.9	1.1	> 25	1.0	1.1	> 25	1.0	0.9	> 25
NOV0943	0.02	1.0	0.1	0.4	1.3	25	0.2	1.0	15	0.5	1.0	25
NOV0944	0.01	1.0	0.6	0.5	1.1	25	0.5	1.0	25	0.6	0.9	> 25
NOV0945	0.01	1.0	0.2	0.4	1.1	25	0.4	1.0	25	0.5	0.9	22
NOV0946	0.01	1.0	0.2	0.4	1.2	25	0.5	1.0	25	0.7	0.9	> 25
NOV0947	0.10	0.9	0.3	0.9	0.9	> 25	0.6	1.0	> 25	0.9	1.6	> 25
NOV0442	0.02	1.0	0.24	0.8	1.0	> 25	1.0	1.1	> 25	0.8	0.9	> 25
NOV0948	0.03	1.0	0.06	0.2	1.0	5	1.0	0.9	> 25	1.0	1.1	> 25
NOV0949	0.02	0.9	0.05	0.2	0.9	25	1.0	1.0	> 25	0.9	0.9	> 25
NOV0950	0.03	0.9	0.04	0.2	1.0	9	1.1	1.0	> 25	0.9	0.9	> 25
NOV0951	0.02	0.9	0.04	0.5	1.0	25	1.1	1.0	> 25	0.9	1.0	> 25
NOV0952	0.02	1.0	0.05	0.3	1.0	10	1.1	1.0	> 25	0.8	0.8	> 25
NOV0953	0.02	1.0	0.05	0.5	1.0	15	1.1	1.0	> 25	0.9	1.0	> 25
NOV0954	0.02	1.0	0.05	0.5	0.9	25	0.9	1.0	> 25	1.0	1.0	> 25
NOV0955	0.03	0.9	0.04	0.4	0.9	25	1.0	1.1	> 25	0.9	0.9	> 25
NOV0956	0.02	0.9	0.05	0.5	0.9	25	1.0	1.0	> 25	0.9	1.0	> 25

NOV0957	0.03	0.9	0.08	0.4	0.9	12	1.0	1.0	> 25	0.9	0.9	> 25
NOV0958	0.02	0.9	0.04	0.5	0.9	25	1.1	1.1	> 25	1.1	0.9	> 25
NOV0959	0.02	1.0	0.20	0.5	0.9	25	0.8	0.9	> 25	0.9	0.9	> 25
NOV0960	0.01	0.9	0.07	0.5	1.0	25	0.8	1.0	> 25	0.8	1.2	> 25
NOV0961	0.02	0.9	0.08	0.8	1.0	> 25	0.8	0.9	> 25	0.8	1.0	> 25
NOV0962	0.01	0.9	0.26	0.7	1.0	> 25	0.9	1.0	> 25	0.8	1.0	> 25
NOV0963	0.02	0.8	0.11	0.6	0.9	> 25	0.8	1.1	> 25	0.8	1.0	> 25
NOV0964	0.02	1.0	0.09	0.5	1.1	> 25	0.7	1.0	> 25	0.8	0.9	> 25
NOV0965	0.02	1.0	0.11	0.8	1.1	> 25	1.0	1.2	> 25	0.8	0.9	> 25
NOV0966	0.02	0.9	0.10	0.6	1.1	> 25	0.9	1.2	> 25	0.9	0.9	> 25

Evaluación de la capacidad de revelado S-DAS 3

[00650] Después de la generación de la línea terminal y la remoción de PTM, las 23 variantes diseñadas de 18 clones maduros anti-hBMP6 fueron sometidas a una tercera evaluación de la capacidad de revelado.

- 5 [00651] Se encontró que los anticuerpos tenían un riesgo favorable de perfiles de revelado, a excepción de 2 clones que mostraron alto riesgo debido a un alto nivel de agregación (NOV0942 un derivado de HCDR2 de NOV0429; NOV0944 un derivado de LCDR3 de NOV0441).

- 10 [00652] Otros 2 clones fueron marcados con un perfil de riesgo medio a causa de su bajo título de productividad (NOV0957 y NOV0960, derivados de HCDR2 del anticuerpo parental NOV0442).

Tabla 4. Resumen S -DAS 3 de los anticuerpos anti-BMP6 (23 hlgG1s diseñados); NOV0951, NOV0954 y NOV0958 fueron seleccionados como los anticuerpos principales.

Nov ID	Advertencia del grupo S-DAS crítica	Sitios PTM recomendados para ser	Riesgo principal	Agregado	Productividad	Factor de riesgo acumulado	pI (predicción in-silico)	Tm (°C, pH 7.4, datos igG)	Hidrofobicidad (M(NH ₄) ₂ SO ₄ , Hi)	Comentarios finales
NOV936	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.4	77.0	0.87	
NOV937	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.4	76.8	0.82	
NOV938	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.4	77.0	0.86	
NOV942	!	no	alto	alto	bajo	bajo	9.5	78.8	0.88	Alta tendencia a agregarse
NOV943(respaldo)	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.3	71.0	0.97	
NOV944	!	no	alto	alto	bajo	bajo	9.2	69.0	0.78	Alta tendencia a agregarse
NOV945 (respaldo)	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.3	69.3	0.78	
NOV946(respaldo)	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.2	66.5	0.97	
NOV951(principal)	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.4	65.0	1.03	
NOV953	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.4	61.5	1.00	
NOV954(principal)	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.3	62.8	1.01	
NOV955	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.4	66.8	1.05	
NOV956	-	no	bajo	bajo	bajo	bajo	9.4	65.0	1.03	
NOV957	!	no	moderado	bajo	moderado	bajo	9.4	64.5	0.88	El título puede no ser relevante puede ser repetido de ser

<8,2; indica un cierto riesgo; agregación/problemas de formulación pueden surgir

Tm(pH 7,4)

≥68°C

<68°C; indica un cierto riesgo para estabilidad; agregación/problemas de formulación pueden surgir

Hidrofobicidad

≥ 0,8 M (NH₄)₂ SO₄

< 0,8 M (NH₄)₂ SO₄; indica un cierto riesgo para agregación/problemas de formulación pueden surgir, alta viscosidad, precipitación

10 Evaluación de la actividad fuera de objetivo

[00653] Los 3 candidatos principales NOV0951, NOV0954 y NOV0958 se evaluaron como hlgG1s purificadas para la unión fuera del objetivo en un UNlchip Protagen recubierto con 384 proteínas extracelulares o secretoras purificadas descritas anteriormente. Todos ellas mostraron una baja actividad fuera del objetivo (≤ 10 aciertos) los cuales pueden ser considerados como no problemáticos.

Tabla 5. Resumen de los resultados de los microarreglos de proteínas para los 3 anticuerpos principales.

	Código de barras	1006	1007	1013
	Anticuerpo	Ab 5	Ab 6	Ab 7
Proteína	Numero gi			
Proteína LARP	gi21707496	4	4	3
Colageno XVIII	Gi17226298	4	5	2
Proteina 2810468K05Rik *	Gi16741397	3	4	3
Rab40c;miembro de la familia de oncogen RAS; RAR (GTPASA como RAS) caja SOCS que contiene la proteína RAR3*	Gi 21040231	5	5	3
Cromosoma 4 abierto leyendo el marco 14	Gi13436155	3	4	1

Proteína de dominio interactor de homología a Pleckstrina	Gi34996489	3	5	2
Proteína PTPRM	Gi30353785	5	6	3
Proteína quinasa B ribosomal (RSK-B)	Gi3452409	5	5	4
Proteína 5 asociada al receptor de la de la hormona tiroidea; componente del complejo proteínico asociado al receptor de la hormona tiroidea; subunidad 95-KD	Gi38146094	5	7	4
BM-017	Gi7582306	4	4	2
IGM Humano	Gi186200	8	3	6
Actividad fuera del objetivo (corte 4%) (*)		8	10	3

(*):Actividad por fuera del objetivo normalizada a hslgG(=100%)

 Aciertos positivos resaltados en gris

Selección de anticuerpos principales y de respaldo

- 5 [00654] Basándose en los datos de la unión de las proteínas, así como los datos la actividad y especificidad en RGA, tanto como en la evaluación de revelado, se decidió seleccionar a los candidatos de diseño NOV0951, NOV0954, NOV0958 como anticuerpos principales. Además, todos ellos mostraron una ventana superior de especificidad para hBMP6 en comparación con el anticuerpo
- 10 676. Los anticuerpos candidatos diseñados NOV0961, NOV0943, NOV0945 fueron considerados como anticuerpos de respaldo. La tabla 6 resume el árbol genealógico de los candidatos finales.

Tabla 6. Árbol genealógico de los anticuerpos principales y de respaldo seleccionados anti-hBMP6

ID Parental (marco lectura)	Clon de	eliminación de PTM y reparación de Marco	ID Clon de Madurado (CDR madurado)	ID del Clon de la Línea germinal	Número
NOV0442 (VH3, VL1)	NOV0442_VL [Y49, N51Q] G50,		NOV0787 (HCDR2)	NOV0951	Anticuerpo 5
			NOV0798 (HCDR2)	NOV0954	Anticuerpo 6
			NOV0806 (HCDR2)	NOV0958	Anticuerpo 7
	NOV0442_VL [Y49, N51S] G50,		NOV0800 (HCDR2)	NOV0961	Anticuerpo 3
NOV0441 (VH3, VL3)	No aplica		NOV0766 (LCDR3)	NOV0943	LSR434
			NOV0770 (LCDR3)	NOV0945	LSR435
			NOV0763 (HCDR2)	NOV0946	LSR439

Conclusión y Discusión

[00655] Uno de los objetivos de este proyecto era revelar anticuerpos que inhiben la señalización de BMP6 y por lo tanto son adecuados para el tratamiento de la anemia de la enfermedad crónica.

- 5 [00656] Por lo tanto, se aplicaron 3 diferentes estrategias de selección por afinidad a base de proteínas. Los aciertos primarios ELISA se encontraron principalmente en pools de selección por afinidad en fase sólida, sin embargo, después de una prueba de actividad en RGA, 12 anticuerpos mostraron inhibir la señalización hBMP6. 3 clones de anticuerpos (NOV0429, NOV0441 y NOV0442)
- 10 derivados de la técnica de selección por afinidad subcódigo 2.023,5 mostraron actividad específica para BMP6 y buenas propiedades de revelado, y por lo tanto fueron seleccionados para la maduración de afinidad.

- [00657] 2 bibliotecas se generaron para cada clon de anticuerpo, ya sea con LCDR3 o HCDR2 aleatorizados. Se aplicaron 3 diferentes estrategias de técnicas
- 15 de selección por afinidad de maduración. Después de la selección SET, un ELISA

de especificidad y una secuenciación, 18 clones de anticuerpos madurados mostraron inhibir específicamente la señalización BMP6 en RGA y se seleccionaron para el diseño.

[00658] Los clones maduros procedentes de la familia de NOV0442 fueron sometidos a la eliminación de un sitio potencial de desamidación en LCDR2, reparación de marco y generación de la línea germinal. Esto dio lugar a los anticuerpos NOV0951, NOV0954, NOV0958 y NOV0961 que mostraron tener propiedades de unión similares a sus respectivos parentales madurados no mutantes.

[00659] Los clones maduros procedentes de la familia de NOV0441 fueron sometidos a la generación de la línea germinal, lo que dio lugar a los anticuerpos NOV0943, NOV0945 NOV0946, que demostraron tener una mayor reactividad cruzada con BMP5 en comparación con sus respectivos parentales madurados no mutantes.

[00660] Basándose en su capacidad para inhibir la señalización de BMP6 con reactividad cruzada limitada a otras proteínas BMP y su perfil de capacidad de revelado favorable, NOV0951, NOV0954 y NOV0958 fueron producidas en cantidades más altas y fueron tomadas para evaluar aún más su utilidad como un fármaco terapéutico EPO-resistente en anemia por (deficiencia de hierro). Un modelo de ratón de anemia resistente a ESA se utilizó para determinar su eficacia *in vivo*.

[00661] Los 3 anticuerpos principales NOV0951, NOV0954 y NOV0958 fueron sometidos a una evaluación final de revelado. La aptitud *in vivo* de los 3 anticuerpos principales se evaluó mediante la determinación de sus perfiles farmacocinéticos en ratas.

[00662] La Tabla 7 resume las propiedades de los candidatos finales principales que cumplieron con los requerimientos de los anticuerpos definidos al comienzo del proyecto.

Tabla 7. Propiedades de los anticuerpos principales seleccionados anti-hBMP6

Característica	Criterios de CSP	Anticuerpos principales
----------------	------------------	-------------------------

Afinidad de unión	$K_D < 1 \text{ nM}$ a hBMP6 por Biacore.	Anticuerpo 5, Anticuerpo 6, anticuerpo 7 – $\approx 0.1 \text{ nM}$
Especificidad	> Selectividad 30 veces mayor en la inhibición de la hBMP6 sobre la actividad hBMP7 en ensayo celular (RGA).	Todos los criterios reunidos Abs $\approx 1000\times$ selectividad a RGA Actividad no discernible (detectable) contra BMP2 o 5
Actividad in vitro	Neutraliza hBMP6 en BRE-Luc RGA con $IC_{50} < 10 \text{ nM}$.	Anticuerpo 5– 0.26 nM Anticuerpo 6– 0.30 nM Anticuerpo 7– 0.26 nM
Actividad in vivo	En un modelo de anemia EPO-resistente de inflamación, el tratamiento terapéutico: restaura la respuesta EPO. acelera significativamente la recuperación de la hemoglobina (HGB) o el hematocrito (HCT).	Para el anticuerpo 5, 6 y 7, una sola administración de 2 mg/kg restaura la respuesta EPO y consigue el incremento de HGB $\geq 2.0 \text{ g/dL}$ en 1 semana.
Evaluación de revelado	DAS final completada con éxito	Anticuerpo 5 y anticuerpo 7, cumplen con los criterios de revelado Anticuerpo 6 no revelable debido a la inestabilidad de suero cyno

Ejemplo 2-actividad In vitro e in vivo, y PK/PD de anticuerpos anti-BMP6

Materiales

- 5 [00663] Los compuestos de ensayo eran los anticuerpos 5, 6 y 7 (Tabla 8), a una concentración de $\sim 8 \text{ mg/ml}$ en buffer citrato 50 mM , pH 7,0, NaCl 150 mM y

se diluyeron en PBS antes de la administración animal. Ratones macho C56BL/6 o ratas Sprague Dawley fueron utilizados (Tabla 9).

Tabla 8. Propiedades de anticuerpos antagonistas BMP6

Anticuerpo ID	Marco de referencia	KD (nM) BMP6	Reportero IC50 (ug/ml) BMP6
ANTICUERPO 5	VH3_15, VL1	0.1	0.06
ANTICUERPO 6	VH3_15, VL1	<0,1	0.08
ANTICUERPO 7	VH3_15, VL1	0.1	0.07

Tabla 9. Características de los animales

Especies	Tensión	Categoría	Vendedor	Género	Años
Ratón (Mus musculus)	C57BL/6	tipo salvaje	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME	Masculino	8-9 semanas
Rata (Rattus norvegicus)	Sprague Dawley	tipo salvaje	Charles River Laboratory, Wilmington, MA	Masculino	8-12 semanas

5 [00664] Para ensayos de gen reportero BMP, un vector lentiviral se construyó conteniendo un elemento BRE sensible a BMP en el promotor [Korchynskyi et al. 2002. J. Biol. Chem. 277: 4882-91] conductor de luciferasa de luciérnaga derivado de pGL4-BRE2-Luc2. El vector lentiviral se utilizó para transfectar de forma estable la línea celular HEP3B de hepatoma. La línea celular se mantuvo en
 10 EMEM con 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, y 5 ug/ml Blastidicin. Proteínas BMP humanas recombinantes se adquirieron de R & D Systems.

[00665] Antígenos Brucella abortus prueba Anillo (cepa 1119-3) en 60 ml botellas fueron adquiridos del Departamento de Agricultura, Servicio de Inspección
 15 de Sanidad Vegetal, laboratorios de Servicios Veterinarios Nacionales, Ames, Iowa Estados Unidos. El antígeno de prueba del anillo Brucelosis contiene una

suspensión de células B. abortus de la cepa 1119-3 muertas teñidas en buffer con fenol. La concentración de cada botella de 60 ml es de aproximadamente 10^9 partículas/ml. A 5×10^9 , el Stock se lava y se prepara de la siguiente manera. En primer lugar, las botellas de 60 ml se retiran del refrigerador y se mezclan completamente. 500 ml de BA se transfieren luego en una botella de 500 ml de centrífuga. Estos son entonces centrifugados en 10.000 rpm durante 15 minutos utilizando una ultracentrífuga. Se elimina el sobrenadante y se vuelve a suspender en 100 ml de PBS, dando como resultado un 5×10^9 partículas/ml, que se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C .

10 **Condiciones de mantenimiento de los animales**

[00666] Los animales fueron alojados socialmente en jaulas de fondo sólido micro-aisladoras durante los períodos de aclimatación y de estudio. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz estándar de la siguiente manera: 12 horas de oscuridad, de 12 horas de luz (luces encendidas: 6:30 AM, luces apagadas: 6:30 PM) con temperatura ambiente $21 - 23^\circ \text{C}$ y una humedad del 30 – 70%. Durante los períodos de aclimatación y de estudio, los animales se les dio acceso a las dietas de roedores y agua ad libitum (a voluntad).

Condiciones experimentales

20 **Determinación de la actividad de anticuerpos en el ensayo de gen informador BMP**

[00667] En un ensayo típico, $0,6 \times 10^4$ células BRE-Luc2 Hep3B se sembraron en placas de 384 pocillos en 25 ul de medio de cultivo básico, excepto que el suero se redujo a 2%. Al día siguiente los anticuerpos diluidos en PBS se añadieron, seguido por la adición de BMP6 a una concentración final de 10 ng/ml. El volumen se llevó a 50 ul con los medios de EMEM sin suero, por lo que la concentración final del suero fue del 1%. Como ensayo de oposición, la activación con BMP2/4/7 se hizo en paralelo. Ensayo BrighGlo (Promega) se realizó 24 horas después de la adición de anticuerpo de acuerdo con la instrucción Proveedor, usando un lector de placas Envision (PerkinElmer). Los datos se

calculan como porcentaje de inhibición para cada anticuerpo en comparación con la activación completa del reportero por un anticuerpo de control.

Estudio de la farmacocinética de los anticuerpos de dosis única en ratas

[00668] El estudio de la clasificación de PK de rata no está destinado a determinar los parámetros farmacocinéticos clásicos con una certeza estadística definida, sino más bien para proporcionar una estimación de la vida media en suero para el anticuerpo de ensayo. 3 animales fueron inyectados con una sola dosis IV del anticuerpo.

[00669] Para el estudio dosis-respuesta de la PK/PD de ratón, los animales se dividieron en 2 cohortes separadas de igual número. Cada cohorte incluye tanto los ratones transportadores como aquellos tratados con el compuesto. Una cohorte se sometió para análisis en los días 2, 4 mientras que la segunda cohorte se analizó en los días 6, 8 después de la inyección de anticuerpos. La razón para la separación de cohortes es reducir la necesidad de sangrado en serie de manera que el impacto sobre los parámetros de hierro en suero se mantenga mínima. Los grupos de animales se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Diseño, asignación de los animales y dosis objeto de prueba

Experimento	Grupo	Número	Dosis (mg/kg, IV)	Frecuencia
Ratón PK/PD	Control de hlgG	5	0.5	Una vez
	0.05 mpk ANTICUERPO 6	5	0.05	Una vez
	0.1 mpk ANTICUERPO 6	5	0.1	Una vez
	0.5 mpk ANTICUERPO 6	5	0.5	Una vez
Anemia ratón BA	Sham (No BA)	6	0	0
	BA, hlgG control de EPO +	6	2	Una vez
	BA, EPO + ANTICUERPO 5	6	2	Una vez

	BA, EPO + ANTICUERPO 6	7	2	Una vez
	BA, EPO + ANTICUERPO 7	6	2	Una vez

Establecimiento de la anemia inflamatoria en ratones y tratamiento terapéutico

[00670] 5 X 10⁸ partículas BA para inyección se preparan de la siguiente manera (ejemplo para 10 ratones). La concentración de partida debe ser de 2,5 X 10⁹ partículas/ml ya que se inyectará 200 µl/ratón. Un stock debe ser diluido 2 veces utilizando PBS. Por ejemplo, se necesitan 10 veces 0.200 µl = 2 ml + 20% = 2,2 ml excedente de 2,5 X 10⁹ partículas/ml en ratones. 1,1 ml BA stock + 1,1 ml de PBS. La administración de BA de 1 a 8 días antes del tratamiento de la ESA ha demostrado resultar en una respuesta mitigadora de HGB de 6 a 7 días más tarde.

[00671] Ratones C57BL/6 fueron inyectados con BA (3 X 10⁸ partículas/ratón) y los niveles de IL6 en suero se midieron 5 horas más tarde por ELISA (KMC0061, Life Technologies) para determinar la respuesta inflamatoria. Los animales con una concentración IL6 menor que el intervalo de confianza 95% del promedio para todos los animales tratados con BA fueron excluidos del estudio, lo que resulta en menos de 5-6 ratones en algunos grupos. Este proceso de exclusión se llevó a cabo para disminuir la posibilidad de resultados falsos positivos producidos mediante la inclusión de los animales que no tienen la inflamación suficiente para atenuar la respuesta de la ESA. Después del proceso de exclusión, los ratones fueron inyectados IV con los anticuerpos como se indica en día 6, y EPO (100 g/kg subcutánea darbepoetina alfa, Amgen) se administró a 100 mg/kg en el día 7 relativo al tratamiento BA. La respuesta a ESA y al tratamiento con el anticuerpo se midió 6 días más tarde.

Los análisis de farmacocinética, farmacodinámica y variables de eficacia

[00672] Para estudios de PK/PD en ratones y ratas, se recogieron muestras de suero en los puntos de tiempo indicados después de la inyección de anticuerpos. Las alícuotas de los sueros se utilizaron para determinar la

concentración de anticuerpos en circulación a través del sistema automatizado de alto rendimiento de inmunoensayo (Gyros) con IgG anti-humana biotinilada como anticuerpo de captura primaria. Una segunda alícuota de suero de cada muestra se utilizó para el ensayo colorimétrico de hierro cuantitativo (Quntichrom, DIFE-250, Bioassay Systems). Una tercera alícuota se procesó para la cuantificación LC-MS del péptido hepcidina-25 de rata o de ratón, siguiendo un procedimiento modificado descrito anteriormente. Li et al. 2009. J. Pharm. Tox. Meth. 59: 171-80.

[00673] Para el estudio del tratamiento anticuerpo y la anemia inducida por BA, un sangrado final en tubos BD Microtainer fueron recubiertos con EDTA se obtuvieron en la terminación a través de punción cardíaca. Toda la sangre se utilizó para análisis de conteo sanguíneo completo sobre un analizador de hematología XT-2000iV. Las variables de eficacia incluyen HGB, HCT, RETA, y RET-HE.

Análisis estadístico

[00674] Analisis de varianza a una via (ANOVA) seguido de la prueba Bonferroni post hoc se llevó a cabo para analizar diferencias entre los grupos ($p < 0,05$ considerandose significativo) en los parámetros hematológicos. Los datos se presentan como promedios $\pm$ SEM.

Resultados

La actividad biológica de anticuerpos antagonistas BMP6 en ensayos de transcripción celular es dependientes de BMP

[00675] Todos los tres anticuerpos antagonistas BMP6 5, 6 y 7 inhiben completamente la bioactividad de la actividad del reportero BMP (BRE-luc) recombinante humano inducido por BMP6 en la línea celular humana de hepatoma Hep3B ($IC_{50} = 0,4$ nM contra $0,3$ nM rhBMP6) y por lo tanto es activo a una relación molar 1: 1 Ag/mAb o mejor. Los anticuerpos demostraron una buena selectividad sobre la familia de proteínas relacionadas con BMP incluyendo BMP2, 5, y 7, con una ventana de 500 veces o más. Ver Fig. 1.

Instantáneas de los perfiles de farmacocinética y farmacodinámica de anticuerpos antagonistas BMP6 en ratas

[00676] Estudio de la farmacocinética de una sola dosis en ratas Sprague Dawley se llevó a cabo para los anticuerpos BMP6 5, 6 y 7, a través de la inyección IV a través de catéter de la vena Jagular con 10 mg/kg de peso corporal. La comparación de la relación de la totalidad de la concentración anticuerpo-tiempo (en particular $t_{1/2}$, MRT) en el suero de los tres anticuerpos con unas características sugeridas de perfil estándar consistentes con una IgG humana típica (véase la Fig. 2 y la Tabla 11). No hay evidencia de la disposición de fármacos mediados por diana. A esta dosis, todos los anticuerpos BMP6 suprimidos de hepcidina sérica pasan por debajo de los niveles de detección durante el día 1 después de la inyección. La fuerte supresión sostenida de la expresión de hepcidina era todavía evidente para el día 16, lo que sugiere una larga duración de la actividad. En consecuencia, un aumento de pico transitorio en la concentración de hierro circulante se observó en el día 2 después de la inyección de anticuerpos y los niveles se mantuvieron elevados durante el día 16.

[00677] La concentración de anticuerpos en suero se midió horas extras después de una única inyección de anticuerpos. Las muestras se recogieron a 1 hora, 6 horas, 1, 2, 4, 8, 16, 28 días después de la dosis (10 mg/kg, IV).

Tabla 11. Parámetros clave en la clasificación de dosis individuales de rata del estudio PK

Parámetros	ANTICUERPO 5	ANTICUERPO 6	ANTICUERPO 7
$T_{1/2}$ (días)	9.1	7.8	9.2
C_{max} (ug/ml)	140.7	189.0	146.2
Tiempo de residencia media (días)	8.6	7.0	6.9

[00678] Además, la concentración total en suero del anticuerpo 7 (tanto libre y como unido a BMP6) se midió en ratas y monos cynomolgus después de una sola inyección IV de Anticuerpo 7 (en ratas, a dosis de 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 mg/kg; en mono a 3 mg/kg) en los tiempos indicados por ELISA con un LLOQ de 46 ng/ml (línea de puntos) en ratas y LLOQ de 0,2 ug/ml (línea de puntos) en mono. Los resultados se muestran en las Figs. 9 (rata) y 12 (mono).

Respuesta dependiente de la dosis en los parámetros de hierro sérico después de tratamiento con anticuerpos BMP6 en ratones y monos cinomolgos

[00679] Para definir aún más la respuesta dependiente de la dosis del metabolismo del hierro al tratamiento de anticuerpos BMP6, ratones recién nacidos C57BL/6 fueron inyectados con dosis crecientes del anticuerpo 6, que van desde 0,02 a 0,5 mg/kg, como se indica. El anticuerpo 6 fue elegido como representante de los 3 anticuerpos ya que comparten marco similar, el perfil PK de roedores y las actividades in vitro. Una sola dosis de 0,5 o 0,1 mg/kg suprimió significativamente la hepcidina sérica y en consecuencia aumentó la concentración de hierro en suero 2 días después del tratamiento. Sin embargo, sólo 0,5 mg/kg, fue un fuerte efecto sostenido en el metabolismo del hierro observado hasta 8 días después de la inyección. Ver Fig. 3. Estos resultados sugieren, que la neutralización del objetivo saturable dependiente de la dosis se puede lograr fácilmente utilizando anticuerpos antagonistas BMP6 potentes.

[00680] Ver Fig. 3, Efectos dosis-dependientes de un anticuerpo BMP6 sobre los biomarcadores séricos en el máximo estado del metabolismo del hierro: La concentración sérica hIgG en el tiempo después de una sola inyección intravenosa del anticuerpo 6 a las dosis indicadas. Abajo: el panel izquierdo es un análisis cuantitativo de la concentración de hepcidina sérica después de una única inyección del anticuerpo 6 o de la IgG humana control, mientras que el panel derecho es la concentración de hierro sérico.

[00681] Se realizaron experimentos similares con el anticuerpo 7. La supresión de hepcidina en suero circulante dosis y tiempo dependiente por el anticuerpo 7 se ensayó en ratas macho Sprague-Dawley. Las muestras de suero se recogieron a 0,25, 1, 2, 6 hr, y 1, 2, 4, 7 y 14 d post-dosis después de que una sola dosis de anticuerpo 7 se administró mediante inyección IV a una dosis que oscila entre 0,03 mg/kg a 10 mg/kg. Los niveles de hepcidina en suero se midieron por LC/MS con un LLOQ = 9 ng/mL. En los mismos animales, también se midieron los niveles de hierro sérico. Los resultados se presentan en la Fig. 11.

[00682] Estos resultados indican que los anticuerpos anti-BMP6 de la presente invención son capaces de causar un aumento dependiente de la dosis en hierro sérico. Los efectos fueron robustos y persistieron durante al menos 2 semanas después de la administración de anticuerpos.

5 [00683] Los efectos sobre los parámetros de hierro sérico en respuesta al anticuerpo anti-BMP6 También se puso a prueba en el mono cynomeolgos. Monos macho Cynomogus se les dio una sola inyección intravenosa de anticuerpos 7 a una dosis de 3 mg/kg. En días post inyección indicados, se recogieron muestras de suero y se analizaron para el hierro sérico total (Fe) y la concentración de hepcidina. Los resultados se muestran en la fig. 13. Los datos de los 3 animales
10 individuales (graficados frente a los niveles de referencia pre-dosis). Los valores medios se indican con la línea “x”. Un incremento en el hierro sérico y la supresión de la hepcidina sérica se observaron 24 horas después de la administración de anticuerpos y los efectos se mantuvieron (en relación a los niveles de pre-dosis) a
15 través del final del estudio de 28 días. Estos resultados indican que los anticuerpos BMP6 de la invención potentemente inducen la expresión de hepcidina y reducen la concentración de hierro circulante en los primates no humanos.

20 **Efecto de los anticuerpos BMP6 en los parámetros de las células rojas, en anemia ESA resistente impulsada por inflamación en ratones**

[00684] Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la utilidad terapéutica de los anticuerpos anti-BMP6 en un modelo de ratón de anemia inflamatoria. Ver Fig. 4. Los ratones tratados con antígeno *abortus* (BA) desarrollaron anemia 6 días más tarde. Los animales anémicos fueron tratados con un anticuerpo anti-BMP6 eritropoyetina recombinante (EPO) iniciado en un día de diferencia, y el
25 efecto de la terapia con anticuerpos sobre la progresión de la anemia se controló a 13 días en relación con BA. Los valores de HGB y HCT disminuyeron entre el inicio del tratamiento y el día 13, el cual era resistente al tratamiento con EPO solo. El anticuerpo BMP6 combinado y tratamiento de EPO efectivamente
30 restauran la respuesta a EPO y aumenta significativamente los niveles HGB y

HCT. Este efecto se asoció con una estimulación concomitante de la actividad de la eritropoyetina, como se refleja por un aumento persistente en RETA, así como restaura el contenido de hemoglobina de reticulocitos, lo que sugiere una corrección de la síntesis de hemo debido a la deficiencia de hierro funcional en el compartimiento de la eritropoyesis.

[00685] Ver Fig. 4, el tratamiento terapéutico del anticuerpo BMP6 en una anemia ESA resistente inflamatoria del modelo de ratón. Arriba: esquema experimental del modelo de anemia ESA resistente inflamatoria inducida por BA. En pocas palabras: los parámetros de la eritropoyesis en 13 días después del tratamiento BA. HGB: hemoglobina; HCT: hematocrito; RETA: recuento de reticulocitos; RET-HE: equivalente de hemoglobina de reticulocitos.

[00686] $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ frente BA + EPO + hIgG1

Ejemplo 3 - Plan clínico para las pruebas de anticuerpos BMP6 en humanos

Plan de Estudio Clínico: Evaluación de la terapia usando anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen BMP6 humana.

[00687] Los pacientes con enfermedad renal terminal (ESRD) producen poca o ninguna eritropoyetina (EPO) y generalmente requieren la administración periódica por vía intravenosa de (IV) infusiones de hierro y EPO exógena para permitir la síntesis de hemoglobina inducida por EPO. Hasta un tercio de la hemodiálisis crónica (HD) de los pacientes no responden adecuadamente a la EPO, debido principalmente al secuestro intracelular de hierro. La hepcidina se elimina principalmente por el riñón, pero la eliminación por diálisis es insuficiente. Por lo tanto, los pacientes HD crónicos tienden a tener niveles de hepcidina significativamente elevados, que bloquean la movilización de hierro para la eritropoyesis. La terapia de hierro IV ya no es efectiva o recomendada una vez que las reservas de hierro del cuerpo alcanzan un nivel crítico (indicado por los niveles de ferritina séricos elevados). Las guías actuales no recomiendan dar

hierro IV a los pacientes de diálisis anémicos con altos niveles de ferritina, y estos pacientes pueden, por tanto, recibir dosis aún mayores de EPO, con el potencial riesgo asociado de una respuesta anémica hipo-EPO (Mejora de la enfermedad renal Global Outcomes (KDIGO) Grupo de Trabajo de la anemia 2012). La anemia hipo-EPO imparte un aumento significativo del riesgo de mortalidad por cualquier causa relacionada tanto con la anemia como con elevadas dosis de EPO en hemodiálisis (Kilpatrick et al 2008, López-Gómez et al 2008, Fukuma et al 2012) y los pacientes en diálisis peritoneal (Suttorp et al 2013). Los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen BMP6 humana de la presente descripción pueden beneficiar a los pacientes con enfermedad renal crónica con anemia por deficiencia de hierro mediante la mejora de los niveles de hemoglobina (HGB) al mismo tiempo que reduce necesidades de dosificación de EPO y hierro IV. Un índice de menor resistencia EPO (relación de la dosis de EPO vs. nivel de Hgb) se correlaciona con un menor riesgo de mortalidad.

[00688] En resumen, el objetivo de la terapia usando los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a BMP6 humana de la presente descripción es movilizar hierro secuestrado, que puede luego las necesidades de dosificación de EPO y hierro IV y mejorar los niveles de hemoglobina, los cuales se espera mejore los resultados del paciente. Este es el primer estudio de una terapia de una sola dosis en humanos, utilizando anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno que se unen BMP6 humana. Este estudio evaluará la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, farmacodinámica y la eficacia en una población de pacientes de hemodiálisis crónica. El propósito de este estudio es evaluar si la terapia usando anticuerpos aislados o sus fragmentos de unión a antígeno que se unen a BMP6 humana garantiza desarrollo clínico adicional en la anemia asociada con enfermedad renal crónica.

Plan de Investigación

Diseño del estudio

[00689] Este es el primer estudio en humanos de dos partes, de dosis única no confirmatorio, de un anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno que se une a BMP6 humana para evaluar la seguridad, tolerabilidad, PK, PD y la eficacia en una población de pacientes de hemodiálisis crónica. La parte 1 es el primer estudio en humanos, de dosis única, de marcaje abierto de búsqueda de dosis. La parte 2 es un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo, de dosis única que comparará dos niveles de dosis de un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humano.

[00690] Las evaluaciones de seguridad incluirán exámenes físicos, ECG, signos vitales, evaluaciones de laboratorio clínico estándar (hematología, química sanguínea, índices de hierro sérico) monitoreo de un acontecimiento adverso y la de eventos adversos graves.

Parte 1

[00691] Los objetivos de la Parte 1 son (a) evaluar la seguridad de dosis única, PK, PD, y la tolerabilidad, y (b) determinar la PAD mínima de un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana, definida como la dosis más baja ensayada en la Parte 1 que resulta en un aumento en Hgb (mediana del cambio desde el valor inicial ~ 0,5 g/dL) a los 29 días después de la dosis.

[00692] Durante la Parte 1, una visita de selección se llevará a cabo, en donde la elegibilidad del paciente para ser incluido en el estudio será determinada (Figura 6). Los pacientes elegibles serán admitidos en el sitio de estudio y serán re-evaluados por los criterios de elegibilidad, durante la visita basal. Todos los resultados de la evaluación de seguridad de línea de base deben estar disponibles y revisados antes de la dosificación.

[00693] La figura 6 proporciona una visión general del diseño del estudio para la Parte 1. Se les pedirá a los pacientes llegar al sitio de estudio el Día 1, inmediatamente después de su visita de diálisis de rutina. Los pacientes recibirán entonces una infusión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del

mismo que se une a BMP6 humana (la dosis exacta dependerá de la cohorte). Si es posible, la dosis debe tener lugar preferentemente en un día de diálisis antes de dos días inter-diálisis (por ejemplo, viernes o sábado), y se producirá después de la sesión de diálisis de ese día. Sin embargo, si no es posible, entonces la dosificación se puede producir en un día de diálisis no anterior a dos días inter-diálisis. Después de la dosificación, los dos primeros pacientes en la Parte 1 serán domiciliados durante al menos 48 horas por seguridad y para evaluaciones de PK/PD. Los pacientes volverán al lugar de estudio en los días 4 y 6 para las evaluaciones de PK/PD, y luego semanalmente durante un total de 29 días para las evaluaciones de PK, y un total de 12 semanas para la evaluación de la seguridad, con una visita de fin de estudio en aproximadamente del día 85. Las visitas de estudio, incluyendo todas las pruebas de laboratorio que no sean evaluaciones PK post-diálisis, debe tener lugar antes de la visita programada de diálisis del paciente.

[00694] La parte 1 se iniciará con una dosis que prevista como no farmacológicamente activa. La dosis se ajustará para cada cohorte subsiguiente de la parte 1, basado en cambio de la mediana de cada cohorte en Hgb después de una sola dosis de un anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno que se une a BMP6 humana y en el nivel de saturación de transferrina (TSAT) como se discute en la sección de consideraciones estadísticas y se muestra en la Figura 7. El objetivo de este árbol de decisión es identificar la dosis mínima factible que induce la movilización de hierro (como se indica por la saturación de transferrina (TSAT) niveles > 50% observados en al menos 4 pacientes en la cohorte de 6-pacientes una semana después de la dosis) y aumenta Hgb. Si se moviliza el hierro, pero la hemoglobina no aumenta por lo menos 0,5 g/dl a los 29 días después de la dosis, a continuación, se analizarán los datos clínicos para evaluar los factores de confusión potenciales (por ejemplo, la pérdida de sangre debido a la excesiva flebotomía no estudiada). Los investigadores aplicables y representantes del Patrocinador revisarán los eventos adversos de cada cohorte, y evaluarán estos eventos en el contexto de los problemas médicos (a) conocidos

asociados con insuficiencia renal crónica y (b) hallazgos toxicológicos no clínicos. Cohortes posteriores no serán dosificadas hasta que los investigadores y Patrocinadores indique que es seguro continuar.

[00695] La figura 7 proporciona el algoritmo para el ajuste de la dosis en la Parte 1. Los análisis de sangre incluyendo mediciones de hemoglobina se producirán antes de la diálisis. La dosis inicial será de 0,01 mg/kg. En la Parte 1, los pacientes serán asignadas de entre una hasta 6 cohortes de dosis de marcaje abierto de hasta 6 pacientes cada una. La PAD mínima de un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana, como se define anteriormente, será la categoría de dosis inferior seleccionada para la Parte 2. La dosis para cada cohorte subsiguiente se puede ajustar en mayor o menor medida, como se muestra en la figura 7. Si la dosis más baja posible (0.001 mg/kg) se traduce en un aumento de la mediana de Hb de $\geq 0,5$ g/dl, este será la PAD mínimo y la dosis más baja seleccionada para la parte 2 y la siguiente dosis más alta evaluada en Parte 1 será la categoría de dosis más alta para la Parte 2. Si la dosis más alta (0,1 mg/kg) evaluada en la Parte 1 es la PAD mínima, la Parte 2 procederá con sólo 2 categorías: placebo y PAD mínima. En el caso de que se necesitan cohortes de dosis adicionales en la parte 1, se añadirán estas cohortes como se describe en el presente documento.

[00696] Cada cohorte de la parte 1 incluirá 6 pacientes. Los 2 primeros pacientes en la primera cohorte de la Parte 1 se dosifican con al menos 7 días de diferencia. El tiempo de dosificación de los pacientes de las cohortes de la Parte 1 posterior se producirá como sea posible para la programación del sitio respectivo y los recursos de apoyo. Todos los pacientes de la parte 1 serán seguidos durante 12 semanas después de la dosis.

Parte 2

[00697] Los objetivos de la Parte 2 son (a) evaluar la seguridad, PK, PD, y la tolerabilidad y (b) determinar la eficacia basado en los cambios de Hgb en

respuesta a una dosis única de un anticuerpo que se une a BMP6 humana vs. placebo. La parte 2 incluirá un máximo de tres categorías: Hasta dos categorías de dosis Ab y una categoría de placebo (Figura 8). Las dos categorías de dosis AB se derivan de los datos generados en la Parte 1. La parte 2 incluirá aproximadamente 60 pacientes con una aleatorización de 1: 1: 1 a las tres categorías. Si, en la Parte 1, la PAD mínima es también la dosis más alta (0,1 mg/kg) evaluada, entonces, la parte 2 tendrá sólo dos categorías: PAD mínima y placebo. En este caso, 40 pacientes se asignaron a las dos categorías al azar con una relación de aleatorización de 1: 1. El tamaño de la muestra de la Parte 2 puede ser ajustado basandose en la variabilidad del cambio desde el inicio en Hgb en la Parte 1.

[00698] La figura 8 ofrece un diseño de estudio para la Parte 2. Durante la Parte 2, una visita de selección se llevará a cabo, en donde se determinará la elegibilidad del paciente para entrar en el estudio. Los pacientes elegibles serán re-evaluados según los criterios de elegibilidad, durante la visita basal. Todos los resultados de la evaluación de seguridad de línea de base deben estar disponibles y ser revisados antes de la dosificación.

[00699] Se pidió a los pacientes llegar al sitio de estudio en el Día 1, inmediatamente después de su visita de diálisis de rutina. Los pacientes recibirán entonces ya sea una infusión de Ab o placebo, como se determine por la asignación de la aleatorización. Si es posible, la dosis debe tener lugar preferentemente un día de diálisis antes de dos días inter-diálisis (por ejemplo, viernes o sábado), y se producirá después de la sesión de diálisis que haya. Sin embargo, si no es posible, entonces la dosificación se puede producir en un día de diálisis que no preceda dos días inter-diálisis. Los pacientes volverán al lugar de estudio en los días 4 y 6, y luego semanalmente durante las evaluaciones de seguimiento. Durante las visitas de seguimiento los pacientes serán sometidos a evaluaciones de seguridad de rutina y los datos de PK también serán recogidos 85 días. Las visitas de estudio pueden tener lugar después de la visita programada de diálisis del paciente, con el fin de encajar con el programa de diálisis del

paciente. Todos los pacientes incluidos en la Parte 2 serán seguidos durante 12 semanas después de la dosis de Ab (o placebo).

Gestión de las dosis de EPO (ambas partes)

[00700] Ajustes de la dosis de EPO individual durante ambas Partes se
5 gestionarán de acuerdo con el protocolo de atención de diálisis estándar de cada sitio. Los protocolos del sitio serán revisados como parte de la evaluación del sitio, y se comprobará la conformidad con la norma de directrices de atención (KDIGO Guía de Práctica Clínica para la Anemia Renal Crónica en el Grupo de Trabajo de Enfermedades Anemia 2012). Los pacientes que alcanzan un nivel de
10 hemoglobina de ≥ 13 g/dl en cualquier momento durante el estudio pueden ser manejados con la flebotomía terapéutica, según el criterio del investigador, además de las directrices específicas del sitio para la gestión de los valores de hemoglobina por encima de los niveles objetivo.

Gestión hierro intravenoso (ambas partes)

15 [00701] Los pacientes que recibieron dosis de carga de hierro IV (100 mg/semana) serán excluidos del estudio. Los pacientes que reciben mantenimiento semanal de hierro IV (<100 mg/semana) pueden ser incluidos en este estudio. La dosis semanal de mantenimiento de hierro IV se llevará a cabo a principios de la semana 1 de la dosificación Ab. Los índices de hierro serán
20 monitoreados durante la primera semana post- dosificación Ab, y la terapia de rescate de hierro y gestión de mantenimiento de hierro IV seguirá las directrices estándar de atención como el protocolo de gestión de la unidad de hemodiálisis. Los protocolos del sitio serán revisados como parte de la evaluación del sitio, y se comprobará la conformidad con la norma de directrices de atención
25 (KDIGO Guía de Práctica Clínica para la Anemia Renal Crónica en el Grupo de Trabajo de Enfermedades Anemia 2012).

Fundamentos del diseño del estudio

Fundamentos para el diseño del estudio de dos partes

[00702] La justificación de la existencia de dos partes en la misma población de pacientes es la identificación de la PAD mínima de manera segura y eficiente, con el objetivo de reducir al mínimo el número de pacientes y cohortes expuestas a dosis potencialmente sub-terapéuticas. La parte 2 evaluará la eficacia de la PAD mínima y un nivel de dosis por encima de la PAD mínima (tal como se determina en la Parte 1), en comparación con un grupo placebo.

[00703] Parte 1 está diseñado para evaluar la seguridad de dosis única, tolerabilidad, PK/PD, así como la PAD mínimo de Ab en un estudio de marcaje abierto. La PAD mínima se determina en función del cambio de la mediana en la dosis de cada cohorte en Hgb a los 29 días después de la dosificación Ab. La justificación de los criterios de determinación de PAD es que las respuestas clínicamente significativas de la EPO pueden requerir hasta 4 semanas después de un cambio de dosis de EPO. Si Ab moviliza hierro en la población objetivo, entonces eso puede permitir que la dosis actual EPO del paciente ejerza un efecto eritropoyético más robusto. En los 29 días los rangos Hgb enumerados en los criterios de determinación de PAD se basan en las tasas clínicamente significativas y seguras de aumento de la hemoglobina en respuesta a una dosis de EPO (~ 0.5 g/dL más de 29 días). La razón fundamental para buscar la PAD mínima en lugar de un efecto máximo es que una respuesta excesivamente robusta de hemoglobina es un riesgo de seguridad en esta población de pacientes, como se refleja en los rangos objetivo de hemoglobina en la norma actual de las directrices de atención (Resultados mundiales en la mejora Enfermedad Renal (KDIGO) Grupo de Trabajo Anemia 2012). Los objetivos de las evaluaciones de la seguridad y la tolerabilidad de la Parte 1 son (a) identificar señales de seguridad, y (b) informar las decisiones de ajuste de dosis, lo que garantiza que las dosis seleccionadas para la Parte 2 (PAD mínima + 1 dosis más alta) son adecuados para la posterior evaluación de la seguridad y la eficacia en relación con el placebo. Mientras que la parte 1 es insuficientemente apta para realizar una evaluación objetiva de la seguridad, el grupo placebo y muestras de mayor tamaño en la parte 2 permitirán una evaluación de la seguridad imparcial en

la PAD mínima y una dosis más alta. Además de la seguridad, la tolerabilidad y PK/PD, la Parte 2 está diseñada para evaluar la eficacia frente a placebo en un estudio doble ciego. La evaluación de la eficacia se basa principalmente en la hemoglobina, con un índice de resistencia a la EPO ($ERI = \text{dosis de EPO ajustada al peso semanal dividida por Hgb}$) como una variable secundaria clave. ERI proporciona una medida cuantitativa de la cantidad de EPO necesaria para lograr un valor Hgb dado, y por lo tanto proporciona información clínicamente importante, además de solo Hgb.

10 Justificación de la FIH en pacientes en diálisis

[00704] Este primer estudio en humanos (FIH) se llevará a cabo en pacientes de hemodiálisis crónica (HD) en lugar de voluntarios sanos (HV). La evaluación de la seguridad, tolerabilidad y respuesta PK/PD para Ab BMP6 antihumano en HV es probablemente no traducible a los pacientes en HD crónica por varias razones:

[00705] A diferencia de HV, los pacientes HD crónicos con anemia, ferritina sérica alta y baja TSAT han acumulado crónicamente reservas de hierro intracelulares. Por lo tanto, la seguridad, tolerabilidad y los efectos farmacológicos relacionados con la movilización de hierro en respuesta a dosis bajas de Ab se evalúan más apropiadamente en pacientes HD crónicos. En HV con la función renal normal, la hepcidina (de la cual BMP6 es un regulador clave) es filtrada por el riñón y se excreta en la orina de manera eficiente, dando lugar a niveles circulantes bajos. Por el contrario, la hepcidina se filtra menos eficientemente y de manera transitoria por diálisis, lo que lleva a los niveles circulantes elevados en los pacientes HD crónicos (Zaritsky et al 2010). Además, los riñones normales se ajustan a niveles de EPO endógena de forma dinámica y un cambio en la hemoglobina puede no ser evidente en respuesta a Ab. Por lo tanto, la seguridad y la tolerabilidad relacionada con la modulación de la hepcidina por la vía BMP6 y el efecto de Ab en Hgb se evalúan más apropiadamente en pacientes crónicos HD.

Justificación de la población objetivo de pacientes

[00706] Este estudio está diseñado para evaluar un Ab BMP6 anti-humano en el ajuste de la anemia EPO-hipo-sensible, por deficiencia de hierro. Las guías clínicas establecidas (KDIGO Guía de Práctica Clínica para la anemia renal

5 Crónica grupo de Trabajo de la Anemia 2012) definen la hipo-respuesta EPO como la necesidad de dos aumentos de la dosis de EPO, hasta 50% por encima de la dosis estable, para mantener una concentración de hemoglobina estable. Los criterios de elegibilidad propuestos están diseñados para seleccionar a los pacientes HD crónicos con anemia estables, y los indicadores clínicos de

10 restricción de hierro: ferritina aumentada y baja TSAT (TSAT = hierro sérico/capacidad de unión a hierro total; TSAT se correlaciona estrechamente con hierro sérico). Además, los ajustes en las dosis de EPO y hierro IV se adherirán a la estricta norma de cuidar los objetivos a Hgb, TSAT y ferritina. Este diseño reduce el riesgo de exceso de dispararos hacia los objetivos de hemoglobina

15 deseados debido a cambios en hierro y los parámetros hematológicos continuarán siendo administrados según la norma de la atención. Por otra parte, los pacientes que recibieron dosis de carga de hierro IV de 1 semana antes de la línea de base serán excluidos. Los pacientes que reciben hierro intravenoso de mantenimiento se pueden incluir (si se cumplen todos los demás criterios de

20 elegibilidad). La justificación de la inclusión de estos pacientes es que el estándar actual de atención en los EE.UU. dicta que se mantengan Hgb y TSAT dentro de límites estrechos, y por lo tanto, la total descarga de la terapia de mantenimiento con hierro con el fin de cumplir con los criterios de bajos valores de TSAT para elegibilidad colocaría a pacientes en un riesgo de un TSAT por debajo del 25%, lo

25 que exige un curso de dosis de carga de hierro IV según la norma de la atención. Sin embargo, los pacientes elegibles para mantener hierro IV tendrán su dosis semanal de hierro IV llevada a cabo a principios de la semana de la dosificación Ab, y se reanudará el tratamiento de mantenimiento de hierro IV sólo como es determinado por la norma de sitio del protocolo de atención, basado en

30 los índices de hierro monitoreado.

Justificación de la dosis/régimen, duración del tratamiento

Justificación de la dosis inicial

[00707] La dosis inicial máxima recomendada (MRSD) se calculó con base al nivel sin efecto adverso (NOAEL) de los estudios toxicológicos GLP realizados en ratas y macacos en 13 semanas (14 dosis). Los animales recibieron dosis semanales de bolo IV de 0,1, 1, 10, y 100 mg/kg. Los grupos de dosis de 1 y 100 mg/ kg (sólamamente) fueron seguidos posteriormente durante 16 semanas en ratas o 24 semanas en monos cynomolgus después de la última dosis de un anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno que se une a BMP6 humano. El MRSD se estimó calculando primero la dosis equivalente humana (HED) para el NOAEL a partir de estos estudios (0,1 mg/kg) un enfoque que se considere apropiado para medicamentos con un peso molecular > 100 KDa y, posteriormente, la aplicación de un factor de seguridad de 10 para dar cuenta de las diferencias entre las especies y los pacientes no clínicos, tales como la cantidad de hierro almacenado y la demanda de la eritropoyesis. Parámetros farmacocinéticos para las especies no clínicas se infieren de los datos toxicocinético (TK) recopilados durante los estudios de toxicología de habilitación de IND. Los parámetros correspondientes farmacocinéticos en los pacientes se estimaron a continuación, utilizando la escala alométrica, y estos parámetros fueron utilizados para predecir libremente un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una concentración de BMP6 humana en función del tiempo en los pacientes para una dosis dada. Comparando los datos de los conocimientos tradicionales a partir de los estudios de toxicología en el modelo basado en una PK Ab en pacientes indicó que una dosis 10 veces menor que el NOAEL/HED se predijo para producir un margen 10 veces (mínimo) basado en la concentración Ab.

[00708] Los niveles máximos de hierro sérico observados en respuesta a Ab en estudios con animales pueden subestimar la respuesta de hierro a Ab predicha en humanos, porque los pacientes HD que han sido administrados con la terapia

de hierro IV tienen probabilidades de tener mayores reservas tisulares de hierro que los animales sanos. Sin embargo, a diferencia de los animales sanos, no anémicos, se espera que los pacientes HD utilicen el hierro sérico secretado para la eritropoyesis; Por lo tanto, los modelos animales pueden sobrestimar la duración de la elevación de hierro. La patología del hígado observada en los estudios de 13 semanas no se observó en las 4 semanas de estudios, lo que sugiere que las toxicidades se deben a la exposición acumulativa de hierro sérico en lugar de una respuesta a la liberación aguda de hierro.

[00709] Para dar cuenta de las diferencias esperadas en hierro almacenado entre las especies no clínicas y los pacientes, MRSD fue también predicho basado en un análisis del modelo de las concentraciones de hierro sérico. La exposición acumulativa a hierro sérico que dio lugar a los resultados de toxicología fue representada como una área bajo la curva de hierro (AUC Fe). En este enfoque, el AUC de hierro calculado para la dosis NOAEL (0,1 mg/kg) fue considerado como adecuadamente seguro. A continuación, el AUC Fe en el MRSD propuesto en pacientes se predijo y comparado con la AUC Fe en las especies no clínicas en el NOAEL. Debido a que la exposición de hierro sérico predicha por el modelo en el MRSD en pacientes fue > 10-veces menor que en el NOAEL en las especies no clínicas, la disminución de la NOAEL/HED por un factor de seguridad de 10 se consideró adecuada para la estimación de un MRSD. Por consiguiente, la MRSD propuesta es 0,01 mg/kg.

Justificación del ajuste de la dosis

[00710] Para este estudio, la dosis de prueba máxima (x_{max}) será el HED correspondiente a la NOAEL en cada uno de los 2 estudios de toxicología que permiten IND: 0,1 mg/kg. La dosis de prueba factible mínima (x_{min}) es la dosis más baja técnicamente factible basada en estudios de compatibilidad: 0,001 mg/kg. El MRSD (x_0) se evaluará de acuerdo con la seguridad, TSAT y criterios de hemoglobina (Figura 7). Si x_0 resultada en un cambio de mediana en Hb <0,5 g/dl

en relación con la pre-dosis, la selección de $x +$ (Figura 7) se guiará extrapolando linealmente a una escala logarítmica base natural (en previsión de una relación dosis-respuesta sigmoidal) entre x_0 y $x_{\max}$. Las dosis provisionales para este aumento de la dosis fueron proporcionadas anteriormente. Estas dosis provisionales se pueden ajustar en base a la revisión de los datos durante el análisis interino informal entre cada cohorte. Este enfoque continuará hasta que la PAD mínima se identifique o $x_{\max}$ sea alcanzada. Si $x_{\max}$ resulta en un cambio del promedio de hemoglobina $<0,5$ g/dl, la seguridad de esta dosis se evaluará y se tomará la decisión de modificar el protocolo para agregar cohortes adicionales a dosis que exceden el $x_{\max}$, basados en los datos de en la seguridad, PK y PD. Si la dosis más alta probada en la Parte 1 resulta en un aumento promedio de Hb $<0,5$ g/dl, no aumenta TSAT por encima del 50%, y la dosis está por debajo de $x_{\max}$, el protocolo puede ser modificado para añadir cohortes adicionales.

[00711] Si, por el contrario x_0 resulta en un cambio del promedio de Hgb $\geq 0,5$ g/dl en relación con pre-dosis, la dosis para la próxima cohorte se ajustará a $x_{\min}$. Si $x_{\min}$ también se traduce en un cambio del promedio Hgb $\geq 0,5$ g/dl, $x_{\min}$ se considerará la PAD mínima y $x_{\min}$ y x_0 se evaluarán en la Parte 2. Si $x_{\min}$ resulta en un cambio en el promedio de Hb $< 0,5$ g/dl y TSAT $\leq 50\%$ (Figura 7), las dosis se incrementará por extrapolación lineal dentro del intervalo ($x_{\min}$, x_0) en la escala logarítmica base natural hasta que la PAD mínima se identifica o hasta que las 6 dosis (cohortes) hayan sido evaluadas. Dosis provisionales dentro del intervalo ($x_{\min}$, x_0) fueron previstas anteriormente. Estas dosis provisionales se pueden ajustar en base a la revisión de los datos durante el análisis interino informal entre cada cohorte. La PAD mínima se define como la dosis más baja ensayada que resulta en un cambio del promedio de Hgb $\geq 0,5$ g/dl en relación con la pre-dosis.

[00712] El Ab será administrada como una única dosis de infusión IV para asegurar que la exposición del hierro sérico (Fe AUC) sea menor que la asociada con los hallazgos adversos en los estudios de toxicología no clínicos. La solución

de Ab se infunde inmediatamente después de la sesión de hemodiálisis en el Día 1 para minimizar el posible impacto de la diálisis en la PK o la biodisponibilidad de hierro inmediata post- dosis. Los adicionales de aproximadamente 30 minutos de infusión de dosis siguientes a la diálisis (en días de dosificación única) no se
5 espera que supongan ningún riesgo significativo o molestias a los pacientes.

Justificación de la elección del comparador

[00713] El placebo se emplea como un comparador en la Parte 2 para permitir la evaluación objetiva de los resultados clínicos.

10

Propósito y distribución del tiempo de las adaptaciones de análisis/de diseño interinas

[00714] En la Parte 1, después de que cada cohorte de 6 pacientes terminen la evaluación de la semana 4 después de la dosis, un análisis intermedio informal se
15 llevará a cabo para tomar la decisión de ajuste de la dosis para la próxima cohorte. La seguridad y los marcadores PD serán revisados por todos los miembros del equipo de ajuste de la dosis, incluidos los investigadores y representante(s) del Patrocinador aplicables. Nuevas cohortes se activarán sólo si se confirma la seguridad y la tolerabilidad, y si se cumplen las condiciones de la
20 PD como se describe en la Figura 7. Habrán hasta 5 análisis interinos informales en la Parte 1. Se planea un análisis intermedio formal después de que todos los pacientes de la última cohorte de la Parte 1 terminen la evaluación la semana 4 después de la dosis para evaluar los efectos clínicos de las dosis investigadas y potencialmente desencadenar estudios no clínicos adicionales, y se podría
25 informar en los estudios clínicos posteriores la temperatura corporal, la presión arterial, el pulso, la evaluación de ECG, la química sanguínea, índices de hierro hematología, índice de resistencia a la EPO, y los eventos adversos recogidos hasta el Día 29 de la última cohorte realizada en la Parte 1.

[00715] La PAD mínima y una dosis de un nivel más alto que la PAD mínima
30 serán seleccionadas para la Parte 2. Si la dosis más baja posible probada induce

un aumento de la Hgb de $\geq 0,5$ g/dl, las dos dosis más baja ensayadas será seleccionadas para la parte 2.

Riesgos y beneficios

5 [00716] El beneficio potencial para los pacientes que participan en este estudio puede incluir la reducción de EPO y las necesidades de hierro IV, y la mejora de los niveles de hemoglobina durante el tiempo del tratamiento y por algún tiempo más.

[00717] El riesgo para los pacientes en este ensayo será minimizado por el
10 cumplimiento de los criterios de elegibilidad, y un estrecho seguimiento clínico de todos los pacientes (y enviando a su domicilio a los dos primeros pacientes en la Parte 1) durante las primeras 48 horas después de la administración del Ab.

[00718] Los riesgos potenciales asociados con la movilización de hierro incluyen (a) la redistribución de hierro a los tejidos y órganos como el bazo, el
15 hígado, el corazón, el páncreas y la pituitaria, y (b) un pequeño aumento de la susceptibilidad a la infección bacteriana, particularmente en pacientes con catéteres vasculares permanentes. Varios de los criterios de elegibilidad reducen el riesgo de complicaciones. Los niveles elevados de pruebas de función hepática pueden ser vistos en asociación con la redistribución de hierro. La función
20 hepática se vigilará de forma paralela a los parámetros hematológicos y de hierro. La sobredosificación de los objetivos estándares de atención de hemoglobina puede resultar en la policitemia. La gestión de hemoglobina, la terapia de EPO, y la terapia de hierro puede llevarse a cabo

[00719] Pacientes HD a los que les han sido administrados una terapia de
25 hierro IV pueden tener mayores reservas tisulares de hierro que los animales sanos; Por lo tanto, los niveles máximos de hierro en suero observados en pacientes tratados con un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a BMP6 humana puede exceder los observados en estudios con animales. Sin embargo, a diferencia de los animales sanos, se espera que los
30 pacientes HD utilicen el hierro sérico liberado para la eritropoyesis; Por lo tanto,

los modelos animales pueden sobrestimar la duración de la elevación de hierro. Se anticipa que la exposición pronosticada por el modelo de a Ab (por ejemplo, Cmax, AUC) en el MRSD debe ser 10 veces menor que la observada en el NOAEL en estudios no clínicos. No se espera que la exposición de lugar a niveles de exposición de hierro sérico (AUC) asociados con las transaminasas hepáticas y necrosis de células individuales en el hígado observada en estudios preclínicos. La escalada de dosis Ab al NOAEL se producirá después de las evaluaciones de seguridad descritas. La experiencia clínica con pacientes con sobrecarga crónica de hierro, así como aquellos que reciben hierro parenteral probablemente no predicen necesariamente los efectos que se pueden producir a partir de los aumentos agudos en hierro intracelular inducidos por Ab. Por lo tanto el riesgo potencial de toxicidad aguda de hierro inducida por Ab es probablemente bajo. La toxicidad de hierro aguda puede afectar el corazón, el hígado y/o el páncreas. Las manifestaciones clínicas de la toxicidad aguda de hierro pueden incluir defectos de la conducción cardíaca, transaminasas hepáticas elevadas e intolerancia a la glucosa/hiperglucemia. La toxicidad de hierro agudo severo también puede incluir la acidosis metabólica, alteraciones electrolíticas y manifestaciones neurológicas. En caso que se produzca la toxicidad aguda de hierro, los pacientes pueden ser tratados de forma urgente con una terapia de quelación de hierro tal como la deferoxamina combinada con hemodiálisis. Está previsto un máximo de 134 ml (Parte 1) y 172 ml (Parte 2) de sangre, de cada paciente para ser recogido en un período de 115 días como parte del estudio. Muestras adicionales para el seguimiento de conclusiones de seguridad serían adicionadas al estudio. Esto no se considera como un riesgo para esta población.

[00720] No hay estudios reproductivos de toxicidad que se hayan realizado hasta la fecha con los anticuerpos BMP6 anti-humanos. Efectos potenciales en los órganos reproductores masculinos o femeninos han sido evaluados por el examen histopatológico estándar de cuidado de los ovarios y los testículos y órganos reproductivos accesorios en estudios de toxicidad en monos cynomolgus de 13

semanas. No se observaron efectos relacionados con el tratamiento. Ratones knock-out para BMP6 mostraron un retraso en la osificación del esternón y sobrecarga de hierro (Meynard et al 2009).

[00721] Morbilidad fetal y materna significativa y mortalidad se asocian con la hemodiálisis crónica. En un estudio de cohorte retrospectivo que comparaba las mujeres en hemodiálisis crónica (267 nacimientos) con las mujeres que recibieron un trasplante renal (264 nacimientos), las mujeres en hemodiálisis demostraron mayores tasas de desprendimiento de la placenta, transfusión de sangre, bebés pequeños para la edad gestacional, muertes fetales y muertes maternas (Saliem et al 2015). Por lo tanto, las mujeres en edad fértil deben utilizar un método anticonceptivo muy eficaz para prevenir el embarazo durante un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno que se une a la administración de BMP6 humana y para los 125 días después de la última dosis.

Población

[00722] La población de estudio se compone de los pacientes con enfermedad renal terminal que requieren terapia de hemodiálisis crónica por lo menos dos veces por semana, y que tienen evidencia clínica de anemia funcional por deficiencia de hierro, definida como la anemia en la presencia de depósitos de hierro aparentemente suficientes como es determinado por los niveles de ferritina y saturación de transferrina. La parte 1 incluye un plan para evaluar hasta 36 pacientes inicialmente en 6 cohortes (6 pacientes/cohorte). Si después de 6 cohortes, no se observan efectos en TSAT y hemoglobina, y no hay problemas de seguridad (según lo determinado por los investigadores y los representante (s) del Patrocinador aplicables), pueden añadirse hasta 2 cohortes adicionales de 6 pacientes (un total de 48 pacientes en la parte 1). La Parte 2 se compone de hasta 3 categorías (2 niveles de dosis seleccionados para una evaluación adicional de la Parte 1, y un grupo placebo), con un máximo de aproximadamente 20 pacientes por grupo (un total de 60 pacientes en la Parte 2). Por lo tanto, la inscripción de un total de aproximadamente 96 pacientes (hasta un máximo de 108) está prevista,

de los cuales aproximadamente 60 se asignan al azar en la Parte 2. Aproximadamente se espera a 60 pacientes (12 en la Parte 1, 48 en la parte 2) para completar el estudio. El investigador debe garantizar que todos los pacientes que estén siendo considerados para el estudio cumplan con los siguientes criterios de elegibilidad. No hay criterios adicionales que deban ser aplicados por el investigador, con el fin de que la población de estudio sea una representación de todos los pacientes elegibles.

[00723] La selección de pacientes se establecerá mediante la comprobación de todos los criterios de elegibilidad en la detección y en la primera línea de base. Un registro correspondiente (por ejemplo, una lista de comprobación) de los criterios de elegibilidad debe ser almacenada con la documentación original en el sitio de estudio. La desviación de **cualquier** criterio de entrada excluye a un paciente de inscripción en el estudio.

15 **Criterios de inclusión (ambas partes)**

Los pacientes elegibles para su inclusión en este estudio tienen que cumplir **todos** los criterios siguientes:

1. Consentimiento escrito e informado debe ser obtenido antes de realizar cualquier evaluación. Si el consentimiento no se puede expresar por escrito, debe ser documentado y atestiguado formalmente, a ser posible a través de un testigo de confianza independiente
2. Edades $\geq$ 18 años en el proceso de selección.
3. Hemodiálisis-dependiente por lo menos 2 meses antes de la selección.
4. Recepción de hemodiálisis adecuada por lo menos 2 veces por semana para la enfermedad renal en etapa terminal; adecuada se define como $Kt/V \geq 1.2$ en la evaluación mensual más reciente antes de la selección.
5. Recibir terapia crónica con eritropoyetina (EPO), según el protocolo de gestión de la diálisis de la anemia del sitio. Que las dosis EPO no hayan aumentado en un 50% o más durante los 14 días anteriores al inicio del

estudio. La terapia de EPO debe ser de una formulación de acción corta única (no darbepoetina) y administrada IV (no SC).

6. Hgb $\geq$ 8.5, incluyendo Hgb $\geq$ 8.5 and $<$ 11.5 g/dL y sin el aumento de $\geq$ 0,5 g/dl al inicio del estudio frente a los 14 días anteriores.

5 7. La ferritina 200 -2.000 ng/ml (inclusive) durante al menos 28 días antes de la línea de base (puede incluir el proceso de selección).

8. Un TSAT $\leq$ 30% como mínimo en algún momento durante los 90 días anteriores al inicio del estudio, y un TSAT $\leq$ 30% al inicio del estudio.

Criterios de exclusión (ambas partes)

10 [00724] Los pacientes que cumplan con alguno de los siguientes criterios no son elegibles para su inclusión en este estudio. Ninguna exclusion adicionales puede ser aplicada por el investigador, con el fin de asegurar que la población de estudio sea representativa de todos los pacientes elegibles.

1. El uso de otros fármacos en investigación entre 5 vidas medias de inscripción, o hasta que el efecto farmacodinámico esperado haya vuelto a la línea de base, cualquiera que sea más largo.

2. Antecedentes de hipersensibilidad al fármaco en estudio o a anticuerpos terapéuticos.

3. Diagnóstico de hemocromatosis conocido.

20 4. Neoplasia maligna de la médula ósea conocida, malignidad linfática o síndrome mielodisplásico.

5. Historia de la diálisis de trombosis de la fístula de la AV dentro de los 2 meses anteriores a la selección, o 2 o más episodios de trombosis de la fístula AV dentro de los 6 meses anteriores a la selección.

25 6. Enfermedad/disfunción co-mórbida grave del hígado (puntaje Child-Pugh $\geq$ 6) o trasplante de hígado

7. Insuficiencia cardíaca previa (New York Heart Association (NYHA) clase funcional III o IV)

8. Sangrado gastrointestinal que requiera intervención dentro de los últimos 2 meses de selección. Los pacientes con infección por virus de hepatitis C (VHC) se pueden incluir si se cumplen todos los demás criterios de elegibilidad de la función hepática.
- 5 9. ALT, AST o bilirrubina ≥ 1.5 x ULN en las 4 semanas anteriores al inicio del estudio.
10. osteodistrofia renal no controlada definida como la PTH ≥ 750 pg/mL en la selección.
11. Condiciones que predisponen a un mayor riesgo de infección grave, como
- 10 un catéter permanente vascular (vía venosa central o catéter de hemodiálisis) o infección activa que requiere tratamiento antibiótico en cualquier momento durante las 2 semanas anteriores a la selección.
12. Transfusión de sangre administrada dentro de las 4 semanas antes de la línea de base.
- 15 13. Recepción de una dosis de carga (100 mg/semana) de hierro IV dentro de 1 semana antes del inicio del estudio.
14. La historia de abuso de drogas o alcohol en los 12 meses antes de la dosis, o pruebas de tales abusos, como se indica por los ensayos de laboratorio llevados a cabo durante la investigación.
- 20 15. Un resultado positivo de la prueba de antígeno de superficie de hepatitis B.
16. Historia de las enfermedades de inmunodeficiencia, incluyendo resultado de la prueba VIH positivo (ELISA y Western blot).
17. Mujeres en edad fértil pueden ser inscritas en este estudio si se usa anticoncepción altamente efectiva, por un mínimo de 125 días tras la
- 25 administración de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a BMP6 humano. Un anticonceptivo altamente eficaz se define como uno de los siguientes: a. La abstinencia total (cuando esto está en consonancia con el estilo de vida preferido y habitual del paciente), la abstinencia periódica (por ejemplo, el calendario, la ovulación, sintotérmico, métodos post-ovulación) y la abstención no
- 30 son métodos anticonceptivos aceptables) b. Hombre/mujer esterilización c. El uso

de métodos hormonales orales, inyectados o implantados de anticoncepción o la colocación de un dispositivo intrauterino (DIU) o un sistema intrauterino (SIU) u otras formas de anticoncepción hormonal que tienen una eficacia comparable (tasa de fracaso <1%), por ejemplo la hormona del anillo vaginal o la anticoncepción hormonal transdérmica.

Tratamiento

Tratamiento en investigación

La terapia de investigación en este estudio es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a BMP6 humano, por ejemplo un anticuerpo BMP6 anti-IgG1, completamente humano. El anticuerpo se proporciona en solución líquida. La concentración de solución madre se diluye en el sitio de acuerdo con la dosis a administrar. El tiempo de infusión se mantendrá relativamente constante entre cohortes en aproximadamente 30 minutos. La parte 1 será una dosis única de etiqueta abierta, y la Parte 2 será, una dosis única de doble ciego, en comparación con un placebo emparejable (control del transportador). El principio activo Ab BMP6 anti-humano y el placebo se suministran como líquido en viales. Los excipientes en el activo y el placebo son idénticos.

Categorías de tratamiento

[00725] En la Parte 1, a los pacientes serán asignados de una hasta 6 cohortes de dosis que consisten en 6 pacientes cada uno. La parte 1 es un tratamiento abierto. La dosis inicial, la dosis superior, y razón del ajuste de dosis se han descrito anteriormente. Dosis provisionales para la Parte 1 se dan en la Tabla 12 (Hb <0,5 g/dl en MRSD) y Tabla 13 (Hgb ≥ 0.5 g/dL en MRSD).

Tabla 12: niveles de dosis provisionales para la Parte 1

Para Hgb menor a 0,5 g/dl a nivel MRSD de Dosis	Dosis provisional	Incremento de la dosis anterior
1 (MRSD)	0,010 mg/kg	dosis inicial
2	0,016 mg/kg	60% ↑
3	0,025 mg/kg	60% ↑
4	0,040 mg/kg	60% ↑
5	0,063 mg/kg	60% ↑
6 (NOAEL)	0,100 mg/kg	60% ↑

[00726] Esta tabla pretende ser un ejemplo del ajuste de dosis de la parte 1 sólo para orientación. Niveles de dosis intermedias o altas pueden ser utilizadas y algunos niveles de dosis pueden ser omitidos en base a la evaluación de datos durante el análisis del interino informal entre cada cohorte. Niveles de dosis reales serán confirmados por escrito por Novartis y proporcionadas a todos los sitios de estudio participantes antes del tratamiento de los pacientes en una nueva cohorte.

Tabla 13: niveles de dosis provisionales para la Parte 1

Para Hgb mayor que o igual a 0,5 g/dl a nivel MRSD Dosis	Dosis provisional	Incremento de la dosis anterior
1 (MRSD)	0,0100 mg/kg	dosis inicial
2	0,0010 mg/kg	90% ↓
3	0,0016 mg/kg	60% ↑
4	0,0025 mg/kg	60% ↑
5	0,0040 mg/kg	60% ↑
6	0,0063 mg/kg	60% ↑

[00727] Esta tabla pretende ser un ejemplo del ajuste de dosis de la parte 1 sólo para orientación. Niveles de dosis intermedias o altas pueden ser utilizados y

algunos niveles de dosis pueden ser omitidos en base a la evaluación de datos durante el análisis del interino informal entre cada cohorte.

Tratamientos del estudio se definen como:

A: una sola dosis de placebo.

- 5 B: una dosis única de Ab BMP6 anti-humano al PAD mínimo, según lo determinado en la Parte 1.

C: dosis única de Ab BMP6 anti-humano con una sola dosis por encima de PAD mínimo, según lo determinado en la Parte 1.

10 **Tratamiento concomitante**

- [00728] Todos los medicamentos recetados, medicamentos sin prescripción y terapias no farmacológicas significativas (incluyendo la terapia física y las transfusiones de sangre) administrados o adoptadas en el marco de tiempo definido en los criterios de entrada antes del inicio del estudio y durante el estudio,
- 15 deben ser registrados sobre la sección de medicamentos concomitantes/terapias no farmacológicas significativas del CRF. Las entradas de medicamentos deben ser específicas para el nombre comercial, la dosis única y la unidad, la frecuencia y la vía de administración, la fecha de inicio, la suspensión y la razón de la terapia.

20 **Eficacia/Farmacodinamia**

- [00729] Las evaluaciones de eficacia se especifican a continuación. Las muestras para evaluaciones de eficacia serán recogidas en varios puntos de tiempo. Se evaluarán los laboratorios de hematología. Índices de hemoglobina y Fe serán revisados durante cada análisis inter-cohortes intermedio informal como
- 25 parte de la evaluación de ajuste de la dosis durante la Parte 1 del estudio. Si los tiempos de recogida de muestras establecidos inicialmente se consideran óptimos para la comprensión de la relación entre el hierro y PK, los tiempos de recogida de muestras pueden ser alterados en las cohortes posteriores en la parte 1.

Panel de índices de hierro

- [00730] Se espera que el Ab BMP6 antihumano movilice Fe de las reservas corporales resultando en cambios en los parámetros de Fe en suero incluyendo: Suero Fe, saturación de transferrina (TSAT), capacidad de unión de Fe no unido (UIBC), capacidad de unión total de Fe (TIBC), ferritina, y el contenido de hemoglobina de reticulocitos (CHR). Estos serán medidos en el suero utilizando ensayos validados.

Seguridad

- 10 [00731] Las evaluaciones de seguridad se especifican a continuación.

Examen físico

- [00732] Un examen físico completo incluirá el examen de la apariencia general de la piel, el cuello (incluyendo la tiroides), los ojos, las orejas, la nariz, la garganta, los pulmones, el corazón, el abdomen, la espalda, los ganglios linfáticos, las extremidades, vascular y neurológico. Si está indicado en base a la historia clínica y/o síntomas, rectal, genitales externos, de mama y/o exámenes pélvicos se pueden llevar a cabo.

- 20 [00733] Hallazgos significativos que están presentes antes del inicio del fármaco del estudio se deben incluir en la pantalla de Condiciones Médicas concurrentes /Historia médica relevante actual sobre el eCRF del paciente. Conclusiones significativas hechas después del inicio del fármaco del estudio que respondan a la definición de un evento adverso se deben registrar en la pantalla de Eventos Adversos del eCRF del paciente.

25

Signos vitales

- La temperatura del cuerpo
- La presión arterial (PA)
- Pulso

30

Altura y peso

- Altura
- El peso corporal
- El Índice de masa corporal (BMI) se calculará (peso corporal (kg)/[Altura (m)]²)

5

Exámenes de laboratorio

[00734] Desviaciones clínicamente relevantes de los resultados de pruebas de laboratorio se evaluarán en cuanto a criterios definiendo un evento adverso y reportado como tal si se cumplen los criterios. Evaluaciones repetidas son obligatorias hasta la normalización del resultado (s) o hasta que el cambio ya no sea clínicamente relevante.

10

Hematología

[00735] La hemoglobina, el hematocrito, el recuento de glóbulos rojos, el recuento de leucocitos con diferencial y el recuento de plaquetas se medirá. Serán monitoreados los índices de Hierro.

15

Química clínica

[00736] Sodio, potasio, creatinina, urea, cloruro, albúmina, calcio, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, GGT, AST y ALT serán objeto de seguimiento. Si la concentración de bilirrubina total se incrementa por encima de 1,5 veces el límite superior de bilirrubina reactiva directa e indirecta debe ser diferenciado

20

Electrocardiograma (ECG)

[00737] Intervalo PR, duración del QRS, la frecuencia cardíaca, RR, QT, QTc. La fórmula de corrección Fridericia QT (QTcF) se debe utilizar para decisiones clínicas.

25

El embarazo y la evaluación de la fertilidad

[00738] Se requieren pruebas de embarazo de todos los pacientes de sexo femenino, independientemente del estado reproductivo/menopausia reportado.

30

[00739] Pruebas de embarazo en suero se llevarán a cabo para este estudio. Si es positivo, el paciente debe ser descartado del estudio.

[00740] Cuando se realiza en el proceso de selección y línea de base, el resultado de esta prueba debe ser recibido antes de que la paciente puede ser dosificada.

Farmacocinética

[00741] Se recogerán muestras de PK. Los datos PK serán revisados durante cada análisis inter-cohortes intermedio informal como parte de la evaluación de ajuste de la dosis durante la Parte 1 del estudio. Si los tiempos de recogida de muestras establecidos inicialmente se considera inadecuados o inapropiados para caracterizar el perfil PK, los tiempos de recogida de muestras pueden ser alterados en las cohortes posteriores. El número de extracciones de sangre y el volumen sanguíneo total recaudado no excederá el indicados en el protocolo.

[00742] Las muestras PK serán recogidas y evaluados en todos los pacientes en todos los niveles de dosis.

[00743] La concentración de Ab BMP6 anti-humana libre será determinada utilizando un ensayo ELISA. El límite inferior previsto de cuantificación (LLOQ) es de 10 pg/ml.

[00744] Muestras sin tratamiento (placebo) no serán analizadas.

[00745] Concentraciones de Ab BMP6 anti-humanos libres se expresarán µg/mL. Todas las concentraciones por debajo de la LLOQ o datos faltantes serán clasificados como tales en las listas de concentración de datos. Las concentraciones por debajo de la LLOQ serán tratadas como cero en las estadísticas de resumen para los únicos datos de concentración. No se tendrán en cuenta en el cálculo de los parámetros farmacocinéticos.

[00746] Muestras PK restantes después de la determinación de Ab BMP6 anti-humano libre pueden utilizar para evaluaciones exploratorias u otros fines bioanalíticos (por ejemplo, la comprobación cruzada entre diferentes sitios, evaluación de estabilidad).

[00747] Los siguientes parámetros farmacocinéticos se determinarán° (si es posible) utilizando el método no compartimental (s) con Phoenix WinNonlin (Versión 6.2 o superior): Cmax, tmax, AUC (0-t), AUC (0-TLAST), Cmax/D y AUC/D basado en los datos de concentración-tiempo del suero. La regla trapezoidal lineal será utilizada para los cálculos de AUC. La vida media terminal de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a BMP6 humana (t1/2) también se estima si es posible en base a los datos.

Otras evaluaciones

La inmunogenicidad

[00748] Un ensayo ELISA se utiliza para detectar anticuerpos anti-BMP6 humanos. Muestras IG restantes después del análisis de inmunogenicidad se pueden utilizar para la evaluación exploratoria u otros fines bioanalíticos (por ejemplo, cotejar entre diferentes sitios).

Evaluaciones exploratorias

[00749] Los biomarcadores son objetivamente medidos y son indicadores de evaluación de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Grupo de Trabajo Definiciones Biomarcadores 2001).

[00750] La vía BMP6-hepcidina es el siguiente: Se requiere la señalización BMP6 en los hepatocitos para la expresión inducida de la hepcidina, inhibiendo la absorción de hierro por parte del enterocito y la exportación de hierro de los macrófagos. Un anticuerpo BMP6- neutralizante usado como una terapia de disminución de la hepcidina debería beneficiar a los pacientes con anemia por deficiencia de hierro mediante la reducción de los requerimientos de EPO y el aumento del número de pacientes que alcanzan el nivel Hgb objetivo.

[00751] Sobre la base de la biología descrita anteriormente, las evaluaciones de biomarcadores exploratorios incluyen, pero no se limitan a la hepcidina (medida utilizando el ensayo LC-MS).

[00752] Evaluaciones exploratorias adicionales pueden investigar posibles funciones de los marcadores de absorción ósea, así como la inflamación de direcciones como un factor que contribuye al mecanismo de acción.

Los objetivos exploratorios son los siguientes:

- 5 • Evaluar las relaciones entre los niveles de hepcidina y varias medidas clave como los índices de ERI y hierro;
- Estudiar la dinámica entre los puntos finales primarios y secundarios y biomarcadores exploratorios longitudinalmente;
- Evaluar la farmacogenética;
- 10 • Evaluar la inmunogenicidad

Las muestras se recogerán en varios puntos de tiempo.

[00753] Para más detalles sobre la recogida de muestras, la numeración, el procesamiento y el envío serán proporcionadas en un manual de laboratorio central.

ADN

[00754] Se planean estudios de investigación exploratorios de ADN como parte de este estudio con el objetivo de identificar los factores genéticos que pueden (1) estar relacionados con los pacientes en hemodiálisis crónica tratados con eritropoyetina con anemia por deficiencia de hierro funcional, (2) predecir la respuesta al tratamiento con Ab anti- BMP6 humana, o (3) predecir la predisposición genética a los efectos secundarios.

[00755] Además, los recientes avances en las tecnologías de genotipado han hecho posibles enfoques en todo el genoma. Enfoques en el ámbito del genoma también podrán llevarse a cabo en el restringido contexto de estos estudios como se describe anteriormente.

Biomarcadores solubles

[00756] La hepcidina se cuantificará en el plasma como un potencial PD/biomarcador.

5 [00757] Las descripciones detalladas de los ensayos se incluirán en los informes de datos bioanalíticos.

Otros biomarcadores

[00758] Plataformas libre de hipótesis podrían ser utilizados para comprender la heterogeneidad de la enfermedad, el modo de acción y/o potencial de
10 identificación de los marcadores de estratificación. Las muestras de inmunogenicidad (IG) se recogerán en varios puntos de tiempo. La inmunogenicidad de Ab BMP6 anti-humana será evaluada mediante la medición de anticuerpos que reconocen el anticuerpo anti-BMP6 humano.

15 Referencias

Fukuma S, Yamaguchi T, Hashimoto S et al (2012) estimulantes de la eritropoyesis capacidad de respuesta del agente y la mortalidad en pacientes en hemodiálisis: resultados de un estudio de cohorte del registro de diálisis en
Japón. Dis Am J Kidney; 59 (1): p. 108-16.

20 Kilpatrick RD, Critchlow CW, Fishbane S et al (2008) Una mayor respuesta a epoetina alfa se asocia con una mejor supervivencia en pacientes en hemodiálisis. Clin J Am Soc Nephrol;2008. 3 (4): 1077-1083.

López-Gómez JM, JM Portolés, y Aljama P (2008), Factores que condicionan la respuesta a la eritropoyetina en pacientes en hemodiálisis y su relación con la
25 mortalidad. Kidney Int Suppl; (111): S75-81.

Meynard D, L Kautz, Darnaud V et al (2009) La falta de la proteína morfogenética ósea BMP6 induce sobrecarga de hierro masiva. Nat Genet; 41 (4): 478-81.

Saliem S, Patenaude V, Abenhaim HA (2015) Resultados de embarazo entre los receptores de trasplante renal y pacientes con enfermedad renal terminal en

diálisis. J Med Perinat (Epub ahead of print) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719292>.

Suttorp MM, Hoekstra T, Rotmans JI et al (2013) Resistencia a los agentes estimulantes de la eritropoyesis y la mortalidad en pacientes en hemodiálisis y diálisis *peritoneal*. BMC Nephrol; 14 (1): 200.

Zaritsky J, Young B, Gales B, (2010) Reducción de hepcidina sérica por hemodiálisis en pacientes pediátricos y adultos. Clin J Am Soc Nephrol; 5 (6): 1010 a 1014.

[00759] A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un especialista familiarizado con el campo al que pertenece la divulgación.

[00760] A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida per se, como será evidente para la persona experta. La referencia es, por ejemplo, de nuevo hecha a los manuales estándar y la técnica en general mencionados en el presente y para las otras referencias citadas en el mismo. A menos que se indique lo contrario, cada una de las referencias citadas en el presente documento se incorpora en su totalidad por referencia.

[00761] Las reivindicaciones con la invención no son limitantes y se proporcionan a continuación.

[00762] Aunque los aspectos y reclamaciones particulares se han descrito en este documento en detalle, esto se ha hecho a modo de ejemplo para propósitos de solamente ilustración, y no se pretende que sean limitantes con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas, o el alcance de la materia de reclamos de cualquier futura solicitud correspondiente. En particular, se contempla por los inventores que diversas sustituciones, alteraciones y modificaciones pueden hacerse a la divulgación sin apartarse del espíritu y alcance de la descripción como se define por las reivindicaciones. Se cree que la elección del material de partida de ácido nucleico, el clon de interés, o tipo de biblioteca es una cuestión de

rutina para una persona de experiencia ordinaria en la técnica con el conocimiento de los aspectos descritos en este documento. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se consideran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de

5 determinar, usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de los aspectos específicos de la invención descrita en el presente documento. Tales equivalentes están destinados a ser abarcados por las siguientes reivindicaciones. La reformulación del alcance de la reivindicación en las últimas aplicaciones correspondientes presentadas pueden ser debido a las

10 limitaciones de las leyes de patentes de varios países y no debe ser interpretado como la renuncia a la materia objeto de las reivindicaciones.