

ANTICUERPOS ANTI-TMPRSS6 Y SUS USOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º de serie 63/187,150, presentada el 11 de mayo de 2021, cuya descripción completa se incorpora aquí como referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

[002] El contenido del listado de secuencias enviado electrónicamente en un archivo de texto ASCII (Nombre: 728825_RGN9-002PC_ST25.txt; Tamaño: 141,9 kilobytes; Fecha de creación: 10 de mayo de 2022) se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[003] En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a la serina proteasa transmembrana 6 (TMPRSS6). También se describen en el presente documento ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican dichos anticuerpos, células hospedadoras que los comprenden y métodos terapéuticos para usar los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

ANTECEDENTES

[004] La serina proteasa transmembrana 6 (TMPRSS6; también conocida como Matriptase-2 o MTP-2) es una serina proteasa transmembrana de tipo II compuesta por una región intracelular de extremo N corta seguida de un único dominio transmembrana, un único dominio SEA, dos dominios CUB, tres dominios repetidos LDLRa y un dominio de serina proteasa catalítica de extremo C. TMPRSS6 se expresa altamente en el hígado y desempeña un papel en la homeostasis del hierro al regular negativamente la expresión de hepcidina. Los niveles elevados de hepcidina bloquean la exportación de hierro desde las células al disminuir los niveles de un canal de salida de hierro, la ferroportina, desde la superficie celular. TMPRSS6 escinde la hemojuvelina (HJV), lo que da como resultado una disminución de la señalización SMAD y una posterior disminución de la transcripción de *HAMP*, el gen que codifica la hepcidina.

[005] La atenuación de los niveles de expresión de hepcidina puede provocar sobrecarga de hierro o hemocromatosis. Los trastornos por sobrecarga de hierro son un grupo de trastornos que provocan el almacenamiento de un exceso de hierro en el organismo. Como el cuerpo no puede excretar el exceso de hierro, este se almacena en determinados órganos, por ejemplo, el hígado, el corazón y el páncreas. El exceso de hierro almacenado en dichos órganos puede provocar daños en los

órganos y otras enfermedades asociadas, como la diabetes.

[006] Ejemplos de trastornos por sobrecarga de hierro incluyen la hemocromatosis hereditaria (HHC), un trastorno genético en el que el cuerpo absorbe demasiado hierro de la dieta, y la hemocromatosis secundaria, que puede surgir como una complicación en pacientes con ciertos trastornos hematológicos como la talasemia (una tipo de anemia hereditaria causada por una disminución de la producción de hemoglobina) o síndrome mielodisplásico (un cáncer de la sangre que provoca anemia adquirida). En el caso de la beta-talasemia y/o del síndrome mielodispástico, la administración de transfusiones de sangre repetidas para tratar la anemia asociada con la enfermedad a menudo puede resultar en una sobrecarga de hierro.

[007] Las opciones de tratamiento para los trastornos por sobrecarga de hierro son limitadas y, por lo general, se requieren durante toda la vida del paciente. Las opciones de tratamiento incluyen terapia de quelación del hierro, eliminación regular de sangre rica en hierro mediante flebotomía o venesección y restricciones dietéticas para reducir la ingesta de hierro. Existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos adicionales y mejorados para el tratamiento de los trastornos por sobrecarga de hierro.

BREVE COMPENDIO DE LA DESCRIPCIÓN

[008] En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a la proteína serina proteasa transmembrana 6 (TMPRSS6) (es decir, anticuerpos anti-TMPRSS6). En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-TMPRSS6 son anticuerpos completamente humanos que se unen con alta afinidad a TMPRSS6 humana e inhiben su actividad proteasa.

[009] En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína serina proteasa transmembrana 6 (TMPRSS6), en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une al dominio catalítico de TMPRSS6 pero no se une a la tríada catalítica de TMPRSS6.

[010] En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une además en un sitio comprendido dentro del dominio 2 de LDLRa de TMPRSS6. En una modalidad, la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo a TMPRSS6 no ocluye directamente la tríada catalítica de TMPRSS6. En otras modalidades, la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo a TMPRSS6 media la regulación alostérica de TMPRSS6. En ciertas modalidades, la unión del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo a TMPRSS6 media la inhibición alostérica de TMPRSS6.

[011] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína serina proteasa transmembrana 6

(TMPRSS6), en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es un inhibidor alostérico de TMPRSS6. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mantiene TMPRSS6 en una conformación inactiva que es capaz de unirse pero no escindir un sustrato de TMPRSS6. En ciertas modalidades, el sustrato de TMPRSS6 es hemojuvelina (HJV).

5 **[012]** En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína serina proteasa transmembrana 6 (TMPRSS6), en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une dentro del dominio catalítico de TMPRSS6 en un sitio que ocluye estéricamente la tríada catalítica de TMPRSS6. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo compite con la
10 hemojuvelina (HHV) por la unión a TMPRSS6.

[013] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína transmembrana proteasa serina 6 humana (hTMPRSS6) (SEQ ID NO:126), en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo interactúa con uno o más aminoácidos contenidos dentro del dominio extracelular de
15 hTMPRSS6, según se determina por el intercambio de hidrógeno/deuterio.

[014] En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo interactúa con una secuencia de aminoácidos seleccionada de: (a) aminoácidos 125 a 133 de SEQ ID NO: 126; (b) aminoácidos 586-594 de SEQ ID NO: 126; (c) aminoácidos 626 a 650 de SEQ ID NO: 126; (d) aminoácidos 693 a 703 de SEQ ID NO: 126; (e) aminoácidos 704 a 724 de SEQ ID NO: 126; y/o
20 (e) aminoácidos 780 a 805 de SEQ ID NO: 126, según se determina mediante intercambio de hidrógeno/deuterio. En otras modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo interactúa con una secuencia de aminoácidos seleccionada de: (a) aminoácidos 693 a 703 de SEQ ID NO: 126; y/o (b) aminoácidos 780 a 805 de SEQ ID NO: 126, según se determina mediante intercambio de hidrógeno/deuterio. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
25 antígeno del mismo interactúa con una secuencia de aminoácidos seleccionada de: (a) aminoácidos 125 a 133 de SEQ ID NO: 126; (b) aminoácidos 586-594 de SEQ ID NO: 126; (c) aminoácidos 626 a 650 de SEQ ID NO: 126; y/o (d) aminoácidos 704 a 724 de SEQ ID NO: 126, según se determina mediante intercambio de hidrógeno/deuterio.

[015] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al
30 antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína transmembrana proteasa serina 6 (TMPRSS6), en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo interactúa con los residuos G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 y N791 de TMPRSS6 humana (SEQ ID NO: 126), según se determina mediante modelado estructural de microscopía crioelectrónica.

35 **[016]** En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo interactúa

además con los residuos V490, S501, T502, C503, I504, S505 y K508 de TMPRSS6 humana (SEQ ID NO: 126), según se determina mediante modelado estructural por microscopía crioelectrónica.

[017] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína transmembrana proteasa serina 6 (TMPRSS6), en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo interactúa con los residuos R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715 e I716 de TMPRSS6 humana, según se determina mediante modelado estructural por microscopía crioelectrónica.

[018] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína serina proteasa transmembrana 6 (TMPRSS6), en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR); y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR), en donde HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia de HCDR3 enumerada en la Tabla 1.

[019] En ciertas modalidades, la secuencia LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia LCDR3 enumerada en la Tabla 1. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia HCDR1, HCDR2 y HCDR3 enumerada en la Tabla 1. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia LCDR1, LCDR2 y LCDR3 enumerada en la Tabla 1.

[020] En ciertas modalidades, (a) el dominio HCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, 24, 34, 44, 64, 84 o 102; (b) el dominio HCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 66, 86 o 104; (c) el dominio HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 8, 28, 38, 48, 68, 88 o 106; (d) el dominio LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 12, 52, 72, 92 o 110; (e) el dominio LCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 14, 54 o 74; y (f) el dominio LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16, 56, 76, 94 o 112.

[021] En ciertas modalidades, las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera comprenden uno de los siguientes conjuntos de CDR: (a) SEQ ID NO: 4 (HCDR1), SEQ ID NO: 6 (HCDR2), SEQ ID NO: 8 (HCDR3), SEQ ID NO: 12 (LCDR1), SEQ ID NO: 14 (LCDR2) y SEQ ID NO: 16 (LCDR3); (b) SEQ ID NO: 24 (HCDR1), SEQ ID NO: 26 (HCDR2), SEQ ID NO: 28 (HCDR3), SEQ ID NO: 12 (LCDR1), SEQ ID NO: 14 (LCDR2) y SEQ ID NO: 16 (LCDR3); (c) SEQ ID NO: 34 (HCDR1), SEQ ID NO: 36 (HCDR2), SEQ ID NO: 38 (HCDR3), SEQ ID NO: 12 (LCDR1), SEQ ID NO: 14 (LCDR2) y SEQ ID NO: 16 (LCDR3); (d) SEQ ID NO: 44 (HCDR1), SEQ ID NO: 46 (HCDR2),

SEQ ID NO: 48 (HCDR3), SEQ ID NO: 52 (LCDR1), SEQ ID NO: 54 (LCDR2) y SEQ ID NO: 56 (LCDR3); (e) SEQ ID NO: 64 (HCDR1), SEQ ID NO: 66 (HCDR2), SEQ ID NO: 68 (HCDR3), SEQ ID NO: 72 (LCDR1), SEQ ID NO: 74 (LCDR2) y SEQ ID NO: 76 (LCDR3); (f) SEQ ID NO: 84 (HCDR1), SEQ ID NO: 86 (HCDR2), SEQ ID NO: 88 (HCDR3), SEQ ID NO: 92 (LCDR1), SEQ ID NO: 14 (LCDR2), y SEQ ID NO: 94 (LCDR3); o (g) SEQ ID NO: 102 (HCDR1), SEQ ID NO: 104 (HCDR2), SEQ ID NO: 106 (HCDR3), SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 14 (LCDR2), y SEQ ID NO: 112 (LCDR3).

[022] En ciertas modalidades, las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera comprenden el siguiente conjunto de CDR: SEQ ID NO: 44 (HCDR1), SEQ ID NO: 46 (HCDR2), SEQ ID NO: 48 (HCDR3), SEQ ID NO: 52 (LCDR1), SEQ ID NO: 54 (LCDR2) y SEQ ID NO: 56 (LCDR3). En otras modalidades, las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera comprenden el siguiente conjunto de CDR: SEQ ID NO: 102 (HCDR1), SEQ ID NO: 104 (HCDR2), SEQ ID NO: 106 (HCDR3), SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 14 (LCDR2), y SEQ ID NO: 112 (LCDR3).

[023] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a TMPRSS6, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende tres CDR de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de una HCVR y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una LCVR; en donde la HCVR comprende: (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 o 100; (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 o 100; (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 o 100; o (iv) una secuencia de aminoácidos que tiene no más de 12 sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 o 100.

[024] En ciertas modalidades, la LCVR comprende: (a) una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 o 108; (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 o 108; (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 o 108; o (d) una secuencia de aminoácidos que tiene no más de 10 sustituciones de aminoácidos con respecto a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 o 108.

[025] En ciertas modalidades, la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 62, 82 o 100. En ciertas modalidades, la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10, 50, 70, 90 o 108.

[026] En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado de SEQ ID NO: 2/10, 22/10, 32/10, 42/50, 62/70, 82/90, o 100/108. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 42/50. En otras modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 100/108.

[027] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a TMPRSS6, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) y una cadena ligera (LC), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, 30, 40, 58, 78, 96 y 114.

[028] En ciertas modalidades, la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 60, 80, 98 y 116. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende un par de secuencias de aminoácidos HC/LC seleccionado de SEQ ID NO: 18/20, 30/20, 40/20, 58/60, 78/80, 96/98 o 114/116. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende el par de secuencias de aminoácidos HC/LC de 58/60. En otras modalidades, el anticuerpo comprende el par de secuencias de aminoácidos HC/LC de 114/116.

[029] En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de la descripción tienen una o más propiedades seleccionadas entre: (a) es un anticuerpo monoclonal completamente humano o fragmento de unión al antígeno del mismo; (b) se une a TMPRSS6 humana a 25 °C y 37 °C con una constante de disociación (K_D) inferior a aproximadamente 21,2 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (c) se une a TMPRSS6 de mono a 25 °C y 37 °C con una K_D inferior a aproximadamente 25,7 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (d) se une a TMPRSS6 de ratón a 25 °C y 37 °C con una K_D inferior a aproximadamente 703 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (e) se une a células que expresan TMPRSS6 humana con EC_{50} inferior a aproximadamente 2,7 nM; (f) se une a células que expresan TMPRSS6 de mono con EC_{50} inferior a aproximadamente 3,6 nM; (g) se une a células que expresan TMPRSS6 de ratón con EC_{50} inferior a aproximadamente 35 nM; (h) inhibe la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 humana, por ejemplo, inhibe TMPRSS6 humana, con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente 90 %; (i) inhibe la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 humana, por ejemplo, inhibe la TMPRSS6 humana y exhibe una IC_{50} inferior a aproximadamente 200 pM; (j) inhibe la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 de ratón, por ejemplo, inhibe TMPRSS6 de ratón, con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente 42 %; (k) inhibe la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 de ratón, por

ejemplo, inhibe TMPRSS6 de ratón y muestra una IC_{50} inferior a aproximadamente 274 pM; (l) inhibe TMPRSS6 humana a 25 °C y a 37 °C con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente 65 %; (m) inhibe TMPRSS6 humana a 25 °C y 37 °C y exhibe una IC_{50} inferior a aproximadamente 10 nM; (n) inhibe TMPRSS6 de mono a 25 °C y 37 °C con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente 66 %; (o) inhibe TMPRSS6 de mono a 25 °C y 37 °C y exhibe una IC_{50} inferior a aproximadamente 50 nM; (p) inhibe TMPRSS6 de ratón a 25 °C y 37 °C con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente 58 %; (q) inhibe TMPRSS6 de ratón a 25 °C y 37 °C y exhibe una IC_{50} inferior a aproximadamente 35 nM; (r) cuando se administra a un sujeto que lo necesita, disminuye los niveles de hierro sérico del sujeto; (s) cuando se administra a un sujeto que lo necesita, aumenta los niveles de hepcidina en suero del sujeto; (t) cuando se administra a un sujeto que lo necesita, aumenta los niveles de glóbulos rojos maduros del sujeto; (u) cuando se administra a un sujeto que lo necesita, aumenta los niveles de glóbulos rojos maduros en el bazo y/o la médula ósea del sujeto; (v) cuando se administra a un sujeto que lo necesita, aumenta los niveles de hemoglobina del sujeto; o (w) cuando se administra a un sujeto que lo necesita, disminuye los niveles de saturación de transferrina del sujeto. En ciertas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

[030] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que compite por la unión a TMPRSS6 con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en el presente documento.

[031] En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en el presente documento.

[032] En otro aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a TMPRSS6 tal como se describe en la presente y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[033] En otro aspecto, la descripción proporciona una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una HCVR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se describe en el presente documento.

[034] En otro aspecto, la descripción proporciona una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se describe en el presente documento.

[035] En otro aspecto, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos descrita en el presente documento.

[036] En otro aspecto, la descripción proporciona un conjunto de vectores que comprende un primer vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una HCVR de un anticuerpo o

un fragmento de unión al antígeno del mismo como se describe en el presente documento y un segundo vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una LCVR de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se describe en el presente documento.

[037] En otro aspecto, la descripción proporciona una célula hospedadora que comprende un vector o conjunto de vectores como se describe en el presente documento.

[038] En otro aspecto, la descripción proporciona un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a Tmprss6, que comprende cultivar una célula hospedadora de la descripción en condiciones que permitan la producción del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo así producido. En cierta modalidad, el método comprende además formular el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

[039] En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar, prevenir o mejorar al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado con la sobrecarga de hierro, comprendiendo el método administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la descripción a un sujeto que lo necesita.

[040] En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es una anemia diseritropoyética congénita, anemia de Diamond-Blackfan, alfa talasemia, beta talasemia, una anemia hemolítica dependiente de transfusiones, síndrome mielodisplásico, anemia de células falciformes, policitemia vera, hemocromatosis hereditaria o enfermedad hepática crónica. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es beta talasemia. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es beta talasemia mayor o beta talasemia intermedia. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es el síndrome mielodisplásico. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es el síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es una anemia hemolítica dependiente de transfusiones. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es una anemia hemolítica dependiente de transfusión debido a deficiencia de piruvato quinasa, o una anemia hemolítica dependiente de transfusión sideroblástica. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad hepática crónica. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad hepática crónica relacionada con el alcohol, hepatitis C o hepatitis autoinmune.

[041] En ciertas modalidades, la composición farmacéutica se administra de forma profiláctica o terapéutica al sujeto que la necesita. En otra modalidad, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal o intramuscular.

[042] Otras modalidades resultarán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción

detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 **[043]** La FIG. 1 es una representación gráfica del plan de estudio para los estudios de carrera forzada con ratones en el Ejemplo 15.
- 10 **[044]** La FIG. 2 muestra el efecto del tratamiento con REGN7999 sobre la distancia de carrera (FIG. 2A) y la producción de lactato durante la distancia de carrera (FIG. 2B) en ratones $Hbb^{th3/+}$. Los animales de control son ratones C57BL/6 de tipo salvaje (WT) o ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados con anticuerpo de control de isotipo (REGN1945). Nota: Todos los datos de las cifras se presentan como media $\pm$ desviación estándar (DE); $P < 0,05$ indica diferencias estadísticamente significativas según ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple post-hoc de Tukey.
- 15 **[045]** La FIG. 3 muestra la distancia de corrida de ratones C57BL/6 de tipo salvaje (WT) tratados con REGN7999 o con anticuerpo de control de isotipo (REGN1945).
- 20 **[046]** La FIG. 4 muestra los niveles de hepcidina sérica (FIG. 4A), hierro sérico (FIG. 4B) y contenido de hierro hepático (FIG. 4C) en ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados durante 8 semanas con REGN7999 o Acvr2b(L79D)-Fc. Los animales de control son ratones C57BL/6 de tipo salvaje (WT) o ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados con anticuerpo de control de isotipo (REGN1945).
- 25 **[047]** La FIG. 5 muestra el peso corporal medio (g) de ratones WT o $Hbb^{th3/+}$ después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999, Acvr2b(L79D)-Fc o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945). Ratones WT tratados con control de isotipo: círculos, línea continua negra. Ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados con control de isotipo: cuadrados, línea continua gris. Ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados con REGN7999: triángulos (arriba), línea de puntos negra. Ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados con Acvr2b(L79D)-Fc: triángulos (abajo), línea de puntos gris.
- 30 **[048]** La FIG. 6 muestra el peso del bazo medio (g) de ratones WT o $Hbb^{th3/+}$ después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999, Acvr2b(L79D)-Fc o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945).
- 35 **[049]** La FIG. 7 muestra la cantidad de glóbulos rojos maduros esplénicos (% de células $CD44^{bajo}Ter119^{+}$) de ratones WT o $Hbb^{th3/+}$ después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999, Acvr2b(L79D)-Fc o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945).
- 30 **[050]** La FIG. 8 muestra la cantidad de reticulocitos (% de células $CD44^{alto}Ter119^{+}$) de ratones WT o $Hbb^{th3/+}$ después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999, Acvr2b(L79D)-Fc o anticuerpo de control de isotipo (REGN1945).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 35 **[051]** Antes de que se describan los métodos de la presente, debe entenderse que esta descripción

no se limita a los métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente únicamente tiene el fin de describir modalidades particulares y no pretende ser taxativa.

[052] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica en el campo relacionado. Si bien se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente para llevar a la práctica o evaluar las modalidades descritas, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en este documento se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Definiciones

[053] El término "TMPRSS6", también llamado "Matriptasa-2" o "MTP-2" se refiere a la serina proteasa transmembrana 6. TMPRSS6 es una serina proteasa transmembrana de tipo II compuesta por una región intracelular de extremo N corta (residuos 1-55 de TMPRSS6 humana (SEQ ID NO: 126)) seguido de un único dominio transmembrana (residuos 56-76 de SEQ ID NO: 126), un único dominio SEA (proteína de esperma de erizo de mar, enteropeptidasa y agrina) (residuos 84-209 de SEQ ID NO: 126), dos dominios CUB (Cis/Clr, factor de crecimiento embrionario de erizo y proteína morfogénica ósea (BMP)-1) (residuos 213-336 de SEQ ID NO: 126 para el dominio de CUB 1 y los residuos 335- 452 de SEQ ID NO: 126 para el dominio CUB 2) tres dominios repetidos de LDLRa (receptor de lipoproteínas de baja densidad, clase A) (residuos 457-489 de SEQ ID NO: 126 para el dominio 1 de LDLRa, residuos 492-526 de SEQ ID NO: 126 para el dominio 2 de LDLRa, y los residuos 530-567 de SEQ ID NO: 126 para el dominio 3 de LDLRa), y un dominio de serina proteasa catalítica de extremo C (residuos 577-811 de SEQ ID NO: 126). El dominio catalítico de serina proteasa contiene una tríada catalítica de histidina (residuo 617 de TMPRSS6 humana (SEQ ID NO: 126)), aspartato (residuo 668 de SEQ ID NO: 126) y residuos de serina (residuo 762 de SEQ ID NO: 126) (Lee, *Acta Haematol.* (2009) 122(2-3): 87-96; Ramsay et al., *Front. Biosci.* (2008) 13:569-579). Se ha demostrado que TMPRSS6 desempeña un papel en la homeostasis del hierro al actuar como un regulador negativo de la producción de hepcidina mediante la escisión del correceptor de BMP hemojuvelina (HJV) (Dion et al., *Scientific Reports* (2018) 8:12562). La secuencia de aminoácidos de la proteína TMPRSS6 humana de longitud completa (isoforma 2) está ejemplificada por la secuencia de 811 aminoácidos proporcionada en UniProtKB/Swiss-Prot como número de acceso Q8IU80 y corresponde al número de acceso de NCBI NP_705837.1 (TMPS6_HUMAN; SEQ ID NO: 126). La proteína TMPRSS6 humana está codificada por la secuencia de ácido nucleico representada por la secuencia de referencia NCBI NM_153609.3 (SEQ ID NO: 127). La secuencia de aminoácidos de la proteína TMPRSS6 de mono cynomolgous de longitud completa se ejemplifica mediante la secuencia de aminoácidos proporcionada en UniProtKB/Swiss-Prot como número de

acceso A0A2K5VAP0 y corresponde al número de acceso de NCBI XP_005567441.1 (A0A2K5VAP0_MACFA; SEQ ID NO: 128). La proteína TMPRSS6 de mono cynomolgous está codificada por la secuencia de ácido nucleico representada por la secuencia de referencia NCBI XM_005567384 (SEQ ID NO: 129). La secuencia de aminoácidos de la proteína TMPRSS6 de ratón de longitud completa se ejemplifica mediante la secuencia de aminoácidos proporcionada en UniProtKB/Swiss-Prot como número de acceso Q9DBI0 y corresponde al número de acceso de NCBI NP_082178.2 (TMPS6_MOUSE; SEQ ID NO: 130). La proteína TMPRSS6 de ratón está codificada por la secuencia de ácido nucleico representada por la secuencia de referencia de NCBI NM_027902.2 (SEQ ID NO: 131). El término "TMPRSS6" incluye la proteína TMPRSS6 recombinante o un fragmento de la misma. El término también abarca la proteína TMPRSS6 o un fragmento de la misma acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia señal tal como ROR1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 117-119).

[054] El término "aproximadamente", cuando se utiliza en referencia a un valor numérico recitado en particular, significa que el valor puede variar del valor recitado en no más del 1 %. Por ejemplo, como se utiliza aquí, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4... 100,7, 100,8, 100,9).

[055] Se pretende que el término "anticuerpo", como se usa en la presente, haga referencia a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro (es decir, "moléculas de anticuerpos completos"), así como multímeros de estos (por ejemplo, IgM), o fragmentos de unión al antígeno de estos. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada ("HCVR" o "V_H") y una región constante de cadena pesada (compuesta por los dominios C_H1, C_H2 y C_H3). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera ("LCVR" o "V_L") y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En ciertas modalidades de la descripción, los FR del anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) pueden ser idénticos a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de forma natural o artificial. Es posible definir una secuencia consenso de aminoácidos en función de un análisis comparativo de dos o más CDR.

[056] También es posible la sustitución de uno o más residuos de CDR o la omisión de una o más CDR. En la bibliografía científica se han descrito anticuerpos en los que para la unión se puede prescindir de una o dos CDR. Padlan *et al.* (1995, FASEB J. 9:133-139) analizaron las regiones de

contacto entre los anticuerpos y sus antígenos, basándose en estructuras cristalinas publicadas, y concluyeron que solo alrededor de una quinta a una tercera parte de los residuos de CDR realmente entran en contacto con el antígeno. Padlan también encontró muchos anticuerpos en los que una o dos CDR no tenían aminoácidos en contacto con un antígeno (véase también Vajdos *et al.* (2002) J Mol Biol 320:415-428).

[057] Los residuos de CDR que no entran en contacto con el antígeno se pueden identificar basándose en estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDRH2 a menudo no son necesarios), a partir de regiones de las CDR de Kabat que se encuentran fuera de las CDR de Chothia, mediante modelado molecular y/o empíricamente. Si se omite una CDR o residuo(s) de la misma, normalmente se sustituye con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de dichas secuencias. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDR y los aminoácidos a sustituir también se pueden seleccionar empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras.

[058] Los anticuerpos monoclonales anti-TMPRSS6 completamente humanos descritos en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en los marcos y/o CDR de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento con secuencias de la línea germinal disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente descripción incluye anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos aquí descritas, en donde uno o más aminoácidos dentro de uno o más marcos y/o regiones CDR son mutados al(los) residuo(s) correspondiente(s) de la secuencia de línea germinal de la cual el anticuerpo fue derivado, o al(los) residuo(s) correspondiente(s) de otra secuencia de línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos del(los) residuo(s) de línea germinal correspondiente(s) (tales cambios de secuencia se denominan en el presente colectivamente como "mutaciones de línea germinal"). Una persona con conocimientos habituales en la técnica, comenzando con las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera descritas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más mutaciones individuales de la línea germinal o combinaciones de las mismas. En ciertas modalidades, todos los residuos de la estructura y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se mutan de nuevo a los residuos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que se derivó el anticuerpo. En otras modalidades, solo ciertos residuos se mutan de nuevo a la secuencia de la línea germinal original, *por ejemplo*, solo los residuos mutados

que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más del marco y/o residuo(s) de CDR se mutan al(los) residuo(s) correspondiente(s) de una secuencia de línea germinal diferente (*es decir*, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal a partir de la cual se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro del marco y/o regiones CDR, *por ejemplo*, en donde ciertos residuos individuales están mutados al residuo correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular mientras que ciertos otros residuos que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de la línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden probar fácilmente para detectar una o más propiedades deseadas, como especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagonistas mejoradas o potenciadas, inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno obtenidos de esta manera general están abarcados dentro de la presente descripción.

[059] También se describen en el presente documento anticuerpos monoclonales anti-TMPRSS6 completamente humanos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos anti-TMPRSS6 que tienen secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR y/o CDR con, *por ejemplo*, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservadoras relativas a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en el presente documento.

[060] Se pretende que el término "anticuerpo humano" o "anticuerpo completamente humano", como se usa en la presente, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los mAb humanos descritos en el presente documento pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (*p. ej.*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular en CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", o "anticuerpo completamente humano", tal como se utiliza en este documento, no pretende incluir mAb en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (*p. ej.*, ratón), se han injertado en secuencias de FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos de forma recombinante en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. No se pretende que el término

incluya anticuerpos aislados o generados en un sujeto humano.

[061] El término "recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos creados, expresados, aislados u obtenidos mediante tecnologías o métodos conocidos en la técnica como tecnología de ADN recombinante que incluyen, *por ejemplo*, corte y empalme de ADN y expresión transgénica. El término se refiere a anticuerpos expresados en un sistema de expresión de un mamífero no humano (incluidos mamíferos no humanos transgénicos, *por ejemplo*, ratones transgénicos) o de una célula (*por ejemplo*, células CHO) o aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes.

[062] El término "se une específicamente", o "se une específicamente a", o similar, significa que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se puede caracterizar por una constante de disociación en equilibrio de al menos aproximadamente 1×10^{-8} M o menos (*por ejemplo*, una K_D más pequeña denota una unión más estrecha). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, *por ejemplo*, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Como se describe en este documento, los anticuerpos se han identificado mediante resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, BIACORE™, que se unen específicamente a TMPRSS6. Además, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a un dominio en TMPRSS6 y uno o más antígenos adicionales o un biespecífico que se une a dos regiones diferentes de TMPRSS6 se consideran, no obstante, anticuerpos que "se unen específicamente", como se usa en el presente documento.

[063] El término anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a aquellos mAb que tienen una afinidad de unión a TMPRSS6, expresada como K_D , de al menos 10^{-8} M; preferiblemente 10^{-9} M; más preferiblemente 10^{-10} M, incluso más preferiblemente 10^{-11} M, medido mediante resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, BIACORE™ o ELISA de afinidad por solución.

[064] Por el término "velocidad de desaceleración", "Koff" o "kd" se refiere a un anticuerpo que se disocia de TMPRSS6, con una constante de velocidad de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, preferiblemente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, BIACORE™.

[065] Las expresiones "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo y similares, tal como se usan en el presente documento, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que se pueda obtener enzimáticamente, sintético o genéticamente alterado, que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los términos "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a la proteína TMPRSS6.

[066] En modalidades específicas, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la descripción se pueden conjugar con un resto tal como un ligando o un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), un segundo anticuerpo anti-TMPRSS6 o cualquier otro resto terapéutico útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado a TMPRSS6.

[067] Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en la presente, está destinado a hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos (Abs) que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a TMPRSS6, o un fragmento del mismo, está sustancialmente libre de Abs que se unen específicamente a antígenos distintos de TMPRSS6.

[068] El término "resonancia de plasmón superficial", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo utilizando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.).

[069] El término " K_D ", tal como se utiliza aquí, está destinado a referirse a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

[070] El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como paratopo. Un único antígeno puede tener más de un epítipo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas de un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. El término "epítipo" también se refiere a un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. También se refiere a una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Los epítopos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítopos estructurales y tienen aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítopos también pueden ser conformacionales, es decir, estar compuestos de aminoácidos no lineales. En ciertas modalidades, los epítopos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas.

[071] En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente documento comprenden un epítipo o parte de un epítipo que comprende G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 y N791 de TMPRSS6 humana (NP_705837.1; SEQ ID NO: 126). En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente documento comprenden un epítipo o parte de un epítipo que

comprende V490, S501, T502, C503, I504, S505 y K508 de TMPRSS6 humana (NP_705837.1; SEQ ID NO: 126). En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente documento comprenden un epítipo que comprende dos partes de TMPRSS6 humana, comprendiendo la primera parte G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 y N791 de TMPRSS6 humana, y la segunda parte que comprende V490, S501, T502, C503, I504, S505 y K508 de TMPRSS6 humana (NP_705837.1; SEQ ID NO: 126).

[072] En otras modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente documento comprenden un epítipo o parte de un epítipo que comprende R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715 e I716 de TMPRSS6 humana (NP_705837.1; SEQ ID NO: 126).

[073] El término "competencia cruzada", como se usa en el presente documento, significa que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un antígeno e inhibe o bloquea la unión de otro anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. El término también incluye competencia entre dos anticuerpos en ambas orientaciones, es *decir*, un primer anticuerpo que se une y bloquea la unión del segundo anticuerpo y viceversa. En ciertas modalidades, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden unirse al mismo epítipo. Alternativamente, el primer y segundo anticuerpos pueden unirse a epítopos diferentes, pero superpuestos, de modo que la unión de uno inhiba o bloquee la unión del segundo anticuerpo, *por ejemplo, mediante* impedimento estérico. La competencia cruzada entre anticuerpos se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un ensayo de interferometría de biocapa sin etiquetas en tiempo real. La competencia cruzada entre dos anticuerpos se puede expresar como la unión del segundo anticuerpo que es menor que la señal de fondo debido a la autounión (en donde el primer y segundo anticuerpo son el mismo anticuerpo). La competencia cruzada entre 2 anticuerpos se puede expresar, por ejemplo, como % de unión del segundo anticuerpo que es menor que la unión de fondo propia de referencia (en donde el primer y el segundo anticuerpo son el mismo anticuerpo).

[074] El término "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinean de manera óptima con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiados con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 90 %, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases de nucleótidos, medida por cualquier algoritmo de identidad de secuencia bien conocido, como FASTA, BLAST o GAP, como se analiza a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos o sustancialmente similar que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

[075] Aplicado a los polipéptidos, el término "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias de péptidos, cuando están alineadas de manera óptima, como por los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de brecha predeterminados, comparten al menos 90 % de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de los residuos, que no son idénticas, difieren mediante sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es aquella en la que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí mediante sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, que se incorpora en el presente documento como referencia. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amidas: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45, incorporado en el presente documento como referencia. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de log-probabilidad PAM250.

[076] La similitud de secuencia de los polipéptidos normalmente se mide utilizando un software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas compara secuencias similares utilizando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluidas sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el software GCG contiene programas como GAP y BESTFIT que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una muteína de la misma. Véase, *por ejemplo*, GCG Versión 6.1. Las

secuencias de polipéptidos también se pueden comparar usando FASTA con parámetros predeterminados o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (*por ejemplo*, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido al comparar una secuencia con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, que utiliza parámetros predeterminados. Véase, *por ejemplo*, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

[077] Por la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el cual se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento y el experto en la técnica la determinará mediante técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

[078] Tal como se usa en la presente, el término "sujeto" hace referencia a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que necesita mejora, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a TMPRSS6 tal como beta-talasemia o síndrome mielodisplásico. El término incluye sujetos humanos que tienen o están en riesgo de tener dicha enfermedad o trastorno.

[079] Tal como se usan en presente, los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refieren a la reducción o mejora de la gravedad de al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado a TMPRSS6 debido a la administración de un agente terapéutico tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento a un sujeto que lo necesita. Los términos incluyen la inhibición de la progresión de la enfermedad o del empeoramiento de un síntoma/indicación. Los términos también incluyen un pronóstico positivo de la enfermedad, es decir, el sujeto puede estar libre de enfermedad o puede tener una enfermedad reducida tras la administración de un agente terapéutico tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento. El agente terapéutico puede administrarse en una dosis terapéutica al sujeto.

[080] Los términos "prevenir", "que previene" o "prevención" se refieren a la inhibición de la manifestación de una enfermedad o trastorno asociado a TMPRSS6 o cualquier síntoma o indicación de dicha enfermedad o trastorno tras la administración de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento.

Fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos

[081] A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "anticuerpo", tal como se

utiliza en este documento, se entenderá que abarca las moléculas de anticuerpo que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (es decir, "moléculas de anticuerpo completo"), así como los fragmentos de unión al antígeno de las mismas. Las expresiones "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo y similares, tal como se usan en el presente documento, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que se pueda obtener enzimáticamente, sintético o genéticamente alterado, que se una específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los términos "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a la proteína Tmprss6. Un fragmento de anticuerpo puede incluir un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento dAb, un fragmento que contiene una CDR o una CDR aislada. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas mediante cualquier técnica habitual adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de modificación genética recombinante que implican la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y (opcionalmente) constantes de anticuerpos. Dicho ADN se conoce y/o se encuentra fácilmente disponible, por ejemplo, a través de fuentes comerciales, bancos de ADN (incluidos, por ejemplo, bancos de anticuerpos-fagos), o puede sintetizarse. Es posible secuenciar y manipular el ADN químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para ordenar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

[082] Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv monocatenarias (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (*por ejemplo*, una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas genomodificadas, como los anticuerpos específicos de dominio, los anticuerpos de dominio único, los anticuerpos eliminados de dominio, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos injertados por CDR, los diacuerpos, los tricuerpos, los tetracuerpos, los minicuerpos, los nanocuerpos (p. ej., los nanocuerpos monovalentes, los nanocuerpos bivalentes, etc.), los pequeños inmunofármacos modulares (SMIP) y los dominios de la variable de tiburón IgNAR, también están incluidos en la expresión "fragmento de unión al antígeno", tal como se utiliza en el presente documento.

[083] Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos

y generalmente comprenderá al menos una CDR, que es adyacente o está en marco con una o más secuencias marco. En fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados entre sí en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros $V_H -V_H$, $V_H -V_L$ o $V_L -V_L$.

Alternativamente, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

[084] En ciertas modalidades, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones ejemplares, no limitantes, de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo descrito en el presente documento incluyen: (i) $V_H -C_H1$; (ii) $V_H -C_H2$; (iii) $V_H -C_H3$; (iv) $V_H -C_H1-C_H2$; (v) $V_H -C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H -C_H2-C_H3$; (vii) $V_H -C_L$; (viii) $V_L -C_H1$; (ix) $V_L -C_H2$; (x) $V_L -C_H3$; (xi) $V_L -C_H1-C_H2$; (xii) $V_L -C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L -C_H2-C_H3$; y (xiv) $V_L -C_L$. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, que incluyen cualquiera de las configuraciones ejemplares enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar directamente unidos entre sí o pueden estar unidos mediante una bisagra o región enlazadora total o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (*p. ej.*, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/ o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (*por ejemplo*, mediante enlace(s) disulfuro).

[085] Al igual que con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (*p. ej.*, biespecíficos). Un fragmento multiespecífico de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluidos los formatos de anticuerpos biespecíficos ejemplares descritos en el presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo descrito en el presente documento utilizando técnicas de rutina disponibles en la técnica.

Preparación de anticuerpos humanos

[086] Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos humanos en ratones

transgénicos. Cualquiera de estos métodos conocidos se puede utilizar en el contexto de la presente descripción para producir anticuerpos humanos que se unan específicamente a TMPRSS6.

[087] Puede usarse un inmunógeno que comprende cualquiera de los siguientes para generar anticuerpos contra la proteína TMPRSS6. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en el presente documento se obtienen de ratones inmunizados con una proteína TMPRSS6 nativa de longitud completa (véase, por ejemplo, número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot Q8IU80) o con ADN que codifica la proteína o un fragmento de la misma. Alternativamente, la proteína o un fragmento de la misma puede producirse usando técnicas bioquímicas estándar y modificarse y usarse como inmunógeno.

[088] En algunas modalidades, el inmunógeno puede ser una proteína TMPRSS6 recombinante o un fragmento de la misma expresado en *E. coli* o en cualquier otra célula eucariótica o de mamífero tal como células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, SEQ ID NO: 117-119).

[089] Utilizando la tecnología VELOCIMMUNE® (véase, por ejemplo, el documento US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, inicialmente se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra TMPRSS6 que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humanas operativamente unidas a loci de región constante de ratón endógeno de manera que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se aísla y se une operativamente al ADN que codifica las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera humana. Luego, el ADN se expresa en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

[090] Generalmente, un ratón VELOCIMMUNE® se expone al antígeno de interés y se recuperan células linfáticas (como las células B) de los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas pueden fusionarse con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y dichas líneas celulares de hibridoma se examinan y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. El ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera puede aislarse y unirse a regiones constantes isotópicas deseables de la cadena pesada y la cadena ligera. Una proteína de anticuerpo de este tipo puede producirse en una célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se puede aislar directamente de linfocitos específicos de antígeno.

[091] Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable

humana y una región constante de ratón. Como en la sección experimental siguiente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan según las características deseables, incluidas afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano como se describe en el presente documento, por ejemplo IgG1 o IgG4 de tipo salvaje o modificada. Si bien la región constante seleccionada puede variar según el uso específico, las características de alta afinidad de unión al antígeno y especificidad del objetivo residen en la región variable.

Bioequivalentes

[092] Los anticuerpos anti-TMPRSS6 y los fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos, pero que conservan la capacidad de unirse a la proteína TMPRSS6. Dichos anticuerpos variantes y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original, pero exhiben una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Asimismo, las secuencias de ADN que codifican anticuerpos descritas en el presente documento abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia descrita, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aquí descrito.

[093] Dos proteínas de unión al antígenos, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea única dosis o dosis múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de absorción pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes porque dichas diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para alcanzar concentraciones efectivas de fármaco en el cuerpo, *por ejemplo*, en el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el fármaco estudiado en particular.

[094] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígenos son bioequivalentes si no existen diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza o potencia.

[095] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si a un paciente se le puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluido un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o una efectividad disminuida, en comparación con la terapia continuada sin dicho cambio.

[096] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si ambas actúan mediante un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la condición o condiciones de uso, en la medida en que dichos mecanismos sean conocidos.

5 [097] La bioequivalencia puede demostrarse mediante métodos *in vivo* y/o *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, *por ejemplo*, (a) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en la que la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se haya correlacionado con datos de biodisponibilidad humana *in vivo* y que sea razonablemente predictivo de ellos; (c) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos en la que se mide el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su objetivo) en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establezca la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

10 [098] Se pueden construir variantes bioequivalentes de los anticuerpos descritos, por ejemplo, realizando diversas sustituciones de residuos o secuencias o eliminando residuos o secuencias terminales o internas que no son necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica pueden eliminarse o reemplazarse con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos, que modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, *por ejemplo*, mutaciones que eliminan o remueven la glicosilación.

Anticuerpos anti-TMPRSS6 que comprenden variantes de Fc

25 [099] Los anticuerpos a los que se hace referencia en el presente documento normalmente tienen regiones variables completamente humanas, pero pueden tener regiones constantes humanas o de ratón. Como apreciará un experto en la técnica, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc particular se puede convertir en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (*por ejemplo*, un anticuerpo con una Fc IgG1 de ratón se puede convertir en un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluidas las CDR), que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1, seguirán siendo los mismos y se espera que las propiedades de unión al antígeno sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc. En ciertas modalidades, los anticuerpos comprenden una Fc de IgG4 humana. En una modalidad, el Fc de IgG4 humana comprende una mutación de serina a prolina en la región bisagra (S108P) para promover la estabilización del dímero.

30 [0100] Según ciertas modalidades descritas en el presente documento, se proporcionan anticuerpos anti-TMPRSS6 que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones

que mejoran o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, *por ejemplo*, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos anti-TMPRSS6 que comprenden una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, en donde la una o más mutaciones aumentan la afinidad del dominio Fc por FcRn en un ambiente ácido (*por ejemplo*, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Estas mutaciones pueden provocar un aumento de la vida media sérica del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones de Fc incluyen, *por ejemplo*, una modificación en la posición 250 (*por ejemplo*, E o Q); 250 y 428 (*por ejemplo*, L o F); 252 (*por ejemplo*, L/Y/F/W o T), 254 (*por ejemplo*, S o T) y 256 (*por ejemplo*, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (*por ejemplo*, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (*por ejemplo*, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (*por ejemplo*, 308F, V308F), y 434. En una modalidad, la modificación comprende una modificación 428L (*por ejemplo*, M428L) y 434S (*por ejemplo*, N434S); una modificación 428L, 259I (*p. ej.*, V259I) y 308F (*p. ej.*, V308F); una modificación 433K (*por ejemplo*, H433K) y una modificación 434 (*por ejemplo*, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (*por ejemplo*, 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (*p. ej.*, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (*por ejemplo*, 308F o 308P). En otra modalidad más, la modificación comprende una modificación 265A (*por ejemplo*, D265A) y/o una modificación 297A (*por ejemplo*, N297A).

[0101] Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos anti-TMPRSS6 que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas entre: 250Q y 248L (*por ejemplo*, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (*p. ej.*, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (*p. ej.*, M428L y N434S); 257I y 311I (*por ejemplo*, P257I y Q311I); 257I y 434H (*por ejemplo*, P257I y N434H); 376V y 434H (*p. ej.*, D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (*por ejemplo*, T307A, E380A y N434A); y 433K y 434F (*por ejemplo*, H433K y N434F). Todas las combinaciones posibles de las mutaciones del dominio Fc anteriores y otras mutaciones dentro de los dominios variables del anticuerpo descritos en el presente documento se contemplan dentro del alcance de la presente descripción.

[0102] También se describen en el presente documento anticuerpos anti-TMPRSS6 que comprenden una región constante de cadena pesada (C_H) quimérica, en donde la región C_H quimérica comprende segmentos derivados de las regiones C_H de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden comprender una región C_H quimérica que comprende parte o la totalidad de un dominio C_H2 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con parte o la totalidad de un dominio C_H3 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Según

ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en el presente documento comprenden una región C_H quimérica que tiene una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de aminoácidos "bisagra superior" (residuos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 según la numeración EU) derivada de una región de bisagra IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana, combinada con una secuencia de "bisagra inferior" (residuos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 según la numeración EU) derivada de una IgG1 humana, una IgG2 humana o una región de bisagra IgG4 humana. Según ciertas modalidades, la región bisagra quimérica comprende residuos de aminoácidos derivados de una bisagra superior de IgG1 humana o de una IgG4 humana y residuos de aminoácidos derivados de una bisagra inferior de IgG2 humana. Un anticuerpo que comprende una región C_H quimérica como se describe en el presente documento puede, en ciertas modalidades, exhibir funciones efectoras Fc modificadas sin afectar negativamente las propiedades terapéuticas o farmacocinéticas del anticuerpo. (Ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2014/0243504, cuya descripción se incorpora aquí como referencia en su totalidad).

Características biológicas de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos

[0103] En general, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos funcionan uniéndose a la proteína TMPRSS6 e inhibiendo su actividad (*por ejemplo*, una actividad enzimática). En algunas modalidades, la actividad TMPRSS6 inhibida es actividad proteolítica.

[0104] En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a la proteína TMPRSS6 (*es decir*, anticuerpos anti-TMPRSS6 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos). En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-TMPRSS6 o fragmento de unión al antígeno del mismo se une al dominio catalítico de TMPRSS6. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-TMPRSS6 o fragmento de unión al antígeno del mismo se une al dominio catalítico de TMPRSS6 pero no se une a la tríada catalítica de TMPRSS6. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen en un sitio ubicado dentro del dominio LDLRa 2 de TMPRSS6 (*por ejemplo*, residuos 492-526 de TMPRSS6 humana (SEQ ID NO: 126)). En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden unirse o interactuar con más de un sitio en TMPRSS6. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a un sitio dentro del dominio catalítico de TMPRSS6 también puede unirse a un sitio (*por ejemplo*, sitio secundario) comprendido dentro del dominio LDLRa 2 de TMPRSS6.

[0105] Además se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen al dominio catalítico de TMPRSS6 (*por ejemplo*, residuos 577-

811 de TMPRSS6 humana (SEQ ID NO: 126)), en donde la unión no ocluye directamente la tríada catalítica de TMPRSS6. Sin estar ligado a ninguna teoría, cuando la unión de los anticuerpos anti-TMPRSS6 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos no ocluyen directamente la tríada catalítica de TMPRSS6, TMPRSS6 puede conservar su capacidad para unirse a un sustrato, *por ejemplo*, hemojuvelina (HJV). Por ejemplo, en ciertas modalidades, el anticuerpo anti-TMPRSS6 o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a TMPRSS6 y mantiene TMPRSS6 en una conformación inactiva que es capaz de unirse pero no escindir un sustrato de TMPRSS6. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-TMPRSS6 o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a TMPRSS6 y mantiene TMPRSS6 en una conformación inactiva que es capaz de unirse pero no escindir hemojuvelina. Dichos anticuerpos anti-TMPRSS6 y fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden mediar en la regulación alostérica de TMPRSS6. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-TMPRSS6 o fragmento de unión al antígeno del mismo media la inhibición alostérica de TMPRSS6. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a la proteína TMPRSS6 humana y son inhibidores alostéricos de TMPRSS6.

[0106] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen al dominio catalítico de TMPRSS6, en donde la unión ocluye directamente la tríada catalítica de TMPRSS6. Sin estar ligado a ninguna teoría, la oclusión de la tríada catalítica de TMPRSS6 puede dar como resultado un impedimento estérico de la unión del sustrato (*por ejemplo*, hemojuvelina) a TMPRSS6.

[0107] En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno que se unen a la proteína TMPRSS6 humana (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) con una K_D de menos de aproximadamente 25 nM medida por resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 del presente documento. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a TMPRSS6 humana con una K_D de menos de aproximadamente 25 nM, menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 15 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de aproximadamente 9 nM, menos de aproximadamente 8 nM, menos de aproximadamente 7 nM, menos de aproximadamente 6 nM, menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4 nM, menos de aproximadamente 3 nM, menos de aproximadamente 2 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 900 picomolar (pM), menos de aproximadamente 800 pM, menos de aproximadamente 700 pM, menos de aproximadamente 600 pM, menos de aproximadamente 500 pM, menos de aproximadamente 400 pM, menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 200 pM, o menos de aproximadamente 150 pM, medido por resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, usando el formato de ensayo como

se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a TMPRSS6 humana con una K_D en el intervalo de aproximadamente 128 pM a aproximadamente 21,2 nM.

[0108] En el presente documento también se describen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno que se unen a la proteína TMPRSS6 de mono cynomolgous (p. ej., Macaca fascicularis) (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) con una K_D de menos de aproximadamente 30 nM medida por resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 del presente documento. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a TMPRSS6 de mono cynomolgous con una K_D de menos de aproximadamente 30 nM, menos de aproximadamente 25 nM, menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 15 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de aproximadamente 9 nM, menos de aproximadamente 8 nM, menos de aproximadamente 7 nM, menos de aproximadamente 6 nM, menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4 nM, menos de aproximadamente 3 nM, menos de aproximadamente 2 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 900 picomolar (pM), menos de aproximadamente 800 pM, menos de aproximadamente 700 pM, menos de aproximadamente 600 pM, menos de aproximadamente 500 pM, menos de aproximadamente 400 pM, menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 200 pM, menos de aproximadamente 150 pM, menos de aproximadamente 100 pM o menos de aproximadamente 75 pM, medido por resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a TMPRSS6 de mono con una K_D en el intervalo de aproximadamente 65 pM a aproximadamente 25,7 nM.

[0109] En el presente documento también se describen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno que se unen a la proteína TMPRSS6 de ratón (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) con una K_D de menos de aproximadamente 750 nM medida por resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 del presente documento. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a TMPRSS6 de ratón con una K_D de menos de aproximadamente 750 nM, menos de aproximadamente 700 nM, menos de aproximadamente 650 nM, menos de aproximadamente 600 nM, menos de aproximadamente 550 nM, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 450 nM, menos de aproximadamente 400 nM, menos de aproximadamente 350 nM, menos de aproximadamente 300 nM, menos de aproximadamente 250 nM, menos de aproximadamente 200 nM, menos de aproximadamente 150 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos que aproximadamente 1000 picomolar (pM), menos de aproximadamente 900 pM,

menos de aproximadamente 800 pM, menos de aproximadamente 700 pM, menos de aproximadamente 600 pM, menos de aproximadamente 500 pM, menos de aproximadamente 400 pM, menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 200 pM, menos de aproximadamente 150 pM o menos de aproximadamente 100 pM, medida mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos se unen a TMPRSS6 de ratón con una K_D en el intervalo de aproximadamente 82,9 pM a aproximadamente 703 nM.

[0110] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a células que expresan TMPRSS6 humana a una EC_{50} de menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4 nM, menos de aproximadamente 3 nM, menos de aproximadamente 2 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 900 pM, menos de aproximadamente 800 pM o menos de aproximadamente 700 pM, medido, *por ejemplo*, usando un formato de ensayo como se describe en el Ejemplo 5 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a células que expresan TMPRSS6 humana a una EC_{50} en el intervalo de aproximadamente 670 pM a aproximadamente 2,7 nM.

[0111] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a células que expresan TMPRSS6 de mono cynomolgous a una EC_{50} de menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4 nM, menos de aproximadamente 3 nM, menos de aproximadamente 2 nM o menos de aproximadamente 1 nM, medido, *por ejemplo*, usando un formato de ensayo como se describe en el Ejemplo 5 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a células que expresan TMPRSS6 de mono cynomolgous a una EC_{50} en el intervalo de aproximadamente 940 pM a aproximadamente 3,6 nM.

[0112] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a células que expresan TMPRSS6 de ratón a una EC_{50} de menos de aproximadamente 40 nM, menos de aproximadamente 35 nM, menos de aproximadamente 30 nM, menos de aproximadamente 25 nM, menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 15 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4 nM, menos de aproximadamente 3 nM, menos de aproximadamente 2 nM, menos de aproximadamente 1 nM o menos de aproximadamente 0,9 nM, medida, *por ejemplo*, usando un formato de ensayo como se describe en el Ejemplo 5 en el

presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a células que expresan TMPRSS6 de ratón a una EC_{50} en el intervalo de aproximadamente 840 pM a aproximadamente 35 nM.

5 **[0113]** En una modalidad, se describe en el presente documento un anticuerpo recombinante aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína TMPRSS6, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo exhibe una o más de las siguientes características: (a) es un anticuerpo monoclonal completamente humano; (b) se une a TMPRSS6 humana a 25 °C y 37 °C con una constante de disociación (K_D) inferior a aproximadamente 21,2 nM,
10 medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (c) se une a TMPRSS6 de mono a 25 °C y 37 °C con una K_D inferior a aproximadamente 25,7 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (d) se une a TMPRSS6 de ratón a 25 °C y 37 °C con una K_D inferior a aproximadamente 703 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (e) se une a células que expresan TMPRSS6 humana con EC_{50} inferior a aproximadamente 2,7 nM; (f) se une
15 a células que expresan TMPRSS6 de mono con EC_{50} inferior a aproximadamente 3,6 nM; (g) se une a células que expresan TMPRSS6 de ratón con EC_{50} inferior a aproximadamente 35 nM; (h) comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 y/o LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia
20 de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 enumeradas en la Tabla 1; y/o (i) comprende una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia de HCVR enumerada en la Tabla 1 y una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia de LCVR enumerada en la Tabla 1.

25 **[0114]** En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TMPRSS6 y disminuyen los niveles de hierro sérico de un sujeto que lo necesita, por ejemplo, como se demuestra en los Ejemplos 10, 11 y 14 en el presente documento.

[0115] En el presente documento también se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TMPRSS6 y aumentan los niveles séricos de hepcidina de un sujeto que lo necesita, por ejemplo, como se demuestra en los Ejemplos 10, 11 y 14 en el presente
30 documento.

[0116] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TMPRSS6 y aumentan los niveles de glóbulos rojos maduros de un sujeto que los necesita. En ciertas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TMPRSS6 aumentan los niveles de glóbulos rojos maduros
35 en el bazo y/o la médula ósea de un sujeto que los necesita. También se describen en el presente

documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TMPRSS6 y disminuyen el nivel de reticulocitos esplénicos de un sujeto que los necesita. Sin pretender limitarse a ninguna teoría, dichos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TMPRSS6 mejoran la eritropoyesis de un sujeto que los necesita. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a TMPRSS6 y mejoran la eritropoyesis de un sujeto que lo necesita, lo que lleva a una necesidad reducida de eritropoyesis secundaria en el bazo, por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 12 del presente documento.

[0117] En el presente documento también se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TMPRSS6 y aumentan los niveles de hemoglobina de un sujeto que lo necesita, por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 13 en el presente documento.

[0118] En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a TMPRSS6 y disminuyen los niveles de saturación de transferrina de un sujeto que lo necesita, por ejemplo, como se demuestra en el Ejemplo 14 en el presente documento.

[0119] En el presente documento se describe un anticuerpo recombinante aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína TMPRSS6, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo exhibe una o más de las siguientes características cuando se administra a un sujeto que lo necesita: (a) disminuye niveles de hierro sérico del sujeto; (b) aumenta los niveles séricos de hepcidina del sujeto; (c) aumenta los niveles de glóbulos rojos maduros del sujeto; (d) aumenta los niveles de glóbulos rojos maduros en el bazo y/o la médula ósea del sujeto; (e) aumenta los niveles de hemoglobina del sujeto; o (f) disminuye los niveles de saturación de transferrina del sujeto.

[0120] En el presente documento se describen anticuerpos anti-TMPRSS6 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son útiles para disminuir los niveles de hierro sérico de un sujeto que lo necesita. En el presente documento también se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son útiles para aumentar los niveles séricos de hepcidina de un sujeto que lo necesita. En el presente documento también se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son útiles para aumentar los niveles celulares de glóbulos rojos maduros de un sujeto que lo necesita. En el presente documento también se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son útiles para aumentar los niveles celulares de glóbulos rojos maduros en el bazo y/o la médula ósea de un sujeto que lo necesita. En el presente documento también se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son útiles para aumentar los niveles de hemoglobina de un sujeto que lo necesita. En el presente documento también se describen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son útiles para disminuir los niveles de saturación de transferrina de un sujeto que lo necesita.

[0121] En el presente documento se describen anticuerpos anti-TMPRSS6 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación que está asociada con niveles elevados de hierro sérico. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación que está asociada con niveles reducidos de hepcidina en suero. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación que está asociada con niveles celulares de glóbulos rojos maduros reducidos. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación que está asociada con niveles celulares de glóbulos rojos maduros aumentados en el bazo y/o la médula ósea. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación que está asociada con niveles disminuidos de hemoglobina. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación que está asociada con niveles aumentados de saturación de transferrina.

[0122] Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden poseer una o más de las características antes mencionadas, o cualquier combinación de las mismas. Otras características de los anticuerpos descritos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos serán evidentes para una persona con conocimientos habituales en la técnica a partir de una revisión de la presente descripción, incluidos los ejemplos de trabajo en el presente documento.

Inhibición de TMPRSS6

[0123] En el presente documento se describen anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina de la superficie celular (HJV) en presencia de TMPRSS6 humana, *por ejemplo*, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 humana, con un porcentaje de inhibición mayor que aproximadamente 90 % (*por ejemplo*, mayor que aproximadamente 89,2 %, mayor que aproximadamente 89,4 %, mayor que aproximadamente 89,6 %, mayor que aproximadamente 89,8 %, mayor que aproximadamente 90 %, mayor que aproximadamente 90,2 %, mayor que aproximadamente 90,4 %, mayor que aproximadamente 90,6 %, mayor que aproximadamente 90,8 %), medido, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se describe en el Ejemplo 6 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina (HJV) de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 humana, *por ejemplo*, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben

TMPRSS6 humana, que exhiben un valor de IC_{50} que varía entre aproximadamente 70 pM y aproximadamente 200 pM (*por ejemplo*, aproximadamente 69,3 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 110 pM, aproximadamente 120 pM, aproximadamente 130 pM, aproximadamente 140 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 160 pM, aproximadamente 170 pM, aproximadamente 180 pM, aproximadamente 190 pM, aproximadamente 202 pM), medido, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se describe en el Ejemplo 6 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0124] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina (HJV) de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 de ratón, *por ejemplo*, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 de ratón, con un porcentaje de inhibición de aproximadamente 42 % a aproximadamente 98,5 % (*por ejemplo*, aproximadamente 41,6 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 %), medido, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se describe en el Ejemplo 6 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que inhiben la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina (HJV) de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 de ratón, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 de ratón, que exhiben un valor de IC_{50} que varía desde aproximadamente 82,6 pM hasta aproximadamente 274 pM (*por ejemplo*, aproximadamente 81,8 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 110 pM, aproximadamente 120 pM, aproximadamente 130 pM, aproximadamente 140 pM, aproximadamente 150 pM, aproximadamente 160 pM, aproximadamente 170 pM, aproximadamente 180 pM, aproximadamente 190 pM, aproximadamente 200 pM, aproximadamente 210 pM, aproximadamente 220 pM, aproximadamente 230 pM, aproximadamente 240 pM, aproximadamente 250 pM, aproximadamente 260 pM, aproximadamente 276 pM), medido, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se describe en el Ejemplo 6 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0125] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 humana con un porcentaje de inhibición de aproximadamente 65 % a aproximadamente 98 % (*por ejemplo*, aproximadamente 64,5 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 98,9

%), medido, por ejemplo, usando un formato de “bioensayo CM” como se describe en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 humana que exhibe un valor de IC_{50} que varía desde aproximadamente 710 pM hasta más de aproximadamente 10 nM (*por ejemplo*, aproximadamente 703 pM, aproximadamente 750 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 850 pM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 950 pM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 10,1 nM), medido, *por ejemplo*, usando un formato de “bioensayo CM” como se describe en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0126] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 de mono con un porcentaje de inhibición de aproximadamente 66 % a aproximadamente 98 % (*p. ej.*, aproximadamente 65,5 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 98,9 %), medido, *por ejemplo*, usando un formato de “bioensayo CM” como se describe en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 de mono que exhibe un valor de IC_{50} que varía entre aproximadamente 740 pM y más de aproximadamente 50 nM (*por ejemplo*, aproximadamente 733 pM, aproximadamente 750 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 850 pM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 950 pM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 15 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 35 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 45 nM, aproximadamente 50,5 nM), medido, *por ejemplo*, usando un formato de “bioensayo CM” como se describe en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0127] También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 humana (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) con un porcentaje de inhibición de aproximadamente 86 % a aproximadamente 90 % (*por ejemplo*, aproximadamente 85,2 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 91 %), medido, *por ejemplo*, usando un formato de “bioensayo HEK293” como se describe en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben la TMPRSS6 humana (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) que exhiben un valor de IC_{50} que varía entre aproximadamente 360 pM y aproximadamente 5,8 nM (*por ejemplo*, aproximadamente 357 pM, aproximadamente 400 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 600 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente

800 pM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 5 nM), medido, *por ejemplo*, usando un formato de “bioensayo HEK293” como se describe en el Ejemplo 7 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

5 **[0128]** También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 de mono (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) con un porcentaje de inhibición de aproximadamente 81 % a aproximadamente 94 % (*por ejemplo*, aproximadamente 80,2 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 94,9 %), medido, *por ejemplo*, usando un formato de “bioensayo HEK293” como se describe en el Ejemplo 10 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 de mono (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) que exhiben un valor de IC₅₀ que varía entre aproximadamente 660 pM y aproximadamente 30 nM (*por ejemplo*, aproximadamente 654 pM, aproximadamente 700 pM, aproximadamente 750 pM, aproximadamente 800 pM, aproximadamente 15 850 pM, aproximadamente 900 pM, aproximadamente 950 pM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 15 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 30,3 nM), medido, *por ejemplo*, usando un formato de “bioensayo HEK293” como se describe en el Ejemplo 7 del presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

20 **[0129]** También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 de ratón (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) con un porcentaje de inhibición de aproximadamente 58 % a aproximadamente 103 % (*por ejemplo*, aproximadamente 57,5 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 104 %), medido, *por ejemplo*, usando un formato de 25 “bioensayo HEK293” como se describe en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. También se describen en el presente documento anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que inhiben TMPRSS6 de ratón (*por ejemplo*, a 25 °C o a 37 °C) que exhiben un valor de IC₅₀ que varía entre aproximadamente 1,5 nM y aproximadamente 35 nM (*por ejemplo*, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 15 nM, 30 aproximadamente 20 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 35,3 nM), medido, *por ejemplo*, usando un formato de “bioensayo HEK293” como se describe en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0130] En una modalidad, se describe en el presente documento un anticuerpo recombinante aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína 35 TMPRSS6, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo exhibe una o más de las siguientes

características: (a) inhibe la liberación de la superficie celular dependiente de proteasa de la hemojuvelina de superficie celular en presencia de TMPRSS6 humana, por ejemplo, inhibe la TMPRSS6 humana, con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente el 90 %; (b) inhibe la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 humana, por ejemplo, inhibe la TMPRSS6 humana y muestra una IC_{50} inferior a aproximadamente 200 pM; (c) inhibe la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 de ratón, por ejemplo, inhibe TMPRSS6 de ratón, con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente el 42 %; (d) inhibe la liberación dependiente de proteasa de hemojuvelina de la superficie celular en presencia de TMPRSS6 de ratón, por ejemplo, inhibe TMPRSS6 de ratón y muestra una IC_{50} inferior a aproximadamente 274 pM; (e) inhibe TMPRSS6 humana a 25 °C y a 37 °C con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente el 65 %; (f) inhibe TMPRSS6 humana a 25 °C y 37 °C y exhibe una IC_{50} inferior a aproximadamente 10 nM; (g) inhibe TMPRSS6 de mono a 25 °C y 37 °C con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente el 66 %; (h) inhibe TMPRSS6 de mono a 25 °C y 37 °C y exhibe una IC_{50} inferior a aproximadamente 50 nM; (i) inhibe TMPRSS6 de ratón a 25 °C y 37 °C con un porcentaje de inhibición superior a aproximadamente el 58 %; (j) inhibe TMPRSS6 de ratón a 25 °C y 37 °C y exhibe una IC_{50} inferior a aproximadamente 35 nM; (k) es un anticuerpo monoclonal completamente humano o un fragmento de unión al antígeno del mismo; (l) comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 enumerada en la Tabla 1 y/o LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia LCDR1, LCDR2 y LCDR3 enumeradas en la Tabla 1; y/o (m) comprende una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia de HCVR enumerada en la Tabla 1 y una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una secuencia de LCVR enumerada en la Tabla 1.

[0131] Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden poseer una o más de las características antes mencionadas, o cualquier combinación de las mismas. Otras características de los anticuerpos descritos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos serán evidentes para una persona con conocimientos habituales en la técnica a partir de una revisión de la presente descripción, incluidos los ejemplos de trabajo en el presente documento.

Maapeo de epítomos y tecnologías relacionadas

[0132] En el presente documento se describen anticuerpos anti-TMPRSS6 que interactúan con uno o más aminoácidos que se encuentran dentro de una o más regiones de la molécula de proteína TMPRSS6. El epítomo al que se unen los anticuerpos puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (*p. ej.*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más)

aminoácidos ubicados dentro de cualquiera de los dominios antes mencionados de la molécula de proteína TMPRSS6 (*por ejemplo*, un epítipo lineal en un dominio). Alternativamente, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos (o secuencias de aminoácidos) no contiguos ubicados dentro de uno o ambos de los dominios antes mencionados de la molécula de proteína.

5 En una modalidad, el epítipo es un epítipo conformacional.

[0133] Se pueden utilizar diversas técnicas conocidas por expertos en la técnica para determinar si un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas ejemplares incluyen, por ejemplo, ensayos de bloqueo cruzado de rutina, tales como el descrito en *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Otros
10 métodos incluyen análisis mutacional de barrido de alanina, análisis de transferencia de péptidos (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), estudios cristalográficos de análisis de escisión de péptidos y análisis de RMN. Además, se pueden emplear métodos como la escisión de epítipos, la extracción de epítipos y la modificación química de antígenos (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496).

[0134] Otro método que se puede utilizar para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido
15 con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado mediante espectrometría de masas. Por ejemplo, véase el Ejemplo 8 de la presente descripción. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica marcar con deuterio la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo proteína/anticuerpo se transfiere al agua y los protones intercambiables dentro de los
20 aminoácidos que están protegidos por el complejo de anticuerpos se someten a un retrointercambio de deuterio por hidrógeno a un ritmo más lento que los protones intercambiables dentro de los aminoácidos que no forman parte de la interfaz. Como resultado, los aminoácidos que forman parte de la interfaz proteína/anticuerpo pueden retener deuterio y, por lo tanto, exhibir una masa relativamente mayor en comparación con los aminoácidos no incluidos en la interfaz. Después de la
25 disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a escisión por proteasa y análisis de espectrometría de masas, revelando así los residuos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, *por ejemplo*, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[0135] El perfil asistido por modificación (MAP), también conocido como perfil de anticuerpos
30 basado en la estructura del antígeno (ASAP), es un método que clasifica una gran cantidad de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra el mismo antígeno según las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo a superficies antigénicas modificadas química o enzimáticamente (véase el documento US 2004/0101920, incorporado específicamente en el presente documento como referencia en su totalidad). Cada categoría puede reflejar un epítipo único, ya sea claramente
35 diferente o parcialmente superpuesto con el epítipo representado por otra categoría. Esta tecnología

permite un filtrado rápido de anticuerpos genéticamente idénticos, de modo que la caracterización pueda centrarse en anticuerpos genéticamente distintos. Cuando se aplica a la detección de hibridomas, MAP puede facilitar la identificación de clones de hibridomas raros que producen mAb que tienen las características deseadas. Se puede usar MAP para clasificar los anticuerpos descritos en el presente documento en grupos de anticuerpos que se unen a diferentes epítomos.

[0136] La presente descripción incluye anticuerpos anti-TMPRSS6 que se unen al mismo epítomo, o una porción del epítomo, como cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos enumerados en la Tabla 1. Asimismo, también se describen en el presente documento anticuerpos anti-TMPRSS6 que compiten por la unión a la proteína TMPRSS6 o un fragmento de la misma con cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente descripción incluye anticuerpos anti-TMPRSS6 que compiten de forma cruzada por la unión a la proteína TMPRSS6 con uno o más anticuerpos enumerados en la Tabla 1.

[0137] Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítomo que, o compite por la unión con, un anticuerpo anti-TMPRSS6 de referencia utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítomo que un anticuerpo anti-TMPRSS6 de referencia descrito en el presente documento, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína o péptido TMPRSS6 en condiciones de saturación. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula de proteína TMPRSS6. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a TMPRSS6 después de la unión por saturación con el anticuerpo anti-TMPRSS6 de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítomo diferente al del anticuerpo anti-TMPRSS6 de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la proteína TMPRSS6 después de la unión por saturación con el anticuerpo anti-TMPRSS6 de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítomo que el epítomo unido por el anticuerpo anti-TMPRSS6 de referencia aquí descrito.

[0138] Para determinar si un anticuerpo compite por unirse con un anticuerpo anti-TMPRSS6 de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína TMPRSS6 en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de unión del anticuerpo de prueba a la molécula TMPRSS6. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de TMPRSS6 en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de TMPRSS6. Si, en ambas orientaciones, solo el primer anticuerpo (saturante) es capaz de unirse a la molécula de TMPRSS6, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a TMPRSS6. Como apreciará un experto en la técnica, un anticuerpo que compite por unirse con un anticuerpo de

referencia puede no necesariamente unirse al epítipo idéntico que el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia uniéndose a un epítipo superpuesto o epítipo adyacente.

[0139] Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o al epítipo superpuesto si cada uno inhibe (bloquea) competitivamente la unión del otro al antígeno. Es decir, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos 50 %, pero preferiblemente 75 %, 90 % o incluso 99 %, medido en un ensayo de unión competitiva (véase, *por ejemplo*, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítipos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

[0140] Luego se pueden llevar a cabo experimentos de rutina adicionales (*p. ej.*, análisis de mutación y unión de péptidos) para confirmar si la falta observada de unión del anticuerpo de prueba se debe en realidad a la unión al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Se pueden realizar experimentos de este tipo usando ELISA, RIA, resonancia de plasmón superficial, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión de anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica.

Inmunos conjugados

[0141] La descripción abarca un anticuerpo monoclonal anti-TMPRSS6 humana conjugado con un resto terapéutico ("inmunos conjugado"), para tratar una enfermedad o trastorno asociado a TMPRSS6 (*por ejemplo*, un trastorno por sobrecarga de hierro). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inmunos conjugado" se refiere a un anticuerpo que está unido química o biológicamente a un agente radiactivo, una citocina, un interferón, una diana o fracción indicadora, una enzima, un péptido o proteína o un agente terapéutico. El anticuerpo puede estar unido al agente radiactivo, citocina, interferón, fracción diana o indicadora, enzima, péptido o agente terapéutico en cualquier ubicación a lo largo de la molécula siempre que sea capaz de unirse a su diana. Ejemplos de inmunos conjugados incluyen conjugados de fármaco-anticuerpo y proteínas de fusión anticuerpo-toxina. En una modalidad, el agente puede ser un segundo anticuerpo diferente contra la proteína TMPRSS6. El tipo de resto terapéutico que se puede conjugar con el anticuerpo anti-TMPRSS6 tendrá en cuenta la afección a tratar y el efecto terapéutico deseado a lograr. En la técnica se conocen ejemplos de agentes adecuados para formar inmunos conjugados; véase, *por ejemplo*, el documento WO 05/103081.

Administración Terapéutica y Formulaciones

[0142] La descripción proporciona composiciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-TMPRSS6 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento. Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la descripción se administrarán con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar transferencia, administración, tolerancia y similares mejorados. Se puede encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de distintos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[0143] Se conocen varios sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica descrita en el presente documento, *por ejemplo*, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (*ver, por ejemplo*, Wu *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, entre otros, vía intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (*por ejemplo*, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La composición farmacéutica también puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, por ejemplo, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

[0144] También se contempla en el presente documento el uso de nanopartículas para administrar los anticuerpos descritos en el presente documento. Las nanopartículas conjugadas con anticuerpos pueden usarse tanto para aplicaciones terapéuticas como de diagnóstico. Las nanopartículas conjugadas con anticuerpos y los métodos de preparación y uso se describen en detalle en Arruebo, M., *et al.* 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volumen 2009, ID de artículo 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389), incorporado aquí como referencia. Las nanopartículas se pueden desarrollar y conjugar con anticuerpos contenidos en composiciones farmacéuticas para dirigirse a células. También se han descrito nanopartículas para la administración de fármacos, por ejemplo, en los documentos US 8257740 o US 8246995,

cada uno incorporado en el presente documento en su totalidad.

[0145] En ciertas situaciones, la composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede utilizar una bomba. En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos. En otra modalidad más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana de la composición, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica.

[0146] Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracraneales, intraperitoneales e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante métodos públicamente conocidos.

[0147] Las composiciones farmacéuticas descritas se pueden administrar por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración en forma de pluma tiene fácilmente aplicaciones para administrar una composición farmacéutica como se describe en el presente documento. Un dispositivo de administración de pluma de este tipo puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho está vacío, el cartucho vacío se puede desechar fácilmente y reemplazar con un cartucho nuevo que contiene la composición farmacéutica. Entonces se puede reutilizar el dispositivo de administración de pluma. En un dispositivo de administración de pluma desechable, no hay ningún cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de administración de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que se vacía el depósito de la composición farmacéutica, se desecha todo el dispositivo.

[0148] Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para adaptarse a una dosis de los ingredientes activos. Tales formas de dosificación en dosis unitarias incluyen, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc.

Usos terapéuticos de los anticuerpos

[0149] Los anticuerpos anti-TMPRSS6 descritos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno o afección asociada con TMPRSS6 y/o para mejorar al menos un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-TMPRSS6 descrito o fragmento de unión al antígeno del mismo se puede administrar en una dosis terapéutica a un sujeto con una enfermedad

o trastorno o afección asociada con TMPRSS6.

[0150] En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado a TMPRSS6. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno asociado a TMPRSS6 es un trastorno por sobrecarga de hierro. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente descripción son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma de una anemia diseritropoyética congénita, anemia de Diamond-Blackfan, alfa talasemia, beta talasemia, una anemia hemolítica dependiente de transfusiones, síndrome mielodisplásico, anemia de células falciformes, policitemia vera, hemocromatosis hereditaria, hemocromatosis primaria, hemocromatosis secundaria, hemocromatosis juvenil grave o enfermedad hepática crónica.

[0151] En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma, complicación o indicación de beta talasemia. En ciertas modalidades, la beta talasemia es beta talasemia mayor o beta talasemia intermedia. Los síntomas de la beta talasemia incluyen fatiga, debilidad, piel pálida o amarillenta, deformidades de los huesos faciales, crecimiento lento, hinchazón abdominal, orina oscura y otras complicaciones (*p. ej.*, complicaciones debidas a la terapia). Ejemplos de complicaciones de la beta talasemia moderada a grave incluyen la sobrecarga de hierro, que puede ser el resultado de la enfermedad o de transfusiones de sangre frecuentes, y se asocia con daños a órganos como el corazón, el hígado y el sistema endocrino (*p. ej.*, glándulas productoras de hormonas que regulan procesos en todo el cuerpo) y mayor riesgo de infección. Las complicaciones de la beta talasemia grave también pueden incluir deformidades óseas, agrandamiento del bazo, tasas de crecimiento más lentas y problemas cardíacos.

[0152] En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma, complicación o indicación de hemocromatosis. Los síntomas de la hemocromatosis incluyen, por ejemplo, dolor en las articulaciones, dolor abdominal, debilidad, fatiga, diabetes, pérdida del deseo sexual, impotencia, insuficiencia cardíaca, insuficiencia hepática, color de piel bronceado o gris y problemas de memoria. Las complicaciones debidas a la hemocromatosis incluyen, por ejemplo, problemas hepáticos, problemas de páncreas, problemas cardíacos, problemas reproductivos y cambios en el color de la piel.

[0153] En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma, complicación o indicación de sobrecarga de hierro. La sobrecarga de hierro puede ser el resultado de una enfermedad o trastorno genético, o el resultado de recibir transfusiones de sangre frecuentes, consumir altos niveles de

suplementos de hierro y/o recibir inyecciones que contengan hierro. Los trastornos genéticos que provocan una sobrecarga de hierro incluyen hemocromatosis hereditaria, diversas anemias, incluida la anemia falciforme y la anemia sideroblástica, sobrecarga de hierro africana (p. ej., cuando los individuos afectados beben una bebida que contiene una gran cantidad de hierro), deficiencias enzimáticas (p. ej., deficiencias de piruvato quinasa, deficiencias de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) y trastornos del transporte de proteínas como aceruloplasminemia y atransferrinemia.

[0154] Los síntomas de sobrecarga de hierro incluyen, por ejemplo, fatiga (p. ej., fatiga crónica), dolor en las articulaciones, dolor abdominal, enfermedad hepática (p. ej., cirrosis, cáncer de hígado), diabetes mellitus, problemas con el corazón (p. ej., ritmo cardíaco irregular, ataque cardíaco, insuficiencia cardíaca), cambios en el color de la piel (p. ej., bronce, verde grisáceo), pérdida del período, pérdida de deseo sexual, impotencia, infertilidad, hipogonadismo, problemas con los huesos (p. ej., osteoartritis, osteoporosis), pérdida de cabello, agrandamiento del hígado o bazo, hipotiroidismo, hipopituitarismo, depresión, problemas de la función suprarrenal, enfermedades neurodegenerativas de aparición temprana (p. ej., Alzheimer, Parkinson de aparición temprana, Huntington, epilepsia, esclerosis múltiple) y marcadores elevados como azúcar en sangre, enzimas hepáticas, hierro sérico, transferrina sérica y ferritina sérica.

[0155] En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación asociada con la recepción de transfusiones de sangre, *por ejemplo*, recibir transfusiones de sangre frecuentes y/o regulares. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación asociada con un trauma físico que resulta en pérdida de sangre. En ciertas modalidades, el trauma físico que provoca la pérdida de sangre requiere tratamiento con una transfusión de sangre. Como tal, un síntoma o indicación asociada con un trauma físico que resulta en pérdida de sangre puede ser cualquier síntoma o indicación (*por ejemplo*, sobrecarga de hierro) que está asociada con el tratamiento del trauma físico con una transfusión de sangre. Por ejemplo, un trauma físico puede ser un accidente traumático (p. ej., que provoca la pérdida de una extremidad, un traumatismo por objeto contundente, una herida) que provoca una pérdida de sangre que requiere una transfusión de sangre. En ciertas modalidades, la una o más transfusiones de sangre requeridas son transfusiones de sangre de gran volumen.

[0156] En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación del síndrome mielodisplásico. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación del síndrome mielodisplásico con sideroblastos en anillo. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o

fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente descripción son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de una anemia hemolítica dependiente de transfusión. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de una anemia hemolítica dependiente de transfusión debido a deficiencia de piruvato quinasa (es decir, anemia hemolítica), o una anemia hemolítica dependiente de transfusión sideroblástica (es decir, anemia sideroblástica). En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de anemia falciforme. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de anemia diseritropoyética. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de porfiria eritropoyética. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de una enfermedad hepática crónica. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son útiles para tratar o prevenir al menos un síntoma o indicación de una enfermedad hepática crónica relacionada con el alcohol, hepatitis C o hepatitis autoinmune.

[0157] También se describe el uso profiláctico de los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos en sujetos con riesgo de sufrir una enfermedad o trastorno asociado a TMRSS6.

[0158] En algunas modalidades, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se usan para la preparación de una composición farmacéutica o medicamento para tratar sujetos que padecen una enfermedad, trastorno o afección descrita en el presente documento. En otra modalidad, los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se usan como terapia complementaria con cualquier otro agente o cualquier otra terapia conocida por los expertos en la técnica útil para tratar o mejorar una enfermedad, trastorno o afección descrita en el presente documento.

Terapias de combinación

[0159] Las terapias de combinación pueden incluir uno o más de los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos y cualquier agente terapéutico adicional que pueda combinarse ventajosamente con los anticuerpos descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos pueden combinarse sinérgicamente con uno o más fármacos o terapias utilizadas para tratar una enfermedad o trastorno asociado a TMRSS6. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno

descritos se pueden combinar con un segundo agente terapéutico para mejorar uno o más síntomas de dicha enfermedad o afección.

[0160] Dependiendo de la enfermedad, trastorno o afección, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente documento se pueden usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, en donde la enfermedad, trastorno o afección está asociada con una sobrecarga de hierro, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con una o más terapias de reducción de hierro y/o terapias que se emplean actualmente para tratar la sobrecarga de hierro.

[0161] En ciertas modalidades, se puede emplear terapia de quelación de hierro para tratar la sobrecarga de hierro. La terapia de quelación del hierro es la eliminación farmacológica del hierro con un agente quelante del hierro. Ejemplos de agentes quelantes del hierro incluyen deferoxamina, deferasirox y deferiprona. (véase, *por ejemplo*, Mobarra et al., *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* (2016) 10(4): 239-247). Los expertos en la técnica conocen otros ejemplos de agentes quelantes de hierro, *por ejemplo*, los revisados en Hatcher et al., *Future Med. Chem.* (2009) 1(9):1643-70.

[0162] Otras terapias que pueden emplearse para tratar la sobrecarga de hierro incluyen el uso de agentes tales como, entre otros, vitamina E, aceite de germen de trigo, tocofersolano, indicaxantina, ácido fólico, agentes que aumentan los niveles de hemoglobina fetal (*por ejemplo*, hidroxuurea, inhibidores de histona desacetilasa) y/o inhibidores de la ADN metil transferasa (*p. ej.*, derivados de butirato, azacitidina, decitabina (5-aza 2-desoxicitidina) y tricostatina-A), hemina, pomalidomida, talidomida, citocinas como el factor de células madre (SCF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF beta)), agentes para tratar úlceras, agentes para tratar infecciones (*p. ej.*, antibióticos y antivirales), agentes para tratar la trombosis o agentes para tratar la anemia (*p. ej.*, luspatercept).

[0163] La sobrecarga de hierro también se puede tratar con trasplante de células madre o de médula ósea, transfusiones de sangre o flebotomía.

[0164] Como se usa en el presente documento, el término "en combinación con" significa que se pueden administrar componentes terapéuticamente activos adicionales antes, simultáneamente o después de la administración de los anticuerpos anti-TMPRSS6 o fragmentos de unión al antígeno descritos en el presente documento. El término "en combinación con" también incluye la administración secuencial o concomitante de uno o más de los anticuerpos anti-TMPRSS6 o fragmentos de unión al antígeno descritos y un segundo agente terapéutico.

[0165] El uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto antes de la administración de uno o más de los anticuerpos anti-TMPRSS6 descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Por ejemplo, un primer componente puede considerarse administrado "antes" de un segundo componente si el primer componente se administra 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24

horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes o menos de 30 minutos antes de la administración del segundo componente.

[0166] En otras modalidades, el uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto después de la administración de uno o más de los anticuerpos anti-TMPRSS6 descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Por ejemplo, se puede considerar que un primer componente se administra "después" de un segundo componente si el primer componente se administra 30 minutos después, 1 hora después, 2 horas después, 3 horas después, 4 horas después, 5 horas después, 6 horas después, 12 horas después, 24 horas después, 36 horas después, 48 horas después, 60 horas después, 72 horas después o más después de la administración del segundo componente.

[0167] En otras modalidades, el uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto de forma concurrente con la administración de uno o más de los anticuerpos anti-TMPRSS6 descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. La administración "concurrente", a efectos de la presente descripción, incluye, *por ejemplo*, la administración de uno o más de los anticuerpos anti-TMPRSS6 descritos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos y un componente terapéuticamente activo adicional a un sujeto en una sola forma de dosificación, o en formas de dosificación separadas administradas al sujeto dentro de aproximadamente 30 minutos o menos entre sí. Si se administra en formas de dosificación separadas, cada forma de dosificación se puede administrar por la misma vía (*p. ej.*, tanto el anticuerpo anti-TMPRSS6 como el componente terapéuticamente activo adicional se pueden administrar por vía intravenosa, etc.); alternatively, cada forma de dosificación puede administrarse a través de una vía diferente (*por ejemplo*, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito puede administrarse por vía intravenosa y el componente terapéuticamente activo adicional puede administrarse por vía oral). La administración de los componentes en una sola dosis, en formas farmacéuticas separadas por la misma vía, o en formas farmacéuticas separadas por vías diferentes se considera, a efectos de la presente comunicación, "administración concurrente". A los efectos de la presente descripción, la administración de uno o más de los anticuerpos anti-TMPRSS6 descritos o de fragmentos de unión al antígeno de los mismos "antes de", "concurrente con" o "después" (según se definen en el presente documento), de la administración de un componente terapéuticamente activo adicional se considera la administración del anticuerpo anti-TMPRSS6 descrito o de un fragmento de unión al antígeno del mismo "en combinación con" un componente terapéuticamente activo adicional.

[0168] También se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-TMPRSS6 o un fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento

se coformula con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte del presente documento.

Usos diagnósticos de los anticuerpos

5 **[0169]** Los anticuerpos descritos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden usar para detectar y/o medir TMPRSS6 en una muestra, *por ejemplo*, con fines de diagnóstico. En el presente documento se describen usos de los anticuerpos descritos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos en ensayos para detectar una enfermedad o trastorno asociado a TMPRSS6. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para TMPRSS6 pueden comprender, *por*
10 *ejemplo*, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-TMPRSS6 o un fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento que está marcado con un marcador detectable o una molécula indicadora. Los anticuerpos descritos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos también se pueden usar como ligando de captura para aislar selectivamente TMPRSS6 de muestras de un sujeto. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo o fragmento
15 anti-TMPRSS6 no marcado en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que en sí mismo está marcado de manera detectable. El marcador detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Los ensayos
20 ejemplares específicos que se pueden usar para detectar o medir TMPRSS6 en una muestra incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0170] Las muestras que se pueden usar en ensayos de diagnóstico de TMPRSS6 incluyen cualquier muestra de tejido o fluido que se pueda obtener de un paciente, que contenga cantidades
25 detectables de proteína TMPRSS6, o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. Generalmente, los niveles de proteína TMPRSS6 en una muestra particular obtenida de un sujeto sano (*por ejemplo*, un paciente que no padece una enfermedad asociada con TMPRSS6) pueden medirse para establecer inicialmente un nivel inicial o estándar de TMPRSS6. Este valor de referencia de TMPRSS6 se puede comparar luego con los niveles de TMPRSS6
30 medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una afección asociada a TMPRSS6, o síntomas asociados con dicha afección.

[0171] Los anticuerpos anti-TMPRSS6 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden no contener marcadores o restos adicionales, o pueden contener un marcador o resto de extremo N o de extremo C. En una modalidad, el marcador o resto es biotina. En un ensayo de unión, la
35 ubicación de un marcador (si lo hay) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la

superficie sobre la que se une el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina de extremo N se orientará de manera que la porción de extremo C del péptido estará distal a la superficie.

5 EJEMPLOS

[0172] Los siguientes ejemplos se presentan a los efectos de brindarles a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se realizan y se utilizan los métodos y las composiciones descritos en el presente, y no se pretende que limite el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se intentó garantizar la precisión con respecto a números
10 utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debe considerarse la posibilidad de ciertos desvíos y errores experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se expresa en grados centígrados, la temperatura ambiente es de alrededor de 25 °C y la presión es presión atmosférica o una presión cercana a esta.

15

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos humanos contra la serina proteasa 6 transmembrana (TMPRSS6)

[0173] Se generaron anticuerpos humanos contra la proteína TMPRSS6 en un ratón VELOCIMMUNE® que comprende ADN que codifica regiones variables de cadena pesada y ligera
20 kappa de inmunoglobulina humana. Los ratones fueron inmunizados y reforzados con ADN de TMPRSS6 humana mediante administración hidrodinámica de ADN.

[0174] Los anticuerpos anti-TMPRSS6 se aislaron directamente de células B de ratón positivas para antígeno sin fusión con células de mieloma, como se describe en la patente de EE. UU. n° 7,582,298, incorporada específicamente en el presente documento como referencia en su totalidad.
25 Usando este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-TMPRSS6 completamente humanos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes humanos).

[0175] Los anticuerpos ejemplares generados como se describe anteriormente se designaron como mAb37746, mAb37763, mAb37777, mAb37699, mAb41422, mAb41465 y mAb41450, que tienen secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos HCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCVR,
30 LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se identifican en Tabla 1 y Tabla 2.

[0176] Las propiedades biológicas de los anticuerpos ejemplares generados de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen en detalle en los Ejemplos establecidos a continuación.

Ejemplo 2: Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de región variable de cadena pesada y 35 ligera

[0177] La Tabla 1 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera, secuencias de CDR y secuencias de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos anti-TMPRSS6 ejemplares seleccionados.

5

1

Tabla 1: Identificadores de secuencia de aminoácidos

Identificación de anticuerpos	SEQ ID NO:							
	HCVR	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	LCVR	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
mAb37746	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb37763	22	24	26	28	10	12	14	16
mAb37777	32	34	36	38	10	12	14	16
mAb37699	42	44	46	48	50	52	54	56
mAb41422	62	64	66	68	70	72	74	76
mAb41465	82	84	86	88	90	92	14	94
mAb41450	100	102	104	106	108	110	14	112

10 **[0178]** Los identificadores de secuencia de ácido nucleico correspondientes de los anticuerpos anti-TMPRSS6 ejemplares seleccionados se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2: Identificadores de secuencia de ácidos nucleicos

Identificación de anticuerpos	SEQ ID NO:							
	HCVR	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	LCVR	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
mAb37746	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb37763	21	23	25	27	9	11	13	15
mAb37777	31	33	35	37	9	11	13	15
mAb37699	41	43	45	47	49	51	53	55
mAb41422	61	63	65	67	69	71	73	75
mAb41465	81	83	85	87	89	91	13	93

mAb41450	99	101	103	105	107	109	13	111
----------	----	-----	-----	-----	-----	-----	----	-----

[0179] Los anticuerpos pueden tener un isotipo Fc humano o de ratón. Como apreciará un experto en la técnica, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc particular se puede convertir en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (*por ejemplo*, un anticuerpo con una Fc IgG1 de ratón se puede convertir en un anticuerpo con una IgG1 humana o IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluidas las CDR), que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1, seguirán siendo los mismos y se espera que las propiedades de unión al antígeno sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

[0180] A menos que se indique lo contrario, todos los anticuerpos usados en los siguientes ejemplos comprenden un Fc de IgG4 humana que comprende una mutación de serina a prolina en la región bisagra (S108P). Los anticuerpos ejemplares de mAb37746, mAb37763, mAb37777, mAb37699, mAb41422, mAb41465 y mAb41450 que comprenden un Fc de IgG4 humana que comprende una mutación de serina a prolina en la región bisagra (S108P) se designaron como REGN7969, REGN7971, REGN7973, REGN8023, REG N7974, REGN7977, y REGN7999, respectivamente. La Tabla 3 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera de longitud completa de estos anticuerpos.

Tabla 3

Identificación de anticuerpos	Nombre del anticuerpo	SEQ ID NO:			
		HC		LC	
		ADN	PEP	ADN	PEP
mAb37746	REGN7969	17	18	19	20
mAb37763	REGN7971	29	30	19	20
mAb37777	REGN7973	39	40	19	20
mAb37699	REGN8023	57	58	59	60
mAb41422	REGN7974	77	78	79	80
mAb41465	REGN7977	95	96	97	98
mAb41450	REGN7999	113	114	115	116

Ejemplo 3: Unión de anticuerpo a TMPRSS6 según se determina por resonancia de plasmón superficial

Procedimiento experimental

[0181] La constante de disociación de equilibrio (K_D) para la unión de TMPRSS6 a diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) de TMPRSS6 se determinó utilizando un biosensor de resonancia de plasmón de superficie en tiempo real utilizando un instrumento Biacore 4000. Todos los estudios de unión se realizaron en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tampón de ejecución surfactante Tween-20 al 0,05 % v/v, pH 7,4 (HBS-ET) a 25 °C y 37 °C. La superficie del chip sensor Biacore CM5 se derivatizó por primera vez mediante acoplamiento de amina con un mAb de ratón específico de Fc humano para capturar diferentes mAb TMPRSS6. Se usaron varias proteínas reactivas TMPRSS6 para el experimento, incluido el dominio extracelular de TMPRSS6 humana con una mutación S762A expresada con una etiqueta myc-myc-hexahistidina de extremo C (denominada hTMPRSS6_S762A-MMH; REGN5330; SEQ ID NO: 117), *Macaca fascicularis* dominio extracelular de TMPRSS6 con una mutación S751A expresada con una etiqueta myc-myc-hexahistidina de extremo C (denominada mTMPRSS6_S751A-MMH; REGN5977; SEQ ID NO: 119), y dominio extracelular de TMPRSS6 de ratón con una mutación S762A expresada con una etiqueta de myc-myc-hexahistidina extremo C (denominada mTMPRSS6_S762A-MMH; REGN6848; SEQ ID NO: 118). Se inyectaron diferentes concentraciones (100 nM a 3,7 nM, dilución en serie de 3 veces) de las proteínas reactivas TMPRSS6 preparadas en tampón de ejecución HBS-EP sobre la superficie capturada del mAb TMPRSS6 durante 150 segundos a un caudal de 30 μ L/min y se monitorizó su disociación en tampón de ejecución HBS-ET durante 10 minutos. Al final de cada ciclo, la superficie capturada del mAb TMPRSS6 se regeneró utilizando una inyección de 12 segundos de ácido fosfórico 20 mM.

[0182] La tasa de asociación (k_a) y la tasa de disociación (k_d) se determinaron ajustando los sensorgramas de unión en tiempo real a un modelo de unión 1:1 con limitación de transporte de masa utilizando el software de ajuste de curvas Scrubber 2.0 (BioLogic Software). La constante de equilibrio de disociación de unión (K_D) y la vida media disociativa ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las tasas cinéticas como:

$$K_D(M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{y} \quad t_{1/2}(min) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Resultados

[0183] Los parámetros cinéticos de unión de los diferentes mAb de TMPRSS6 seleccionados a cada proteína reactiva de TMPRSS6 se muestran en las Tablas 4 a 9.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb TMPRSS6 que se unen a hTMPRSS6_S762A-MMH a 25 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7969	142 ± 0,6	89	4,04E+05	1,82E-04	4,50E-10	64
REGN7971	164 ± 5	103	4,55E+05	1,47E-04	3,22E-10	79
REGN7973	152 ± 2,8	134	2,52E+05	1,57E-04	6,26E-10	73
REGN7974	156 ± 3	191	2,59E+05	6,80E-04	2,63E-09	17
REGN7977	138 ± 0,4	159	2,18E+05	3,68E-04	1,69E-09	31
REGN7999	131 ± 0,8	176	2,67E+05	6,49E-05	2,43E-10	178
REGN8023	160 ± 1,1	205	6,71E+05	8,60E-05	1,28E-10	134

- 5 **[0184]** Como se muestra en la Tabla 4, los mAb TMPRSS6 seleccionados se unieron a hTMPRSS6_S762A-MMH a 25 °C con valores de K_D que variaban entre aproximadamente 128 pM y aproximadamente 2,63 nM.

Tabla 5: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb TMPRSS6 que se unen a hTMPRSS6_S762A-MMH a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7969	145 ± 3,6	110	2,22E+05	9,75E-04	4,40E-09	12
REGN7971	187 ± 4,6	169	2,61E+05	6,37E-04	2,44E-09	18
REGN7973	176 ± 2,7	164	5,95E+04	1,26E-03	2,12E-08	9
REGN7974	181 ± 3,2	206	1,11E+05	2,35E-03	2,12E-08	4,9
REGN7977	131 ± 1,2	134	1,13E+05	1,24E-03	1,10E-08	9
REGN7999	106 ± 1,5	129	1,54E+05	3,54E-04	2,30E-09	33
REGN8023	147 ± 1,8	205	4,18E+05	9,35E-04	2,24E-09	12

- 15 **[0185]** Como se muestra en la Tabla 5, los mAb TMPRSS6 seleccionados se unieron a hTMPRSS6_S762A-MMH a 37 °C con valores de K_D que variaban entre aproximadamente 2,24 nM y aproximadamente 21,2 nM.

Tabla 6: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb TMPRSS6 que se unen a mfTMPRSS6_S751A-MMH a 25 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7969	142 ± 0,6	92	4,19E+05	1,82E-04	4,35E-10	63
REGN7971	168 ± 2	109	4,87E+05	1,38E-04	2,83E-10	84
REGN7973	157 ± 1,4	132	2,17E+05	5,14E-04	2,37E-09	22
REGN7974	160 ± 1,6	188	2,68E+05	1,92E-03	7,18E-09	6
REGN7977	137 ± 0,5	155	2,25E+05	6,97E-04	3,09E-09	17
REGN7999	130 ± 0,5	185	6,60E+05	7,23E-05	1,10E-10	160
REGN8023	161 ± 3,3	203	8,91E+05	5,79E-05	6,50E-11	199

5

[0186] Como se muestra en la Tabla 6, los mAb TMPRSS6 seleccionados se unieron a mfTMPRSS6_S751A-MMH a 25 °C con valores de K_D que variaban entre aproximadamente 65 pM y aproximadamente 7,18 nM.

10

Tabla 7: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb TMPRSS6 que se unen a mfTMPRSS6_S751A-MMH a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7969	138 ± 1,3	105	2,83E+05	9,24E-04	3,27E-09	12
REGN7971	178 ± 1,8	160	3,63E+05	6,10E-04	1,68E-09	19
REGN7973	168 ± 1,2	145	1,32E+05	3,40E-03	2,57E-08	3,4
REGN7974	173 ± 2	183	2,51E+05	4,05E-03	1,61E-08	2,9
REGN7977	128 ± 0,9	133	2,07E+05	2,47E-03	1,19E-08	4,7
REGN7999	104 ± 1	143	4,08E+05	3,06E-04	7,50E-10	38
REGN8023	144 ± 1,6	206	6,32E+05	6,34E-04	1,00E-09	18

15 **[0187]** Como se muestra en la Tabla 7, los mAb TMPRSS6 seleccionados se unieron a

mfTMPRSS6_S751A-MMH a 37 °C con valores de K_D que variaban entre aproximadamente 750 pM y aproximadamente 25,7 nM.

Tabla 8: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb TMPRSS6 que se unen a mTMPRSS6_S762A-MMH a 25 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7969	140 ± 0,4	4	NB*	NB*	NB*	NB*
REGN7971	169 ± 1,2	5	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
REGN7973	158 ± 0,9	7	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
REGN7974	160 ± 0,5	3	NB*	NB*	NB*	NB*
REGN7977	136 ± 0,9	20	2,88E+05	6,70E-02	2,33E-07	0,17
REGN7999	128 ± 0,4	178	4,16E+05	3,45E-05	8,29E-11	334
REGN8023	157 ± 1,5	209	5,99E+05	1,10E-03	1,84E-09	10

- NB* indica que no se observó unión en las condiciones experimentales particulares de este Ejemplo.

- IC[#] indica que los datos de unión observados no fueron concluyentes y los parámetros cinéticos de unión no pudieron determinarse en las condiciones experimentales particulares de este ejemplo.

[0188] Como se muestra en la Tabla 8, tres de siete mAb TMPRSS6 seleccionados se unieron a mTMPRSS6_S762A-MMH a 25 °C con valores de K_D que variaban entre aproximadamente 82,9 pM y aproximadamente 233 nM.

Tabla 9: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb TMPRSS6 que se unen a mTMPRSS6_S762A-MMH a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	100 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7969	128 ± 0,8	2	NB*	NB*	NB*	NB*
REGN7971	170 ± 2,2	15	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
REGN7973	162 ± 4,1	12	IC [#]	IC [#]	IC [#]	IC [#]
REGN7974	164 ± 0,9	3	NB*	NB*	NB*	NB*

REGN7977	123 ± 0,7	9	3,23E+05	2,27E-01	7,03E-07	0,05
REGN7999	99 ± 0,8	130	5,05E+05	1,60E-04	3,17E-10	72
REGN8023	138 ± 1,4	189	2,69E+05	6,66E-03	2,47E-08	1,7

- NB* indica que no se observó unión en las condiciones experimentales particulares de este Ejemplo.

- IC# indica que los datos de unión observados no fueron concluyentes y los parámetros cinéticos de unión no pudieron determinarse en las condiciones experimentales particulares de este ejemplo.

5

[0189] Como se muestra en la Tabla 9, tres de siete mAb TMPRSS6 seleccionados se unieron a mTMPRSS6_S762A-MMH a 37 °C con valores de K_D que variaban entre aproximadamente 317 pM y aproximadamente 703 nM.

10 **Ejemplo 4: Competencia cruzada entre anticuerpos monoclonales anti-TMPRSS6 seleccionados**

Procedimiento experimental

[0190] La competencia de unión entre anticuerpos monoclonales (mAb) TMPRSS6 se determinó mediante un ensayo de interferometría de biocapa (BLI) sin etiquetas en tiempo real en la plataforma de biosensor Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Todo el experimento se realizó a 25 °C en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo Tween-20 al 0,05 % v/v, BSA 1 mg/ml, NaN_3 al 0,02 %, pH 7,4 (HBS-EBT) tampón con agitación de la placa a una velocidad de 1000 rpm. Para evaluar si 2 mAb son capaces de competir entre sí para unirse a sus respectivos epítomos en TMPRSS6, una proteína recombinante compuesta por el dominio extracelular de TMPRSS6 humana expresado con una mutación S762A y una etiqueta myc-myc-hexahistidina de extremo C (denominada hTMPRSS6_S762A-MMH; REGN5330SEQ ID NO: 117) se capturó primero en puntas de biosensor Octet recubiertas con anticuerpo anti-penta-His (HIS1K) sumergiendo las puntas del biosensor durante 1 minuto en pocillos que contenían una solución de 10 µg/ml de hTMPRSS6_S762A-MMH. Las puntas del biosensor capturado hTMPRSS6_S762A-MMH luego se saturaron con el primer mAb TMPRSS6 (denominado mAb-1) sumergiéndolo en pocillos que contenían una solución de 50 µg/ml de mAb-1 durante 4 minutos. Posteriormente, las puntas del biosensor se sumergieron en pocillos que contenían una solución de 50 µg/ml del segundo mAb TMPRSS6 (denominado mAb-2) durante 3 minutos. Las puntas del biosensor se lavaron en tampón HBS-EBT entre cada paso del experimento. La respuesta de unión en tiempo real se monitoreó durante todo el transcurso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada paso.

Resultados

[0191] Se comparó la respuesta de la unión de mAb-2 a hTMPRSS6_S762A-MMH precomplejado

con mAb-1 y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes mAb de Tmprss6 seleccionados como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Competencia cruzada entre anticuerpos monoclonales anti-Tmprss6

5

mAb1	Se ha demostrado que mAb-2 compite con mAb-1
REGN7974	REGN7974
	REGN7973
	REGN7977
	REGN7999
REGN7973	REGN7974
	REGN7973
	REGN7977
	REGN7999
REGN7977	REGN7974
	REGN7973
	REGN7977
	REGN7999
REGN7999	REGN7974
	REGN7973
	REGN7977
	REGN7999
REGN7969	REGN7969
	REGN7971
	REGN8023
REGN7971	REGN7969
	REGN7971
	REGN8023
REGN8023	REGN7969
	REGN7971
	REGN8023

Ejemplo 5: Unión de anticuerpos a células que expresan TMPRSS6

Procedimiento experimental

[0192] Para evaluar la unión celular mediante los anticuerpos anti-TMPRSS6 descritos, se genomodificaron células HEK293 para sobreexpresar de forma estable TMPRSS6 de longitud completa de ser humano (secuencia de referencia NCBI NM_001289001), mono cynomolgous/*Macaca fascicularis* (secuencia de referencia NCBI XM_005567384) y ratón (secuencia de referencia NCBI NM_027902.2), y estas líneas celulares se denominan HEK293/hTMPRSS6, HEK293/mfTMPRSS6 y HEK293/mTMPRSS6, respectivamente. Además, las células HEK293 se genomodificaron para sobreexpresar de forma estable una TMPRSS6 humana de longitud completa catalíticamente inactiva, donde la serina en la posición 753 de la secuencia de referencia NCBI NM_001289001 se cambió a una alanina. Esta línea celular se denomina HEK293/hTMPRSS6 (S762A). Todas las líneas celulares no estaban clasificadas, excepto la línea celular TMPRSS6 de ratón (HEK293/mTMPRSS6), que se clasificó para una alta expresión de TMPRSS6 de ratón.

[0193] Para evaluar la unión de los anticuerpos anti-TMPRSS6 de la presente descripción al receptor expresado en la superficie celular, los anticuerpos (incluido un control de subclase IgG) se diluyeron en serie en tampón de ensayo (PBS sin Ca^{++} y Mg^{++} que contenía FBS al 2 %) de 375 nM a 22,9 pM (más una muestra que contiene tampón de ensayo solo sin molécula de prueba) y se incubó con $0,5 \times 10^6$ células/pocillo a 4 °C durante 30 minutos en tampón de ensayo. Después de la incubación con anticuerpos primarios, las células se tiñeron con 4,0 µg/ml de anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor®-647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., antihumano nº 109-607-003) a 4 °C durante 30 minutos. Las células se fijaron utilizando BD CytoFix™ (Becton Dickinson, # 554655) y se analizaron en los citómetros de flujo IQue® o IQue®Plus (Intellicyt®). También se analizaron controles sin teñir y con anticuerpo secundario solo para todas las líneas celulares. Los resultados se analizaron utilizando el software ForeCyt® (IntelliCyt®) para determinar las medias geométricas de fluorescencia para células viables y la relación de unión se calculó normalizando el valor medio geométrico de la condición de prueba por el valor medio geométrico de las células no teñidas correspondientes.

Resultados

[0194] La Tabla 11 muestra la unión de anticuerpos anti-TMPRSS6 seleccionados a células genomodificadas para expresar hTMPRSS6, hTMPRSS6 (S762A), mfTMPRSS6 y mTMPRSS6.

Tabla 11: Unión de anticuerpos anti-TMPRSS6 a células HEK293/TMPRSS6

	MFI – Control normalizado a sin teñir
--	---------------------------------------

TMPRSS6 expresada en células HEK293	Sin TMPRSS6		hTMPRSS6		hTMPRSS6 (S762A)		mfTMPRSS6		mTMPRSS6	
mAb	Máx. Enlace plegado	EC₅₀ (M)	Máx. Enlace plegado	EC₅₀ (M)	Máx. Enlace plegado	EC₅₀ (M)	Máx. Enlace plegado	EC₅₀ (M)	Máx. Enlace plegado	EC₅₀ (M)
REGN7969	3	Sin enlace	52	6,7E-10	170	2,0E-09	50	1,2E-09	1	Sin enlace
REGN7971	3	Sin enlace	66	9,7E-10	209	1,7E-09	75	1,5E-09	1	Sin enlace
REGN7973	4	Sin enlace	58	2,7E-09	145	2,0E-09	91	3,3E-09	42	3,5E-08
REGN7974	3	Sin enlace	54	2,4E-09	234	2,3E-09	50	3,6E-09	1	Sin enlace
REGN7977	5	3,1E-08	69	1,9E-09	156	1,6E-09	78	2,4E-09	125	9,1E-09
REGN7999	4	Sin enlace	50	2,2E-09	420	2,2E-09	79	2,0E-09	421	4,5E-09
REGN8023	3	Sin enlace	47	7,0E-10	300	2,0E-09	52	9,4E-10	296	8,4E-10
Control de subclases de hlgG	2	Sin enlace	1	Sin enlace	3	Sin enlace	1	Sin enlace	1	Sin enlace

anti- humano 2" solo	2	Sin enlac e	1	Sin enlac e	2	Sin enlac e	1	Sin enlac e	1	Sin enlac e
-------------------------------------	---	-------------------	---	-------------------	---	-------------------	---	-------------------	---	-------------------

[0195] Como se muestra en la Tabla 11, los anticuerpos anti-TMPRSS6 seleccionados mostraron unión a TMPRSS6 S762A humana, de mono cynomolgous expresado en células HEK293. El intervalo de proporciones máximas de unión y valores de EC₅₀ fue de aproximadamente 47 a 69 veces y aproximadamente de 670 pM a 2,7 nM para las células que expresan hTMPRSS6, aproximadamente de 145 a 420 veces y aproximadamente de 1,6 a 2,3 nM para las células que expresan hTMPRSS6 (S762A), y aproximadamente 50 a 91 veces y aproximadamente 940 pM a 3,6 nM para células que expresan mfTMPRSS6. Para los cuatro mAb que se unieron a células que expresan mTMPRSS6, el rango de proporciones máximas de unión y valores de EC₅₀ fueron de aproximadamente 42 a 421 veces y de aproximadamente 840 pM a 35 nM. Los anticuerpos anti-TMPRSS6 seleccionados demostraron unión a células originales HEK293, con relaciones de unión de aproximadamente 3 a 5 veces. Las muestras de anticuerpo de control de subclase de IgG (control de subclase de hIgG) y de anticuerpo secundario solo (anti-humano 2" solo) demostraron relaciones de unión que variaban entre aproximadamente 1 y 3 veces.

Ejemplo 6: Detección de hemojuvelina humana (HJV)

Procedimiento experimental

[0196] Para caracterizar mejor la capacidad de los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-TMPRSS6 para inhibir TMPRSS6, se utilizó un bioensayo celular con dos lecturas diferentes. TMPRSS6 actúa como un regulador negativo de la expresión de hepcidina al escindir la hemojuvelina de la superficie celular (HJV). Véase, *por ejemplo*, Rausa et al. *J. Cell. Mol. Med.* (2015) 19:879-888; y Lee P., *Acta Haematol.* (2009) 122:87-96.

[0197] Para el ensayo, se usó citometría de flujo para medir la hemojuvelina humana (hHJV) de la superficie celular y se realizó un ensayo ELISA para cuantificar el nivel de hHJV soluble en células HEK293 que expresan HJV humana de longitud completa y TMPRSS6 humana o de ratón. Las líneas celulares del bioensayo de coexpresión se genomodificaron utilizando células HEK293 que expresan hHJV como línea celular original (hHJV; aminoácido 1-426, secuencia de referencia NCBI NP_998818.1). La línea celular original con expresión estable de HJV humana se seleccionó con 500 µg/mL de G418 en Eagle Media modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 100 unidades de penicilina, 100 µg de estreptomycin y 292 µg/ml de L-glutamina. Estas células HEK293 que expresan hHJV (HEK293.hHJV) se enriquecieron luego para una alta expresión en la superficie celular de hHJV mediante FACS (anticuerpo anti-hemojuvelina; Abcam

ab54431, IgG anti-ratón AF647 de burro; Invitrogen A-31571). Para expresar TMPRSS6, se transdujeron HEK293.hHJV con sobrenadantes lentivirales para TMPRSS6 humana de longitud completa (hTMPRSS6; aminoácidos 1-811, secuencia de referencia NCBI NM_153609.3) o TMPRSS6 de ratón de longitud completa (mTMPRSS6; aminoácidos 1-811, secuencia de referencia NCBI NM_027902.2) con una etiqueta myc triple de extremo C. Las líneas celulares resultantes se denominaron HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6 y HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6, respectivamente). Las células transducidas con lentivirus se seleccionaron adicionalmente con 500 µg/ml de G418 y 100 µg/ml de higromicina B durante 2 semanas, y se clasificaron para poblaciones de TMPRSS6 de alta expresión utilizando el anticuerpo anti-Myc-AF647.

[0198] Para ELISA, las líneas celulares de ensayo se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano con 1×10^4 células/pocillo. Los anticuerpos de la presente descripción, así como los controles, se diluyeron en serie (de 0 nM a 200 nM), luego se agregaron a cada pocillo que contenía un volumen final de 100 µL y se incubaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, los sobrenadantes se recolectaron y se realizó un ELISA utilizando el kit ELISA humano RGM-C/Hemojuvelina DuoSet (R&D Systems, DY3720-05) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La densidad óptica se obtuvo utilizando SpectraMax i3 (Molecular Devices) y los resultados se analizaron con el software Prism (GraphPad) para obtener valores de IC₅₀. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición , [\%]} = \frac{\text{HJV soluble}_{\text{referencia}} - \text{HJV soluble}_{\text{anticuerpo}}}{\text{HJV soluble}_{\text{referencia}} - \text{HJV soluble}_{\text{inhibidor de proteasa}}} \times 100$$

[0199] En esta ecuación, “HJV soluble_{referencia}” indica la cantidad de HJV soluble del sobrenadante de células de sobreexpresión de HJV-TMPRSS6 en ausencia de tratamiento con anticuerpos o inhibidores de proteasa. “HJV soluble_{anticuerpo}” indica la cantidad de HJV soluble de la concentración máxima de muestras de ensayo tratadas con anticuerpos, y “HJV soluble_{inhibidor de proteasa}” indica la cantidad de HJV soluble del inhibidor de la proteasa de serina, aprotinina (Sigma, Cat: 10236624001), muestra tratada.

[0200] Para el análisis FACS, se trataron células HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6 o células HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6 con 50 nM de anticuerpos anti-TMPRSS6 durante la noche. Al día siguiente, se recogieron las células para teñir la superficie. Para teñir la superficie celular del hHJV en líneas celulares de ensayo, las células se bloquearon con un bloqueador de FcR (Miltenyi Biotec, 130-059-901) y se tiñeron con un anticuerpo anti-hemojuvelina (Abcam ab54431, 1:400, en hielo, 1 hora) seguido de incubación con un anticuerpo IgG AF647 anti-ratón de burro (Invitrogen A-

31571, 1:2000, en hielo, 40 minutos). Las células teñidas se midieron utilizando un citómetro de flujo (BD) Accuri C6.

[0201] En el ensayo ELISA, se incluyeron como controles un inhibidor de serina proteasa, aprotinina (2 µg/ml) y un cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma, Cat: P-1860, 1:200) para bloquear la actividad de proteasa en células HEK293.hHJV/3xMyc. TMPRSS6. Para FACS, se incluyó aprotinina (2 µg/ml) como control para bloquear la actividad de la proteasa en células HEK293.hHJV/3xMyc.TMPRSS6.

Resultados

[0202] La Tabla 12 muestra la inhibición de la liberación de HJV dependiente de proteasa desde la superficie celular mediante anticuerpos anti-TMPRSS6.

Tabla 12: Eficacia de bloqueo de anticuerpos TMPRSS6 en líneas celulares de sobreexpresión HEK293.hHJV/3xMyc.TMPRSS6 medida mediante ELISA

Líneas celulares de ensayo	HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6		HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6	
<i>mAb</i>	Inhibición (%)	IC ₅₀ [M]	Inhibición (%)	IC ₅₀ [M]
REGN7969	> 99	7,12E-11	< 1	N/A
REGN7971	89,9	7,74E-11	10,2	N/A
REGN7973	> 99	1,99E-10	9,4	N/A
REGN7974	> 99	1,54E-10	11,8	N/A
REGN7977	> 99	1,27E-10	46,4	N/A
REGN7999	> 99	1,02E-10	98,5	8,26E-11
REGN8023	> 99	1,49E-10	42,0	2,74E-10
Control de isotipos	15,7	N/A	5,2	N/A
Sin tratar	0,0	N/A	< 1	N/A
Aprotinina	> 99	N/A	> 99	N/A
Cóctel inhibidor de proteasa	>99	N/A	>99	N/A

N/A – No aplicable.

[0203] Como se muestra en la Tabla 12, todos los anticuerpos seleccionados frente a TMPRSS6 mostraron > 90 % de inhibición de la liberación de HJV dependiente de la proteasa de la superficie celular en células que expresan TMPRSS6 humana y valores de IC₅₀ que varían entre

aproximadamente 70 y aproximadamente 200 pM. Dos anticuerpos, REGN7999 y REGN8023, mostraron efectos inhibidores en células que expresan TMPRSS6 de ratón, demostrando aproximadamente un 98,5 % y aproximadamente un 42 % de inhibición de la actividad de la proteasa TMPRSS6 de ratón y valores de IC₅₀ de aproximadamente 82,6 pM y aproximadamente 274 pM, respectivamente.

[0204] La Tabla 13 muestra la inhibición de la expresión de HJV en la superficie celular mediante anticuerpos anti-TMPRSS6.

Tabla 13: Nivel de expresión de la superficie celular de hemojuvelina en líneas celulares de sobreexpresión de HEK293.hHJV/3xMyc.TMPRSS6 medido mediante citometría de flujo

Líneas celulares de ensayo	HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6		HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6	
mAb	Intensidad de fluorescencia media geométrica	Intensidad de fluorescencia mediana	Intensidad de fluorescencia media geométrica	Intensidad de fluorescencia mediana
REGN7969	47932	67517	8394	7813
REGN7971	61850	84416	8228	7472
REGN7973	46109	63527	8190	7441
REGN7974	40885	56698	6956	6224
REGN7977	49022	63785	9128	7030
REGN7999	30702	40146	23698	33576
REGN8023	55465	77830	18957	19405
Control de isotipos	11684	12981	7750	7233
Sin tratar	13342	15024	9605	8897
Aprotinina	42301	58097	26671	38081

[0205] Como se muestra en la Tabla 13, todos los anticuerpos TMPRSS6 seleccionados impidieron la escisión de HJV de la superficie de las células HEK293.hHJV/3xMyc.hTMPRSS6. REGN7999 y REGN8023 también impidieron la escisión de HJV de la superficie de las células HEK293.hHJV/3xMyc.mTMPRSS6.

Ejemplo 7: Inhibición de la actividad enzimática de TMPRSS6

Procedimiento experimental

[0206] Para evaluar la inhibición de la actividad enzimática de TMPRSS6 por anticuerpos anti-TMPRSS6, se establecieron dos bioensayos. En ambos bioensayos, los anticuerpos anti-TMPRSS6 o un control de subclase de IgG se diluyeron en serie en tampón de ensayo (PBS + Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) de 500 nM a 122,1 pM (más una muestra que contenía tampón de ensayo solo sin molécula de prueba).

[0207] El primer bioensayo ("bioensayo CM") se realizó con el dominio extracelular de TMPRSS6 producido como medio condicionado (CM). CM se produjo mediante genomodificación de células CHO para producir y secretar el dominio extracelular de TMPRSS6 humana (aminoácidos 68-802 de la secuencia de referencia NCBI NM_001289001) o TMPRSS6 de mono cynomolgous (aminoácidos 66-800, V673M, de la secuencia de referencia NCBI XM_005567384), ambos fusionados a un extremo N 8 x Histidina. Para el bioensayo de CM, los anticuerpos se incubaron con 0,2 % de hTMPRSS6 CM o 0,75 % de mfTMPRSS6 CM a 25 °C durante 30 minutos, expresando todo el porcentaje de CM como %v/v.

[0208] El segundo bioensayo ("bioensayo HEK293") se realizó con las líneas celulares HEK293/hTMPRSS6, HEK293/mfTMPRSS6 y HEK293/mTMPRSS6, que expresan de manera estable TMPRSS6 humana, de mono cynomolgous y ratón, respectivamente. Los detalles sobre la preparación de estas líneas celulares se pueden encontrar en el Ejemplo 5. Para el bioensayo HEK293, las células se sembraron en placas a razón de 10 000 células/pocillo (para una preincubación de 30 minutos) y 20 000 células/pocillo (para una preincubación durante la noche) en una placa de 96 pocillos en DMEM Alta Glucosa + 10 % FBS + Pen/Estrep/L-Glutamina (DMEM Completo) e incubada a 37 °C en 5 % CO₂. Para el bioensayo de células HEK293 con condiciones de preincubación de 30 minutos, en el día después del cultivo en placas celulares, se eliminó el medio de las células, todas las células se lavaron una vez en tampón de ensayo, se agregaron anticuerpos a las células y se incubaron a 25 °C durante 30 minutos. Para la condición de preincubación durante la noche, el día después del cultivo en placas celulares, se agregaron anticuerpos a las células todavía en DMEM Completo sin lavar y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se eliminó el medio (incluidos los anticuerpos) de las células y todas las células se lavaron una vez en tampón de ensayo.

[0209] Al finalizar las incubaciones de anticuerpo/TMPRSS6 y el lavado de placas para todos los ensayos, se agregaron 150 uM de un sustrato peptídico fluorescente de TMPRSS6 (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Enzo BML-P237) disuelto en tampón de ensayo a las células tratadas con anticuerpo o mezcla de CM/anticuerpo y se incubó durante 1 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después de 1 hora de incubación, se midió la fluorescencia en un lector de placas Envision (Perkin Elmer) con una longitud

de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Los resultados se analizaron mediante regresión no lineal (logística de 4 parámetros) con el software Prism (GraphPad) para obtener valores de IC₅₀. El porcentaje de inhibición se calculó con los valores de RFU (unidades relativas de fluorescencia) utilizando la siguiente ecuación:

5

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \frac{RFU_{\text{referencia}} - RFU_{\text{inhibición}}}{RFU_{\text{referencia}} - RFU_{\text{fondo}}}$$

[0210] En esta ecuación, "RFU_{referencia}" es el valor de fluorescencia de una determinada concentración de TMPRSS6 CM o de una determinada cantidad de células HEK293/TMPRSS6 sin anticuerpos, "RFU_{inhibición}" es el valor de fluorescencia con la concentración máxima de un anticuerpo particular con la concentración antes mencionada de TMPRSS6 CM o un cierto número de células HEK293/TMPRSS6, y "RFU_{fondo}" es el valor de fluorescencia sin ninguna célula TMPRSS6 CM o HEK293/TMPRSS6.

Resultados

[0211] Se seleccionaron siete anticuerpos anti-TMPRSS6 y se analizó su capacidad para inhibir la actividad enzimática de las células TMPRSS6 CM y HEK293/TMPRSS6. Las tablas 14 a 16 muestran los resultados de estos experimentos.

Tabla 14: Inhibición del anticuerpo anti-TMPRSS6 de TMPRSS6 CM

Concentración constante de TMPRSS6 CM	0,2 % hTMPRSS6 CM		0,75 % mfTMPRSS6 CM	
mAb	% de inhibición	IC ₅₀ [M]	% de inhibición	IC ₅₀ [M]
REGN7969	71	>1,0E-08	66	>5,0E-08
REGN7971	65	>1,0E-08	68	>5,0E-08
REGN7973	93	2,6E-08	81	>5,0E-08
REGN7974	85	4,0E-07	69	>5,0E-08
REGN7977	94	2,3E-08	89	5,0E-08
REGN7999	98	3,0E-09	98	1,7E-09
REGN8023	98	7,1E-10	98	7,4E-10

Control de subclases de hlgG	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición
-------------------------------------	----------------	----------------	----------------	----------------

[0212] Como se muestra en la Tabla 14, todos los anticuerpos seleccionados mostraron una inhibición de aproximadamente el 0,2 % de hTMPRSS6 CM que variaba entre aproximadamente el 65 % y aproximadamente el 98 %, con valores de IC₅₀ que variaban entre aproximadamente 710 pM y más de aproximadamente 10 nM. Todos los anticuerpos descritos en el presente documento también mostraron una inhibición de aproximadamente el 0,75 % de mTMPRSS6 CM que variaba entre aproximadamente el 66 % y aproximadamente el 98 %, con valores de IC₅₀ que variaban entre aproximadamente 740 pM y más de aproximadamente 50 nM.

Tabla 15: Inhibición del anticuerpo anti-TMPRSS6 de células HEK293/TMPRSS6 con preincubación de 30 minutos a 25 °C

10 000 células/pocillo con preincubación de 30 minutos con anticuerpos a 25 °C						
Especies HEK293/TMP RSS6	hTMPRSS6		mTMPRSS6		mTMPRSS6	
mAb	% de inhibición	IC ₅₀ [M]	% de inhibición	IC ₅₀ [M]	% de inhibición	IC ₅₀ [M]
REGN7969	87	1,9E-09	87	8,8E-09	Sin inhibición	Sin inhibición
REGN7971	86	9,7E-10	87	3,1E-09	Sin inhibición	Sin inhibición
REGN7973	89	5,8E-09	85	2,5E-08	Sin inhibición	Sin inhibición
REGN7974	86	5,1E-09	81	3,0E-08	Sin inhibición	Sin inhibición
REGN7977	86	3,6E-09	87	8,1E-09	58	3,5E-08
REGN7999	86	3,0E-09	90	6,5E-09	88	3,6E-09
REGN8023	90	3,6E-10	94	6,6E-10	82	1,5E-09
Control de	Sin inhibición	Sin	Sin	Sin inhibición	Sin	Sin

subclases de hlgG		inhibición	inhibición		inhibición	inhibición
-------------------	--	------------	------------	--	------------	------------

[0213] Como se muestra en la Tabla 15, cuando los anticuerpos se preincubaron durante 30 minutos con 10 000 células HEK293/TMPRSS6, todos los anticuerpos seleccionados mostraron una inhibición de las células HEK293/hTMPRSS6 que variaba entre aproximadamente el 86 % y aproximadamente el 90 %, con valores de IC₅₀ que varían desde aproximadamente 360 pM hasta aproximadamente 5,8 nM. Todos los anticuerpos seleccionados también mostraron una inhibición de células HEK293/mfTMPRSS6 que variaba entre aproximadamente el 81 % y aproximadamente el 94 %, con valores de IC₅₀ que variaban entre aproximadamente 660 pM y aproximadamente 30 nM. Tres de los anticuerpos seleccionados (REGN7977, REGN7999, REGN8023) mostraron inhibición de células HEK293/mTMPRSS6 que variaban entre aproximadamente 58 % y aproximadamente 88 %, con valores de IC₅₀ para los anticuerpos inhibidores que variaban entre aproximadamente 1,5 nM y aproximadamente 35 nM.

Tabla 16: Inhibición del anticuerpo anti-TMPRSS6 de células HEK293/TMPRSS6 con preincubación durante la noche a 37 °C

20 000 células/pocillo con preincubación durante la noche con anticuerpos a 37 °C						
Especies HEK293/TMP RSS6	hTMPRSS6		mfTMPRSS6		mTMPRSS6	
mAb	% de inhibición	IC ₅₀ [M]	% de inhibición	IC ₅₀ [M]	% de inhibición	IC ₅₀ [M]
REGN7969	88	1,2E-09	89	1,3E-08	Sin inhibición	Sin inhibición
REGN7971	90	1,4E-09	89	6,0E-09	Sin inhibición	Sin inhibición
REGN7973	88	2,2E-09	42	>1,0E-08	Sin inhibición	Sin inhibición
REGN7974	86	2,6E-09	31	>1,0E-08	Sin inhibición	Sin inhibición
REGN7977	87	1,7E-09	81	>1,0E-08	97	1,4E-08
REGN7999	89	2,1E-09	91	2,1E-08	103	2,1E-09

REGN8023	90	1,1E-09	91	2,8E-09	98	1,2E-09
Control de subclases de hIgG	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición

[0214] Como se muestra en la Tabla 16, cuando los anticuerpos se preincubaron durante la noche con 20 000 células HEK293/TMPRSS6, todos los anticuerpos seleccionados mostraron una inhibición de las células HEK293/hTMPRSS6 que variaba entre aproximadamente el 86 % y aproximadamente el 90 %, con valores de IC₅₀ que varían desde aproximadamente 1,1 nM hasta aproximadamente 2,6 nM. Todos los anticuerpos seleccionados también mostraron una inhibición de células HEK293/mfTMPRSS6 que variaba entre aproximadamente el 31 % y aproximadamente el 91 %, con valores de IC₅₀ que variaban entre aproximadamente 2,8 nM y más que aproximadamente 10 nM. Tres de los anticuerpos seleccionados (REGN7977, REGN7999, REGN8023) mostraron inhibición de células HEK293/mTMPRSS6 que variaban entre aproximadamente 97 % y aproximadamente 103 %, con valores de IC₅₀ para los anticuerpos inhibidores que variaban entre aproximadamente 1,2 nM y aproximadamente 14 nM. Un anticuerpo de control de subclase IgG no demostró ninguna inhibición mensurable de TMPRSS6 en ninguno de los formatos probados.

Ejemplo 8: Mapeo de epítomos en TMPRSS6 humana mediante HDX-MS

Procedimiento experimental

[0215] Se realizó espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS) para determinar los residuos de aminoácidos de TMPRSS6 humana que interactúan con un subconjunto de anticuerpos monoclonales TMPRSS6 de la presente descripción, REGN7999 y REGN8023. Una descripción general del método HDX-MS se establece, por ejemplo, en Ehring, *Analytical Biochemistry* (1999) 267(2):252-259; y Engen y Smith, *Anal. Chem.* (2001) 73:256A-265A.

[0216] Los experimentos HDX-MS se realizaron en una plataforma personalizada, que consiste en un sistema de automatización HDX personalizado para el etiquetado y la inactivación del deuterio, un Waters Acquity Binary Solvent Manager para la digestión y carga de muestras, otro Waters Acquity Binary Solvent Manager para el gradiente analítico y un espectrómetro de masas Thermo Q Exactive HF para identificación de péptidos y medición de masas.

[0217] La solución de marcado de D₂O se preparó como tampón PBS en D₂O a pD 7,0 (tampón fosfato 10 mM, NaCl 140 mM y KCl 3 mM, equivalente a pH 7,4 a 25 °C). Para el marcaje con deuterio, 10 µL de dominio extracelular TMPRSS6 humana recombinante expresado con una mutación S762A y una etiqueta myc-myc-Hexahistidina de extremo C (denominada

hTMPRSS6_S762A-MMH; REGN5330; SEQ ID NO: 117) premezclado con REGN7999 o REGN8023 se incubaron a 20 °C con 90 µL de solución de marcado D₂O durante varios puntos de tiempo por duplicado (control no deuterado como 0 min; etiquetado con deuterio durante 5 min o 10 min). La reacción de deuteración se detuvo añadiendo 90 µl de tampón de extinción (TCEP-HCl 0,5 M, urea 4 M y ácido fórmico al 0,5 %) a cada muestra para una incubación de 90 segundos a 20 °C. Las muestras inactivadas luego se inyectaron en el sistema LC para la digestión en línea con pepsina/proteasa XIII. Los péptidos digeridos fueron atrapados por una columna C18 (2,1 mm x 5 mm, Waters) y separados por otra columna C18 (2,1 mm x 50 mm, Waters) a -5 °C con un gradiente de 20 minutos de 0 %-90 % B (fase móvil A: 0,5 % de ácido fórmico y 4,5 % de acetonitrilo en agua, fase móvil B: 0,5 % de ácido fórmico en acetonitrilo). Los péptidos eluidos se analizaron mediante espectrometría de masas Thermo Q Exactive HF en modo LC-MS/MS o LC-MS.

[0218] Los datos de LC-MS/MS de las muestras de hTMPRSS6_S762A-MMH no deuteradas se buscaron en una base de datos que incluye secuencias de aminoácidos de la proteína TMPRSS6 humana, pepsina, proteasa XIII y sus secuencias inversas utilizando el motor de búsqueda Byonic (Protein Metrics). Los parámetros de búsqueda se establecieron por defecto utilizando digestión enzimática no específica y glicosilación humana como modificación de variable común. Luego, la lista de péptidos identificados se importó al software HDEaminer 3.1 (Sierra Analytics) para calcular la absorción de deuterio (_{captación} de D) y el porcentaje de absorción de deuterio (%D) para todas las muestras deuteradas. %D se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de captación de deuterio } (\%D) = \frac{\text{captación D para péptido en cada punto de tiempo} \times 100\%}{\text{Máxima captación D del péptido}}$$

Resultados

[0219] Se identificaron un total de 294 péptidos de TMPRSS6 humana tanto a partir de hTMPRSS6_S762A-MMH solo como de hTMPRSS6_S762A-MMH en complejo con muestras REGN7999, lo que representa aproximadamente el 79,2 % de cobertura de secuencia de TMPRSS6 humana. Cualquier péptido que mostrara una disminución del 5 % o más en el porcentaje de absorción de deuterio se definió como significativamente protegido ($\Delta\%D < -5\%$).

[0220] La Tabla 17 muestra los péptidos de TMPRSS6 humana con una protección significativa tras la formación del complejo hTMPRSS6_S762A-MMH-REGN7999 en comparación con hTMPRSS6_S762A-MMH solo. Los péptidos correspondientes a los aminoácidos 693-703 SHFFEPGLHCW (SEQ ID NO: 120) y 780-805 LVSWGLGCGRPNYFGVYTRITGVISW (SEQ ID NO: 121) en TMPRSS6 humana estaban significativamente protegidos por REGN7999.

Tabla 17: Péptidos de TMPRSS6 humana con protección significativa por REGN7999

	5 minutos			10 minutos			
TMPRSS6 humana	hTMPRSS6-REGN7999	hTMPRSS6		hTMPRSS6-REGN7999	hTMPRSS6		
Residuos*	captación de D	captación de D	ΔD	captación de D	captación de D	ΔD	$\Delta \% D$
693-698	0,42	0,61	-0,19	0,37	0,62	-0,25	-8,2
693-703	0,85	1,08	-0,23	0,53	1,15	-0,62	-5,9
695-703	0,39	1,18	-0,79	0,4	1,16	-0,76	-14,4
780-798	5,41	6,14	-0,73	5,3	6,18	-0,88	-5,6
781-783	0,32	0,40	-0,08	0,32	0,39	-0,07	-8,3
781-796	4,89	5,61	-0,72	4,91	5,59	-0,68	-6,0
781-798	5,30	6,04	-0,74	5,35	6,00	-0,65	-5,1
784-796	3,18	3,66	-0,48	3,14	3,59	-0,45	-5,2
792-798	0,43	0,79	-0,36	0,43	0,77	-0,34	-7,7
793-798	0,45	0,63	-0,18	0,44	0,66	-0,22	-5,5
797-805	2,15	2,56	-0,41	2,12	2,53	-0,41	-6,5

***La numeración de secuencia corresponde al número de acceso del NCBI NP_705837.1**

[0221] Se identificaron un total de 302 péptidos de TMPRSS6 humana tanto a partir de hTMPRSS6 S762A-MMH solo como de hTMPRSS6 S762A-MMH en complejo con muestras REGN8023, lo que representa aproximadamente un 79,6 % de cobertura de secuencia de TMPRSS6 humana. Cualquier péptido que mostrara una disminución del 5 % o más en el porcentaje de absorción de deuterio se definió como significativamente protegido ($\Delta \% D < -5 \%$).

[0222] La Tabla 18 muestra los péptidos de TMPRSS6 humana con una protección significativa tras la formación del complejo hTMPRSS6 S762A-MMH -REGN8023 en comparación con hTMPRSS6 S762A-MMH solo. Los péptidos correspondientes a los aminoácidos 125-133 LITSTRLGT (SEQ ID NO: 122), 586-594 GEWPWQASL (SEQ ID NO: 123), 626-650 STVLWTVFLGKVVQNSRWPGEVSFK (SEQ ID NO: 124), y 704-724 ITGWGALREGGPISNALQKVD (SEQ ID NO: 125) en TMPRSS6 humana estaban significativamente protegidos por REGN8023.

Tabla 18: Péptidos de TMPRSS6 humana con protección significativa por REGN8023

	5 minutos			10 minutos			
Humano TMPRSS6	hTMPRSS6- REGN8023	hTMPRSS6		hTMPRSS6- REGN8023	hTMPRSS6		
Residuos*	captación de D	captación de D	ΔD	captación de D	captación de D	ΔD	$\Delta \% D$
125-131	1,73	2,02	-0,29	1,73	1,98	-0,25	-6,0
125-133	2,59	3,03	-0,44	2,61	2,99	-0,38	-6,5
126-133	2,51	2,92	-0,41	2,56	2,90	-0,34	-6,9
586-589	0,07	0,15	-0,08	0,08	0,14	-0,06	-7,7
586-594	0,60	0,93	-0,33	0,60	0,93	-0,33	-6,2
626-630	1,51	1,66	-0,15	1,53	1,65	-0,12	-5,2
628-630	0,03	0,18	-0,15	0,03	0,16	-0,13	-15,4
628-631	0,04	0,15	-0,11	0,06	0,14	-0,08	-5,2
628-633	0,08	0,28	-0,20	0,10	0,29	-0,19	-5,4
634-639	1,93	2,45	-0,52	1,92	2,45	-0,53	-14,6
634-642	3,46	4,04	-0,58	3,47	4,00	-0,53	-8,9
634-644	3,84	4,44	-0,60	3,87	4,41	-0,54	-7,9
634-646	4,81	5,38	-0,57	4,84	5,35	-0,51	-6,0
634-649	5,99	6,63	-0,64	6,02	6,59	-0,57	-5,2
634-650	6,15	6,94	-0,79	6,24	6,92	-0,68	-5,9
704-710	1,50	1,83	-0,33	1,51	1,84	-0,33	-7,2
704-711	2,32	2,69	-0,37	2,34	2,68	-0,34	-6,6
704-713	3,22	3,61	-0,39	3,20	3,57	-0,37	-5,3
704-718	3,88	5,37	-1,49	3,94	5,31	-1,37	-13,2
704-719	4,56	5,99	-1,43	4,50	6,02	-1,52	-12,6
704-720	4,89	6,87	-1,98	4,79	6,91	-2,12	-16,3
711-720	2,28	3,72	-1,44	2,32	3,67	-1,35	-22,2
711-724	3,52	5,68	-2,16	3,64	5,60	-1,96	-20,8
714-724	2,86	4,70	-1,84	2,88	4,62	-1,74	-22,1

*La numeración de secuencia corresponde al número de acceso del NCBI NP_705837.1

Ejemplo 9: Mapeo de epítopos en TMPRSS6 humana mediante CryoEM

Procedimiento experimental

- 5 **[0223]** Se utilizó microscopía crioelectrónica (CryoEM) para caracterizar aún más los epítopos

relevantes para los anticuerpos TMPRSS6 seleccionados.

[0224] Para la preparación de fragmentos Fab, las IgG REGN7999 y REGN8023 se escindieron en fragmentos F(ab')₂ y Fc usando la enzima Fabricator (Genovis) siguiendo protocolos estándar del fabricante. F(ab')₂ se redujo a Fab usando 2-mercaptoetilamina (2-MEA, ThermoFisher) seguido de la eliminación del fragmento Fc usando resina de afinidad CaptureSelect IgG-Fc (ms) (ThermoFisher). Los fragmentos Fab se purificaron aún más mediante inyección en una columna de cromatografía de exclusión molecular (SEC) (Superdex 200 Incremento 15/300 GL, GE Healthcare) conectada a un sistema de cromatografía AKTA Avant 25 (GE Healthcare). El tampón de ejecución contenía Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. Las fracciones máximas se combinaron y concentraron en un filtro centrífugo de corte de 30 kDa (Millipore Sigma) para su uso posterior en la preparación del complejo.

[0225] La proteína TMPRSS6 humana utilizada en este experimento abarca los residuos del dominio extracelular G77-T811 de TMPRSS6 humana fusionados a una etiqueta Myc-Myc-hexahistidina de extremo C y contiene una mutación en el dominio catalítico (S762A) que hace que la proteína sea catalíticamente inactiva (denominada como TMPRSS6_S762A-MMH humana). Para la formación del complejo, se mezclaron 200 µg de TMPRSS6_S762A-MMH humana purificada con 250 µg cada uno de REGN7999 Fab y REGN8023 Fab y luego se incubaron en hielo durante aproximadamente 30 minutos. La mezcla se inyectó en una columna SEC (Superdex 200 Incremento 15/300 GL, GE) conectada a un sistema de cromatografía AKTA Avant 25 (GE Healthcare). El tampón de ejecución SEC contenía Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. Las fracciones de un único pico monodisperso correspondiente al complejo humano TMPRSS6 S762A-MMH -- REGN7999 Fab -- REGN8023 Fab se combinaron y concentraron en un filtro centrífugo de corte de 30 kDa (Millipore Sigma) hasta una concentración de 3,5 mg/ml medida utilizando un instrumento Nanodrop (ThermoFisher).

[0226] La preparación de muestras CryoEM y la recopilación de datos se realizaron de la siguiente manera. El complejo TMPRSS6_S762A-MMH -- REGN7999 Fab -- REGN8023 Fab humano recién purificado se diluyó dos veces a 1,75 mg/ml en un tampón que contenía Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM para la preparación de la rejilla cryoEM. Se añadió n-dodecil-b-D-maltopiranosido (Anatrace) a una concentración final de ~60 µM inmediatamente antes de pipetear 3,5 µl de la mezcla en una rejilla de malla 300 UltrAufoil R1.2/1.3 (Quantifoil). El exceso de líquido se eliminó usando papel de filtro y la rejilla se congeló por inmersión en etano líquido enfriado con nitrógeno líquido usando un Vitrobot Mark IV (ThermoFisher) operado a 4 °C y 100 % de humedad. Luego, la rejilla se insertó en un microscopio Titan Krios G3i (ThermoFisher) equipado con una cámara K3 (Gatan). Se recopilaron 3580 películas en modo contado con un aumento nominal de 81 000x (tamaño de píxel de 0,85 Å). Cada película contenía 46 fracciones de dosis durante una exposición de 2

segundos, y la dosis total adquirida por $\text{\AA}^2$ fue de ~ 40 electrones.

[0227] El procesamiento de datos CryoEM y la generación de mapas se realizaron de la siguiente manera. Los datos de CryoEM se procesaron inicialmente utilizando Cryosparc v2.14.2. Las películas se corrigieron en movimiento mediante la corrección de movimiento del parche y los parámetros CTF se estimaron mediante la estimación del CTF del parche. Inicialmente, las partículas se recogieron utilizando el selector de manchas para generar promedios de clase 2D para la selección de plantillas. Se recogieron 927 835 partículas utilizando el selector de plantillas. Después de la clasificación 2D, la reconstrucción Ab initio y el refinamiento heterogéneo, se identificaron 94 036 partículas correspondientes al complejo REGN5330 -- REGN7999 Fab – REGN8023 Fab. Estas partículas se refinaron hasta una reconstrucción con una resolución de 3,4 $\text{\AA}$ mediante un refinamiento no uniforme. El mapa resultante se utilizó como modelo de referencia inicial para la clasificación 3D en Relion. El mapa utilizado para la construcción del modelo se calculó utilizando una tubería de procesamiento de partículas únicas Relion versión 3.1. Las películas se corrigieron en movimiento utilizando MotionCor2 y los parámetros CTF se estimaron utilizando gctf. Se seleccionaron 3411 micrografías alineadas para su posterior procesamiento basándose en que tenían una estimación de resolución CTF superior a 4 $\text{\AA}$. Se seleccionaron 1 445 534 partículas de las micrografías mediante selección automática basada en plantillas 2D y se extrajeron como imágenes de partículas agrupadas 3x (2,55 $\text{\AA}$ por píxel). Se realizaron tres rondas de clasificación 2D para eliminar falsos positivos y complejos rotos o incompletos, lo que dio como resultado 1 034 494 partículas. Estas partículas fueron sometidas a una clasificación 3D solicitando 8 clases, utilizando un modelo de referencia inicial calculado en CryoSparc. 270 021 partículas de las dos mejores clases correspondientes al complejo humano TMPRSS6 S762A-MMH -- REGN7999 Fab – REGN8023 Fab se volvieron a extraer como imágenes de partículas no agrupadas y se sometieron a refinamiento 3D, lo que produjo un mapa de resolución de 3,4 $\text{\AA}$ en el que los Fab y los dominios catalíticos se resolvieron bien, pero los dominios de extremo N restantes de la proteína se resolvieron mal. Para resolver mejor los dominios de extremo N, se realizó una clasificación enfocada sin alineación, aplicando una máscara suave que excluyó los Fab y el dominio catalítico. Se identificó que una sola clase que contenía 146 035 partículas tenía una densidad mejorada para los dominios de extremo N. El refinamiento de estas partículas dio como resultado un mapa de resolución de 3,6 $\text{\AA}$. Dos rondas de pulido CtfRefine y Bayesiano fueron seguidas por tres ejecuciones adicionales de clasificación 3D enfocadas sin alineación en las que se aplicaron máscaras suaves que rodean los dominios CUB y SEA, lo que resultó en un conjunto final de 105 142 partículas. Luego, estas partículas se refinaron en un mapa de resolución de 3,3 $\text{\AA}$ (FSC = 0,143) con características mejoradas en los dominios de extremo N. Para la construcción del modelo, el mapa se filtró a sus valores de resolución local calculados en Relion y se agudizó a un factor B de -76 $\text{\AA}^2$.

[0228] La construcción y el refinamiento del modelo se realizaron de la siguiente manera. La construcción manual del modelo se llevó a cabo utilizando la versión 0.8.9 de Coot y las mejoras del espacio real se realizaron en la versión 1.17 de Phenix. Se generó un modelo de homología del mutante S762A del dominio catalítico de TMPRSS6 humana a partir de una estructura cristalina publicada del dominio catalítico de Matriptasa-1 humana (PDB 4IS5) utilizando el programa Sculptor en Phenix. Este modelo se acopló al mapa cryoEM del complejo humano TMPRSS6 S762A-MMH - REGN7999 Fab – REGN8023 Fab usando Phenix AutoDock y se ajustó manualmente. Los dominios LDLRa se incorporaron manualmente a la densidad utilizando una estructura cristalina publicada de un dominio LDLR (PDB 1AJJ) como guía. La construcción manual de los dominios CUB 1 y 2 se guió por una estructura cristalina publicada de Cubilin (PDB 3KQ4). El registro de secuencia correcto fue corroborado por la densidad de las cadenas laterales de residuos voluminosos y las glicosilaciones unidas por N, así como por las posiciones de los puentes disulfuro. El dominio SEA de extremo N no se construyó debido a una densidad fragmentada deficiente. El modelo actual abarca los residuos 212-811 de TMPRSS6 humana, excepto los residuos 573-581 y 662-664, que se encuentran en enlazadores desordenados. Los modelos de homología para fragmentos Fab de REGN7999 y REGN8023 se elaboraron a partir de una estructura REGN Fab previamente determinada. El acoplamiento inequívoco de los modelos Fab en sus respectivas densidades fue ayudado por densidades de cadenas laterales claramente interpretables correspondientes a sus distintas secuencias de CDR. Después del acoplamiento, los modelos se ajustaron manualmente seguido del refinamiento en el espacio real de todo el complejo humano TMPRSS6 S762A-MMH -- REGN7999 Fab – REGN8023 Fab.

Resultados

[0229] *Estructura cryoEM del complejo humano TMPRSS6 S762A-MMH -- REGN7999 Fab – REGN8023 Fab:* Para comprender mejor cómo los anticuerpos anti-TMPRSS6 se unen e inhiben TMPRSS6, un complejo proteico que consiste en un ectodominio de TMPRSS6 humana catalíticamente inactivo (TMPRSS6 S762A-MMH humana) unido a los fragmentos Fab de los anticuerpos anti-TMPRSS6 REGN7999 y REGN8023 se aisló mediante SEC y su estructura tridimensional se determinó mediante CryoEM de partícula única. Con una resolución general de 3,3 Å, la reconstrucción CryoEM fue suficiente para construir un modelo atómico para ~80 % del ectodominio de TMPRSS6 humana, que abarca sus dos dominios CUB, tres dominios LDLRa y el dominio de serina proteasa catalítica. La reconstrucción también permitió el acoplamiento inequívoco de fragmentos Fab REGN7999 y REGN8023 y el reajuste manual de sus regiones variables. La resolución local en las interfaces paratopo-epítipo de ambos Fab varía de 3,1 a 3,5 Å, lo que permite una determinación precisa de las interacciones a nivel de residuos entre los anticuerpos y TMPRSS6. La estructura del complejo terciario también confirma que REGN7999 y REGN8023 se

unen a epítomos que no se superponen.

[0230] *Epítomo REGN7999 y mecanismo estructural de inhibición:* Los residuos que contribuyen al epítomo REGN7999 en TMPRSS6 se resumen en la Tabla 18. Estos residuos se definen como residuos TMPRSS6 con átomos distintos de hidrógeno que se encuentran dentro de los 4 Å de los átomos distintos de hidrógeno de REGN7999 y pueden implicar enlaces de hidrógeno, interacciones carga-carga o interacciones hidrófobas/van der Waals. El epítomo REGN7999 se puede dividir en dos parches en TMPRSS6. El primer parche reside en el dominio catalítico y consiste en los residuos de TMPRSS6 G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752 y N791. Los contactos en este parche están mediados por las CDR H3, L2, L3 y un único residuo de la región marco (FR) L3. El segundo parche reside en el dominio repetido 2 de LDLRa y consiste en los residuos V490, S501, T502, C503, I504, S505 y K508. El paratopo del segundo parche se compone de un tramo continuo de residuos de cadenas ligeras que abarcan porciones de CDR-L2 y FR-L3. Los dominios CUB y el dominio SEA están muy alejados de la interfaz de unión REGN7999 y no contribuyen a su epítomo en TMPRSS6. Los datos de los experimentos de espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno y deuterio (HDX) en REGN7999 (Ejemplo 8) generalmente concuerdan con el parche del dominio catalítico observado en la estructura CryoEM, pero no resaltaron los residuos del dominio 2 de LDLRa como contribuyentes al epítomo.

[0231] Aunque su epítomo incluye un parche en el dominio catalítico, REGN7999 no entra en contacto con la tríada del sitio catalítico (H617, D668 y S672) donde se produce la escisión, ni está orientado de manera que ocluya estéricamente el acceso del sustrato al sitio activo. La ubicación de un sustrato unido a TMPRSS6 no se ha determinado experimentalmente, pero esta ubicación se puede inferir a partir de una estructura homóloga del dominio de serina proteasa matriptasa en complejo con un inhibidor peptídico, informado en Yuan et al, *BMC Struct Biol.* (2011) 11:30. Estas observaciones estructurales sugieren que la unión de hemojuvelina soluble al ectodominio TMPRSS6 no se ve perturbada por la presencia de REGN7999. Sin estar ligado a ninguna teoría, es posible que REGN7999 pueda inhibir TMPRSS6 "atrapando" alostéricamente a TMPRSS6 en una conformación inactiva que sea capaz de unirse pero no de escindir el sustrato.

[0232] *Epítomo REGN8023 y mecanismo estructural de inhibición:* Los residuos que contribuyen al epítomo REGN8023 en TMPRSS6 se resumen en la Tabla 19. Estos residuos se definen como residuos TMPRSS6 con átomos distintos de hidrógeno que se encuentran dentro de los 4 Å de los átomos distintos de hidrógeno de REGN8023 y pueden implicar enlaces de hidrógeno, interacciones carga-carga o interacciones hidrófobas/van der Waals. El epítomo REGN8023 reside exclusivamente en el dominio catalítico y consiste en los residuos de TMPRSS6 R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715 e I716. El epítomo observado en esta estructura generalmente coincide con los datos de los experimentos de espectrometría de masas HDX. El paratopo

REGN8023 está comprendido en gran medida dentro de la cadena pesada e incluye las CDR H1, H2, H3, L1, L3 así como FR-H3.

[0233] REGN8023 se une al dominio catalítico TMPRSS6 de modo que la cadena pesada no contacta directamente con la tríada catalítica pero parece estar en una posición que obstruiría el acceso del sustrato al sitio activo, según el modelo descrito anteriormente. Sin estar sujeto a ninguna teoría, es posible que REGN8023 inhiba TMPRSS6 mediante el impedimento estérico de la unión del sustrato al sitio activo. Esto también lo sugieren los datos de unión que demuestran que REGN8023 compite con la hemojuvelina soluble por la unión a la proteína del ectodominio TMPRSS6.

Tabla 19: Epítopos de anticuerpos anti-TMPRSS6. Los residuos de epítopos se definen como aminoácidos con átomos distintos de hidrógeno dentro de 4 Å de los átomos distintos de hidrógeno del anticuerpo.

Anticuerpo	Residuos del epítopo TMPRSS6*	
	Dominio LDLRa 2	Dominio catalítico
REGN7999	V490, S501, T502, C503, I504, S505, K508	G699, H701, D724, Q726, L727, I728, P729, L732, E735, G749, Y750, R751, K752, N791
REGN8023	N/A	R597, R599, I601, D622, L710, R711, E712, G713, G714, P715, I716

*La numeración de secuencia corresponde al número de acceso del NCBI NP_705837.1

Ejemplo 10: Comparación de REGN7999 y REGN8023 en ratones hembra WT

Procedimiento experimental

[0234] Se realizaron dos experimentos in vivo para analizar los efectos de anticuerpos TMPRSS6 seleccionados sobre la hepcidina sérica y el hierro sérico. Para ambos estudios, se utilizaron ratones hembra de tipo salvaje con HJV humanizada (Estudio 1: de 11 a 13 semanas y Estudio 2: de 6 a 9 semanas). En ambos estudios, los ratones fueron presangrados el día 7. En el primer estudio (Estudio 1), se administraron por vía subcutánea a ratones dos anticuerpos TMPRSS6 seleccionados, REGN7999 y REGN8023, así como un anticuerpo de control de isotipo, a 10 mg/kg los días 0, 2 y 7 del estudio. Luego se retiraron los ratones el día 9 y se recogieron sangrados terminales para su análisis. En el segundo estudio (Estudio 2), se administraron por vía subcutánea a ratones los mismos dos anticuerpos TMPRSS6, REGN7999 y REGN8023, así como un anticuerpo de control de isotipo, a 25 mg/kg los días 0, 2 y 7 del estudio. Luego se retiraron los ratones el día 14 y se recogieron sangrados terminales para su análisis.

[0235] En ambos estudios, se midió el hierro sérico a partir de hemorragias terminales utilizando un instrumento Siemens ADVIA Chemistry XPT. La hepcidina sérica se midió a partir de sangrados terminales utilizando un kit ELISA de competencia murina con hepcidina (Intrinsic Lifesciences, Cat: HMC-001, lote: 5142019) según las instrucciones del fabricante.

5 Resultados

[0236] Las mediciones de hierro sérico (expresado como ng/mL) y hepcidina sérica (expresada como µg/dL) del Estudio 1 se muestran en la Tabla 20 y del Estudio 2 se muestran en la Tabla 21.

Tabla 20: Niveles séricos de hierro y hepcidina en ratones HJV humanizados en respuesta al tratamiento con anticuerpos Tmprss6 en el estudio 1 (10 mg/kg)

Medición	Ab de Control de isotipo	REGN7999	REGN8023
Hepcidina sérica (ng/mL) Media±DE	390,2±175,4	652,0±175,4*	590±160,9
Hierro sérico (µg/dL) Media±DE	148,8±37,78	79,63±18,15*	112±51,41

[0237] Como se muestra en la Tabla 20, en el Estudio 1, el tratamiento con REGN7999 aumentó la hepcidina sérica y redujo significativamente el hierro sérico en ratones sanos tratados con REGN7999 en comparación con ratones tratados con control de isotipo. El tratamiento con REGN8023 también aumentó la hepcidina sérica y redujo el hierro sérico en ratones sanos tratados con REGN8023, aunque esto no fue estadísticamente significativo en comparación con los ratones tratados con control de isotipo. En la Tabla 20, todos los valores son medias ± DE, n=6-8 por grupo. ANOVA unidireccional; *p<0,05 vs. Ab de Control de isotipo

Tabla 21: Niveles séricos de hierro y hepcidina en ratones HJV humanizados en respuesta al tratamiento con anticuerpo Tmprss6 en el Estudio 2 (25 mg/kg)

Medición	Ab de Control de isotipo	REGN7999	REGN8023
Hepcidina sérica (ng/mL) Media±DE	220,4±110,9	609,4±289,6*	363,4±108,1
Hierro sérico (µg/dL) Media±DE	156,8±25,02	58,00±11,14*	86,00±17,77*

[0238] Como se muestra en la Tabla 21, en el Estudio 2, el tratamiento con REGN7999 aumentó

la hepcidina sérica y redujo significativamente el hierro sérico en ratones sanos tratados con REGN7999 en comparación con ratones tratados con control de isotipo. El tratamiento con REGN8023 también aumentó la hepcidina sérica y redujo el hierro sérico en ratones sanos tratados con REGN8023, aunque solo los niveles de hierro sérico alcanzaron significación estadística en comparación con los ratones tratados con control de isotipo. En la Tabla 21, todos los valores son medias $\pm$ DE, n=4-5 por grupo. ANOVA unidireccional; *p<0,05 vs. Ab de Control de isotipo

[0239] Los datos de ambos estudios sugieren que los anticuerpos anti-TMPRSS6 seleccionados pueden bloquear la función de TMPRSS6, lo que produce los efectos observados sobre los niveles de hepcidina y hierro sérico.

Ejemplo 11: Efecto de anti-TMPRSS6 sobre el hierro hepático en un modelo de hemocromatosis en ratón

[0240] Para investigar más a fondo la eficacia del anticuerpo anti-TMPRSS6 REGN7999 en un modelo de enfermedad relevante, se realizó un estudio de hemocromatosis hereditaria tipo 1. La hemocromatosis hereditaria es una enfermedad por sobrecarga de hierro causada por una mutación en la proteína HFE, que conduce a niveles de hepcidina inapropiadamente bajos (Finberg et al. *Blood* (2011) 117(17):4590-4599).

Procedimiento experimental

[0241] Se utilizaron ratones macho homocigotos para una delección del gen HFE de ratón en un fondo 100 % C57BL/6 (denominado HFE^{-/-}) como modelo de ratón de hemocromatosis hereditaria tipo 1. A ratones HFE^{-/-} (n=5-7) se les inyectó por vía subcutánea semanalmente 10 mg/kg de control de isotipo o REGN7999, excepto durante la semana 1 cuando se administraron 2 inyecciones. Se incluyó un grupo de control de ratones de tipo salvaje y se le administró control de isotipo. Después de 8 semanas, los ratones fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂. Se tomó un sangrado terminal y se midió la hepcidina sérica utilizando el kit ELISA Hpcidin Murine-Compete (Intrinsic Lifesciences, Cat: HMC-001, Lote: 02032020) según el protocolo del fabricante. Después de sacrificar a los ratones, sus hígados se congelaron instantáneamente. Posteriormente estos hígados fueron procesados para medir el contenido de hierro en el hígado, basándose en el método descrito por Torrance y Bothwell, *S. Afr. J. Med. Sci.* (1968) 33(1):9-11.

Resultados

[0242] Tanto los valores de hepcidina sérica (indicados en ng/ml) como los de contenido de hierro en el hígado (indicados en μ g/g de peso seco) se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Efectos de REGN7999 sobre la hepcidina sérica y el contenido de hierro en el hígado en un Modelo de ratón de hemocromatosis hereditaria

	Ratones HFE ^{+/+} (tipo salvaje) Tratamiento de control de isotipos	ratones HFE ^{-/-} Tratamiento de control de isotipos	ratones HFE ^{-/-} Tratamiento con REGN7999
Hepcidina sérica (ng/mL)	364,8±96,89	339,3±150,7	1631±231,4* **
Contenido de hierro en el hígado (mg/g de peso seco)	338,4±60,03	771,1±68,37*	618,7±51,17* **

[0243] Como se muestra en la Tabla 22, después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999, los ratones HFE^{-/-} tenían un aumento significativo de hepcidina en suero (aproximadamente 1631 ng/ml) en comparación con los tratados con control de isotipo (aproximadamente 339,3 ng/ml). También se muestra en la Tabla 22, después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999, los ratones HFE^{-/-} tenían un contenido de hierro en el hígado significativamente menor (aproximadamente 618,7 µg/g de peso seco) en comparación con los tratados con control de isotipo (aproximadamente 771,1 µg/g de peso seco). En la Tabla 22, todos los valores son medias ± DE, n=5-7 por grupo. ANOVA unidireccional; *p<0,05 vs. control de isotipo HFE^{+/+}; **p<0,05 vs. Control de isotipo HFE^{-/-}.

Ejemplo 12: Efecto de anti-TMPRSS6 en un modelo de ratón de beta talasemia

[0244] Para evaluar la eficacia de dos anticuerpos anti-TMPRSS6 aquí descritos, se realizaron estudios en un modelo murino de beta talasemia intermedia, un trastorno por sobrecarga de hierro asociado con eritropoyesis ineficaz y desregulación del hierro.

[0245] Se generaron ratones con una delección heterocigótica de los genes $\beta 1$ y $\beta 2$, que recapitulan la beta talasemia intermedia en humanos (Ginzburg, *Blood* (2011) 118(16):4321-4330), y expresión homocigótica de hemojuvelina humana (HJV) en lugar de HJV de ratón (denominado Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}) en un fondo C57BL/6/129S6. A ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} (n=10-19) se les inyectó por vía subcutánea semanalmente 10 mg/kg de REGN7999, REGN8023 o control de isotipo (excepto en la semana 1 cuando se administraron 2 inyecciones). Se incluyó un grupo de control de ratones de tipo salvaje (WT) y se le administró control de isotipo de manera similar. Después de 8 semanas, los ratones fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂ y se extrajo sangre completa mediante punción cardíaca y se colocó en tubos de extracción de sangre serológica con o sin EDTA. La hepcidina

sérica se midió utilizando el kit ELISA Hecpudin Murine-Compete disponible comercialmente (Intrinsic Lifesciences, Cat: HMC-001, Lote: 08232019) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió el hierro sérico y un panel hematológico completo, incluidos reticulocitos y glóbulos rojos maduros (RBC), utilizando un instrumento Siemens ADVIA Chemistry XPT y el sistema de hematología GENESIS de Oxford Science.

[0246] Además, después de sacrificar a los ratones, sus hígados y bazo se congelaron instantáneamente hasta su posterior procesamiento. Posteriormente estas muestras de hígados fueron procesadas para medir el contenido de hierro en el hígado, basándose en el método descrito por Torrance y Bothwell, *S. Afr. J. Med. Sci.* (1968) 33(1):9-11. Los bazo se trituraron y se filtraron a través de un colador de 70 mm en un tubo que contenía 10 ml de tampón autoMACS® (Miltenyi Biotec, Cat: 130-091-221). Para recolectar médula ósea de fémures, se extirparon los extremos de las caderas de los ratones y se colocaron en un tubo que contenía 100 ml de tampón autoMACS® suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) (Miltenyi Biotec, Cat: 130-091-376). Los tubos se hicieron girar rápidamente (10 s, 400 xg) para liberar la médula ósea en la solución.

[0247] Las células de la médula ósea y del bazo se centrifugaron a 400 xg durante 10 minutos a 4 °C, seguido de una incubación con perlas magnéticas CD45 anti-ratón (Miltenyi Biotec, Cat: 130-052-301) durante 20 minutos en hielo. A esto le siguió la separación magnética en columnas múltiples de 24 (Miltenyi Biotec, Cat: 130-095-691). El flujo continuo, enriquecido en glóbulos rojos maduros y precursores, se recogió y se incubó con un bloque Fc CD16/CD32 anti-ratón (BD Biosciences, clon 2.4G2, Cat: 553142) durante 10 minutos. A esto le siguió una incubación de 30 minutos con los siguientes anticuerpos comerciales (todos anti-ratón de rata): FITC anti-Ter119, clon TER-119, Cat:557915; APC anti-CD44, clon IM7, cat: 561862; APC-Cy7 anti-CD45, clon 30-F11, Cat: 557659; APC-Cy7 anti-CD11b, clon M1/70, Cat: 557657; y APC-Cy7 anti-Ly6G, clon 1A8, Cat: 560600; todo de BD Biosciences.

[0248] Se añadió AADvanced (Thermofisher, S10349) durante 30 minutos para excluir las células muertas del análisis. Todos los procedimientos de tinción se realizaron en hielo y los controles de compensación se incluyeron utilizando OneComp eBeads™ (Invitrogen, Cat: 01-1111-42). Se preparó un panel de control menos uno para controlar correctamente las poblaciones objetivo. Las muestras se midieron en un citómetro de flujo CytoFLEX LX (Beckman-Coulter) utilizando controles de fluorescencia menos uno para controlar las poblaciones objetivo.

[0249] Como se muestra en la Tabla 23, después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999 o REGN8023, los ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{HumIn} habían aumentado significativamente los niveles de hepcidina sérica (aproximadamente 1510 ng/ml y aproximadamente 1454 ng/ml, respectivamente) en comparación con ambos ratones WT y $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{HumIn} tratados con control de isotipo (aproximadamente 225 ng/ml y aproximadamente 511 ng/ml, respectivamente).

[0250] Además, después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999 o REGN8023, Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} tuvo una reducción significativa (aproximadamente 50 µg/dL) en el hierro sérico en comparación con el control de isotipo (aproximadamente 128 µg/dL, Tabla 23). En los grupos de tratamiento de control de isotipo, los ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} acumularon más hierro en el hígado que los ratones WT. Este aumento fue más pronunciado en ratones hembra (aproximadamente 466 µg/g a aproximadamente 985 µg/g de peso seco) en comparación con ratones macho (aproximadamente 215 µg/g a aproximadamente 364 µg/g de peso seco) (Tabla 23). La reducción del contenido de hierro en el hígado en respuesta a REGN7999 y REGN8023 también tuvo mayores efectos en ratones hembra después de 8 semanas de tratamiento. En la Tabla 23, todos los valores son medias ± DE, n=10-19 por grupo. ANOVA unidireccional; *p<0,01 vs. control de isotipo WT; **p<0,05 vs. Control de isotipo Hbb^{th3/+}.

Tabla 23: Efecto de REGN7999 y REGN8023 sobre el contenido de hepcidina sérica, hierro sérico y hierro hepático en un modelo de ratón con beta-talasemia

Grupo de tratamiento	Hepcidina sérica (ng/mL)	Hierro sérico (mg/dL)	Hierro en el hígado (mg/g peso seco) Cohorte femenina	Hierro en el hígado (mg/g peso seco) Cohorte masculina
Tratamiento de control de isotipos en ratones de tipo salvaje	225±107	167±27	466±64	215±49
Ratones Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn} Tratamiento de control de isotipos	511±232	128±31*	985±190*	364±123*
Ratones Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn} Tratamiento con REGN7999	1510±911* **	51±23* **	718±177**	293±119
Tratamiento con REGN8023 en ratones Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn}	1454±624* **	56±34 * **	732±182**	264±79

[0251] La administración de REGN7999 o REGN8023 en ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} provocó un aumento de glóbulos rojos (aproximadamente 10,51 M/µL y aproximadamente 10,18 M/µL, respectivamente) en comparación con los ratones tratados con control de isotipo (aproximadamente

8,72 M/ μ L; Tabla 24). Ocho semanas de tratamiento con REGN7999 o REGN8023 en ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{HumIn} condujeron a una reducción de los reticulocitos esplénicos (de aproximadamente el 38 % en el control de isotipo a aproximadamente el 18 %; Ter-119⁺/CD44^{alto}) y a un aumento de los niveles de RBC maduras (Ter-119⁺/CD44^{bajo}) tanto en el bazo como en la médula ósea, lo que indica una eritropoyesis mejorada y una menor necesidad de eritropoyesis secundaria en el bazo (Tabla 25). También se observó una reducción más significativa en el peso del bazo en ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{HumIn} tratados con anti-TMPRSS6 REGN7999 (aproximadamente 0,142 g) o REGN8023 (aproximadamente 0,130 g) en comparación con el control de isotipo (aproximadamente 0,301 g) (Tabla 24). En la Tabla 24, todos los valores son medias $\pm$ DE, n=10-19 por grupo. ANOVA unidireccional; *p<0,05 vs. control de isotipo WT; **p<0,05 vs. Control de isotipo $Hbb^{th3/+}$. En la Tabla 25, todos los valores son medias $\pm$ DE, n=10-19 por grupo. ANOVA unidireccional; *p<0,001 vs. control de isotipo WT; **p<0,0001 vs. Control de isotipo $Hbb^{th3/+}$.

Tabla 24: Efecto de REGN7999 y REGN8023 sobre los glóbulos rojos y el peso del bazo en un modelo de ratón con beta-talasemia

Grupo de tratamiento	Número de animales (n)	Glóbulos rojos (M/ml)	Peso del bazo (g)
Tratamiento de control de isotipos en ratones de tipo salvaje	16-19	10,05 $\pm$ 0,87	0,076 $\pm$ 0,014
Ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{HumIn} Tratamiento de control de isotipos	15-16	8,72 $\pm$ 0,27*	0,301 $\pm$ 0,112*
Ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{HumIn} Tratamiento con REGN7999	11-14	10,51 $\pm$ 0,87**	0,142 $\pm$ 0,053* **
Tratamiento con REGN8023 en ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{HumIn}	10-13	10,18 $\pm$ 0,47**	0,130 $\pm$ 0,046**

Tabla 25: Efecto de REGN7999 y REGN8023 sobre la médula ósea y los reticulocitos esplénicos y los glóbulos rojos en un modelo de ratón con beta-talasemia

Grupo de tratamiento	Reticulocitos de la médula ósea (% CD44^{alto} Ter119⁺)	Glóbulos rojos maduros de la médula ósea (% CD44^{bajo} Ter119⁺)	Reticulocitos del bazo (% CD44^{alto} Ter119⁺)	Glóbulos rojos maduros del bazo (% CD44^{bajo} Ter119⁺)
Tratamiento de control de isotipos en ratones de tipo salvaje	45,6±5,4	42,0±5,4	17,0±5,4	80,5±5,4
Ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} Tratamiento de control de isotipos	48,1±10,5	25,8±11,6*	38,0±8,2*	51,0±13,5*
Ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} Tratamiento con REGN7999	40,4±6,8	46,2±7,8**	18,1±3,2**	80,1±4,3**
Tratamiento con REGN8023 en ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}	41,5±9,4	45,7±10,1**	18,5±5,6**	78,2±7,9**

5

Ejemplo 13: Efecto de REGN7999 en un modelo de ratón de beta-talasemia

[0252] Para evaluar más a fondo la eficacia de REGN7999 descrita en el presente documento, se realizaron estudios en un modelo murino de beta-talasemia intermedia, como se describe en el Ejemplo 12.

10 **[0253]** Se generaron ratones con una delección heterocigótica de los genes $\beta 1$ y $\beta 2$, que recapitulan

la beta talasemia intermedia en humanos (Ginzburg, *Blood* (2011) 118(16):4321-4330), y expresión homocigótica de hemojuvelina humana (HJV) en lugar de HJV de ratón (denominado $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin}) en un fondo C57BL/6/129S6. A ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} (n=7-9; véase el Ejemplo 12 para obtener detalles sobre la generación de estos ratones) se les inyectó por vía subcutánea semanalmente 5 mg/kg de REGN7999 o control de isotipo (excepto que se administraron 2 inyecciones en 1 semana). Se incluyó un grupo de control de ratones de tipo salvaje (WT) y se le administró control de isotipo de manera similar. Después de 8 semanas, se procesaron los ratones y se recogieron muestras como se describe en el Ejemplo 12. Se midieron la hepcidina sérica, el hierro sérico y un panel hematológico completo, que incluía reticulocitos y glóbulos rojos maduros como se describe en el Ejemplo 12.

[0254] Además, después de sacrificar a los ratones, sus hígados se congelaron instantáneamente y luego se procesaron como se describe en el Ejemplo 12. Tanto los valores de hepcidina sérica (indicados en ng/ml) como los de contenido de hierro en el hígado (indicados en µg/g de peso seco) se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: Efecto de REGN7999 sobre el contenido de hepcidina sérica, hierro sérico y hierro hepático en un modelo de ratón con beta-talasemia

	Tratamiento de control de isotipos en ratones de tipo salvaje	Ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} Tratamiento de control de isotipos	Ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} Tratamiento con REGN7999
Hepcidina sérica (ng/mL)	376,8±217,6	713,1±435,8	1781±1053* **
Hierro sérico (mg/dL)	138,6±60,92	102,3±40,69	66,71±25,53*
Contenido de hierro en el hígado (µg/g de peso seco)	372,1±83,96	547,2±162,7*	513,9±95,83

[0255] Como se ilustra en la Tabla 26, después de 8 semanas de tratamiento con 5 mg/kg de REGN7999, los ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} habían aumentado significativamente (aproximadamente

1781 ng/ml) los niveles de hepcidina en suero en comparación tanto con ratones WT como con Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} tratados con control de isotipo (aproximadamente 376,8 ng/ml y aproximadamente 713,1 ng/ml, respectivamente). También se muestra en la Tabla 26, el tratamiento con REGN7999 condujo a una reducción significativa (aproximadamente 66 µg/dl) en el hierro sérico en comparación con ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} tratados con control de isotipo (aproximadamente 138 µg/dl). En los grupos de estudio de control tratados con isotipo, se observó un aumento en el contenido de hierro en el hígado de aproximadamente 372 µg/g de peso seco en ratones de tipo salvaje a aproximadamente 547 µg/g de peso seco en ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}. Si bien el tratamiento con REGN7999 no redujo significativamente el contenido de hierro en el hígado en comparación con el control de isotipo en ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} (aproximadamente 513,9 y aproximadamente 547,2 µg/g de peso seco, respectivamente), se observó una reducción significativa en comparación con los ratones de tipo salvaje tratados con control de isotipo (Tabla 26). En la Tabla 26, todos los valores son medias ± DE, n=7-9 por grupo; ANOVA unidireccional *p<0,05 vs. control de isotipo WT; **p<0,05 vs. Control de isotipo Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn}.

Tabla 27: Efecto de REGN7999 sobre el hematocrito, los glóbulos rojos y la hemoglobina en un modelo de ratón con beta-talasemia

	Tratamiento de control de isotipos en ratones de tipo salvaje	Ratones Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn} Tratamiento de control de isotipos	Ratones Hbb ^{th3/+} x HJV ^{HumIn} Tratamiento con REGN7999
Hematocrito (%)	36,92±1,924	28,31±1,969*	30,57±3,216**
Glóbulos rojos (m/mL)	9,52±0,81	8,93±0,68	11,2±0,51* **
Hemoglobina (g/dL)	13,02±0,73	9,22±0,54*	10,1±0,65* **

[0256] Como se muestra en la Tabla 27, los niveles de hematocrito, recuento de glóbulos rojos y hemoglobina fueron menores en ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} tratados con control de isotipo en comparación con ratones de tipo salvaje, como se esperaba. El hematocrito se redujo de aproximadamente el 37 % en ratones de tipo salvaje a aproximadamente el 28 % en ratones Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} tratados con 5 mg/kg de control de isotipo. El tratamiento con REGN7999 no mostró ningún efecto en comparación con el control de isotipo sobre el hematocrito en Hbb^{th3/+} x HJV^{HumIn} (Tabla 27). Los glóbulos rojos (indicados en M/µL) pasaron de aproximadamente 9,52 en ratones de

tipo salvaje a aproximadamente 8,93 en ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} tratados con control de isotipo. Después de 8 semanas de tratamiento con REGN7999 en ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} aumentaron significativamente los glóbulos rojos hasta aproximadamente 11,2 M μ l (Tabla 27). En ratones tratados con control de isotipo de tipo salvaje, los niveles de hemoglobina fueron de aproximadamente 13 g/dl y, como se muestra en la Tabla 27, el tratamiento con control de isotipo en ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} redujo significativamente la hemoglobina a aproximadamente 9,22 g/dl. El tratamiento con REGN7999 aumentó los niveles de hemoglobina a aproximadamente 10,1 g/dl después de 8 semanas de tratamiento en ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} . Sin estar ligados a ninguna teoría, estos datos respaldan la idea de que la restricción del hierro mediante la modulación de la vía de la hepcidina tiene un efecto beneficioso sobre los glóbulos rojos. En la Tabla 27, todos los valores son medias $\pm$ DE, n=6-9 por grupo; ANOVA unidireccional *p<0,05 vs. control de isotipo WT; **p<0,05 vs. Control de isotipo $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} .

Ejemplo 14: Farmacocinética (PK) y farmacodinamia (PD) en monos *cynomolgus*

[0257] El objetivo de este estudio fue determinar las características farmacocinéticas (PK) y la relación farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD) de dos anticuerpos monoclonales humanos (mAb) anti-TMPRSS6. Para este estudio, se administraron REGN7999 y REGN8023 como una única infusión intravenosa (IV) a monos *cynomolgus* hembra.

[0258] Como se resume en la Tabla 28, se asignaron 21 monos *cynomolgus* hembra a uno de 6 grupos (n = 3 o 4 animales por grupo; grupos de dosis de 5 mg/kg o 15 mg/kg). Los animales recibieron una única infusión IV de 5 mg/kg de REGN7999, 5 mg/kg de REGN8023, 15 mg/kg de REGN7999, 15 mg/kg de REGN8023 o 15 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo (Tabla 28). Se recogieron muestras de sangre para la determinación de las concentraciones totales del fármaco de todos los animales antes de la dosis y en diversos momentos a lo largo del período de 56 días de vida. Las concentraciones de mAb humano total en suero se determinaron utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) Fc anti-humano calificado. Los parámetros farmacocinéticos se estimaron mediante análisis no compartimental (NCA). Se recogieron muestras de sangre para farmacodinamia en varios momentos a lo largo del estudio y se analizaron mediante análisis estándar de química clínica (analizador Beckman Coulter AU680) y hematología (analizador Avida 120). La hepcidina sérica se midió utilizando el kit ELISA Hpcidin Murine-Compete disponible comercialmente (Intrinsic Lifesciences, Cat: HMC-001, Lote: 08232019) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 28: Resumen de dosis y grupos de dosis

Grupo n.º	Artículo de prueba o control	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (mL/kg)	Número de animales
1	Anticuerpo de control de isotipo	15	7,5	3
2	REGN7999	5	2,5	3
3	REGN7999	15	7,5	4
4	REGN8023	5	2,5	3
5	REGN8023	15	7,5	4

Nota: Los resultados y el análisis se centran únicamente en PK/PD de los artículos de prueba REGN7999 y REGN8023 (Grupos 2 a 5).

[0259] El perfil farmacocinético de los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-TMPRSS6 REGN7999 o REGN8023 se describe mediante una cinética no lineal, con eliminación mediada por el objetivo (TMC) en concentraciones bajas y una cinética lineal, proporcional a la dosis, consistente con la saturación de la vía de eliminación mediada por el objetivo en altas concentraciones de mAb. Después de una administración intravenosa de dosis única, los perfiles de tiempo de concentración de REGN7999 y REGN8023 totales se caracterizaron por una breve fase de distribución inicial, seguida de una breve fase de eliminación beta lineal y, en concentraciones bajas, una fase de eliminación terminal no lineal mediada por objetivo y una fase de eliminación mediada por objetivos posteriores. No se observó evidencia definitiva de un impacto similar al de los anticuerpos antifármacos (ADA) en los perfiles y no se observó ningún impacto aparente en la exposición; por lo tanto, no se excluyó del análisis ningún valor de concentración.

[0260] Los parámetros farmacocinéticos se enumeran en la Tabla 29. Después de una dosis intravenosa única de 5 y 15 mg/kg de anticuerpo, se observaron valores de concentración sérica máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de aproximadamente 120 y aproximadamente 410 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, para REGN7999, y valores de $C_{m\acute{a}x}$ de aproximadamente 162 y aproximadamente 508, respectivamente, se observaron para REGN8023. Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ ($C_{m\acute{a}x}/\text{Dosis}$) correspondientes a la dosis normalizada estaban dentro de aproximadamente 1,4 veces, lo que indica un aumento proporcional a la dosis en la $C_{m\acute{a}x}$ con el aumento de la dosis IV para los mAb anti-TMPRSS6 REGN7999 y REGN8023. Se observó un $t_{m\acute{a}x}$ medio (tiempo necesario para alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$) de aproximadamente 0,5 h, el primer momento medido, para todos los grupos de dosis.

[0261] La exposición (AUC_{inf}) a REGN7999 aumentó más que proporcionalmente a la dosis, con AUC_{inf}/dosis después de la administración de 15 mg/kg de REGN7999 aproximadamente 1,6 veces

mayor que después de la dosis de 5 mg/kg. En consonancia con esto, se observó una mayor eliminación corporal total (CL) con la dosis de 5 mg/kg debido a un mayor impacto del TMC en concentraciones más bajas. La exposición a REGN8023 aumentó proporcionalmente al aumentar la dosis, lo que sugiere un efecto más modesto de TMC en las dosis examinadas. La vida media terminal ($t_{1/2}$) que representa TMC en todos los grupos de dosis osciló entre aproximadamente 7 y 8 días.

Tabla 29: Parámetros farmacocinéticos medios de REGN7999 total y REGN8023 total después de una administración en bolo intravenoso único a monos *Cynomolgus* hembra

Parámetro	Unidad	REGN7999				REGN8023			
		5 mg/kg (n=3)		15 mg/kg (n=4)		5 mg/kg (n=3)		15 mg/kg (n=4)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
$C_{m\acute{a}x}$	µg/mL	120	7,57	410	47,2	162	16,2	508	55,0
$C_{m\acute{a}x}/dosis$	(µg/mL) / (mg/kg)	23,9	1,51	27,3	3,15	32,5	3,24	33,9	3,66
$t_{m\acute{a}x}$	h	0,500	0	0,500	0	0,500	0	0,500	0
AUC_{inf}	día•(µg/mL)	831	153	3950	617	1440	182	4500	951
$AUC_{inf}/Dosis$	día•(µg/mL) / (mg/kg)	166	30,7	263	41,2	289	36,4	300	63,4
CL	ml/día/kg	6,17	1,25	3,88	0,680	3,50	0,446	3,46	0,792
V_{ss}	mL/kg	57,2	1,31	57,6	6,65	37,7	2,41	42,8	7,02
Terminal $t_{1/2}$	día	8,10	0,592	7,74	0,949	7,49	0,577	7,39	2,09

[0262] Como se muestra en la Tabla 30, se siguieron los efectos farmacodinámicos de REGN7999 y REGN8023 sobre la hepcidina sérica, el hierro sérico y la saturación de transferrina durante el transcurso del estudio de 57 días. En los grupos tratados con 5 mg/kg o 15 mg/kg de REGN7999 o REGN8023, el hierro sérico medio se redujo aproximadamente un 60 % con respecto a las concentraciones de referencia de hierro sérico el día 1 después de la dosificación.

[0263] Como se muestra en la Tabla 31, la saturación de transferrina disminuyó a aproximadamente 12 % el día 1 desde aproximadamente 35 % a la referencia, lo que representa

una mejora en la capacidad de transporte de hierro sérico. El efecto de PD en el día 1 fue independiente de la dosis, lo que sugiere una saturación de la unión de TMPRSS6 en las concentraciones alcanzadas el día 1 con dosis altas y bajas de REGN7999 y REGN8023. La reducción de la saturación de hierro sérico y transferrina se mantuvo durante al menos 6 semanas después de la administración de REGN7999 en los grupos de dosis de 5 mg/kg y 15 mg/kg. En el grupo de dosis de 5 mg/kg de REGN8023, el efecto farmacodinámico sobre el hierro sérico comenzó a regresar a la referencia aproximadamente 1 semana después de la administración intravenosa y no fue estadísticamente diferente del tratamiento de control de isotipo en la semana 4. En el grupo de dosis de 15 mg/kg de REGN8023, los efectos farmacodinámicos tuvieron una duración más prolongada que en el grupo de 5 mg/kg de REGN8023 debido a concentraciones más altas sostenidas del fármaco. Tanto la saturación de hierro sérico como la de transferrina regresaron aproximadamente a los valores de referencia en la mayoría de los animales en el día 57.

[0264] Como se muestra en la Tabla 32, las concentraciones séricas de hepcidina aumentaron ligeramente después de la dosificación de REGN7999 o REGN8023, aunque se observó una gran variabilidad entre animales.

Tabla 30: Farmacodinamia, valores medios (+/- DE) de hierro sérico

Grupo de dosis:	% de cambio en el hierro sérico vs. Referencia		
	Día 1	Día 29	Día 57
Anticuerpo de control de isotipo (15 mg/kg)	-17,1 ± 18,0	-22,9 ± 6,8	-13,0 ± 9,6
REGN7999 (5 mg/kg)	-62,7 ± 4,8 ****	-62,5 ± 2,9 ***	-31,6 ± 11,3
REGN7999 (15 mg/kg)	-65,0 ± 9,6 ****	-67,2 ± 4,9 ****	-30,9 ± 20,6
REGN8023 (5 mg/kg)	-59,9 ± 7,3 ***	-41,4 ± 14,7	-16,4 ± 15,7
REGN8023 (15 mg/kg)	-62,7 ± 8,4 ****	-69,9 ± 11,5 ****	-39,0 ± 19,3 *

Tabla 31: Farmacodinámica, valores medios (+/- DE) de saturación de transferrina

Grupo de dosis:	Saturación de transferrina (%)			
	Referencia (Día 0)	Día 1	Día 29	Día 57
Anticuerpo de control de isotipo (15 mg/kg)	34,6 ± 8,7	27,3 ± 9,2	24,5 ± 3,6	20,1 ± 0,4
REGN7999 (5 mg/kg)	34,9 ± 9,8	12,5 ± 4,8 ***	11,3 ±	18,8 ±

			2,4 **	0,4
REGN7999 (15 mg/kg)	34,1 ± 1,8	12,3 ± 4,8 ***	10,4 ± 2,8 ***	17,3 ± 0,5
REGN8023 (5 mg/kg)	32,0 ± 3,4	12,9 ± 4,2 **	16,9 ± 3,8	15,8 ± 0,4
REGN8023 (15 mg/kg)	29,3 ± 7,7	11,7 ± 3,2 ***	9,1 ± 4,4 ***	14,3 ± 0,5

Tabla 32: Farmacodinamia, valores medios (+/- DE) de hepcidina sérica

Grupo de dosis:	% de cambio en la hepcidina sérica vs. Referencia		
	Día 1	Día 29	Día 57
Anticuerpo de control de isotipo (15 mg/kg)	-19,5	-36,4	-37,2
REGN7999 (5 mg/kg)	261,1	-32,1	-10,7
REGN7999 (15 mg/kg)	162,7**	50,4	4
REGN8023 (5 mg/kg)	52,2	-42,5	-18,8
REGN8023 (15 mg/kg)	132,2	7,9	-34,0

Todos los valores son media ± DE, n=3-4 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett;

5 *p<,05 vs. isotipo **p<,01 vs. control de isotipo; ***p<,001 vs. control de isotipo; ****p<,0001 vs. control de isotipo

Ejemplo 15: Efecto de REGN7999 sobre la capacidad anaeróbica en modelo de ratón de beta talasemia

10

[0265] Se evaluó el efecto del tratamiento con REGN7999 sobre la capacidad anaeróbica en un modelo murino de beta talasemia.

[0266] Se generaron ratones con una delección heterocigótica de los genes $\beta 1$ y $\beta 2$, que recapitulan la beta talasemia intermedia en humanos (Ginzburg, *Blood* (2011) 118(16):4321-4330), y expresión homocigótica de hemojuvelina humana (HJV) en lugar de HJV de ratón (denominado $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin}) en un fondo C57BL/6/129S6. Ratones $Hbb^{th3/+}$ x HJV^{Humin} (Ejemplo 12 para más detalles sobre la generación de estos ratones).

[0267] El tratamiento con REGN7999 en ratones $Hbb^{th3/+}$ parece conducir a un aumento de glóbulos rojos que parecen más pequeños, más saludables y tienen un recambio más lento (ver, por ejemplo, el Ejemplo 13). Sin embargo, no se sabía si esto se traduciría en una mejora funcional de

20

los glóbulos rojos después del tratamiento con REGN7999. Por ejemplo, no se sabía si estos glóbulos rojos más pequeños pero más sanos son capaces de suministrar suficiente oxígeno en condiciones anaeróbicas, como cuando se corre por agotamiento.

[0268] Para probar esto, se sometió a ratones $Hbb^{th3/+}$ a estudios de carrera forzada (consulte el plan de estudio que se muestra en la Figura 1). Antes de todos los experimentos, los ratones fueron entrenados durante 2 semanas en la cinta de una cinta de correr motorizada de seis carriles (Cinta de correr Serie 8, IITC Life Science) provista de placas de choque. Para la carrera de agotamiento, la velocidad base (10 m/min) se incrementó cada 5 min en 5 m/min. La cantidad máxima de distancia se determinó a los 60 min. Los ratones que permanecieron inactivos en la unidad de descarga o recibieron 500 descargas fueron retirados de la cinta de correr.

[0269] Se observó que los ratones $Hbb^{th3/+}$ corrían una distancia significativamente menor que los ratones C57BL/6 de tipo salvaje tratados con anticuerpo de control de isotipo (REGN1945), lo que sugiere que estos ratones se agotaron más rápido (Figura 2A). Los ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados con 10 mg/kg de REGN7999 pudieron correr una distancia similar a la de los animales de tipo salvaje (Figura 2A), lo que indica que la mejora de la salud de los glóbulos rojos observada con el tratamiento con REGN7999 se refleja en una capacidad anaeróbica mejorada. Los ratones C57BL/6 de tipo salvaje inyectados con REGN7999 no mostraron diferencias en la distancia de carrera en comparación con los ratones tratados con isotipo, lo que indica que REGN7999 no mejora la capacidad de carrera en ratones no $Hbb^{th3/+}$ (Figura 3).

[0270] También se recogieron mediciones de lactato. Para determinar la producción de lactato, se recogieron 15 ml de sangre de la vena de la cola después de la carrera de agotamiento. Los niveles de lactato se determinaron utilizando un lactómetro (Nova Biomedical) como se describe en Summermatter et al. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 2013;110(21):8738-43. Los ratones de control $Hbb^{th3/+}$ produjeron más lactato en sangre a pesar de correr menos distancia que los ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados con REGN7999, lo que sugiere además una mejor salud de los glóbulos rojos (Figura 2B).

Ejemplo 16: Efectos de REGN7999 y Acvr2b(L79D)-Fc sobre el hierro hepático y la eficacia de la eritropoyesis

[0271] Se ha demostrado que Acvr2b(L79D)-Fc mejora la eritropoyesis ineficaz y aumenta la hemoglobina en ratones y humanos (ver, por ejemplo, Cappellini et al. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1219-31; Suragani et al. *Blood* 2014;123(25):3864-72). Como se muestra en este documento, el bloqueo de TMPRSS6 con REGN7999 parece mejorar la eritropoyesis ineficaz y conduce a más glóbulos rojos y más sanos. Se evaluó el efecto del tratamiento con REGN7999 sobre el hierro hepático y la eficacia de la eritropoyesis y se comparó con el tratamiento con

Acvr2b(L79D)-Fc en un modelo de ratón con beta talasemia.

[0272] Para comparar los efectos del tratamiento con REGN7999 (10 mg/kg) y el tratamiento con Acvr2b(L79D)-Fc (10 mg/kg), a ratones $Hbb^{th3/+}$ se les administró una de las dos moléculas durante 8 semanas. Se midieron los contenidos de hepcidina sérica, hierro sérico y hierro hepático como se describe en el Ejemplo 10. Después de 8 semanas de tratamiento con cualquiera de las moléculas, se observó que el tratamiento con REGN7999 aumentó la hepcidina sérica, redujo el hierro sérico y el contenido de hierro hepático, pero el tratamiento con Acvr2b(L79D)-Fc no tuvo efecto sobre estos parámetros (Figuras 4A-C). Acvr2b(L79D)-Fc elevó el peso corporal pero no tuvo efecto sobre el peso del hígado (Figura 5). Se demostró que el tratamiento con REGN7999 reduce el peso del bazo, pero el tratamiento con Acvr2b(L79D)-Fc no (Figura 6). Los ratones de control $Hbb^{th3/+}$ tienen una esplenomegalia significativa, que se revirtió en parte mediante el tratamiento con REGN7999. El tratamiento con Acvr2b(L79D)-Fc no proporcionó ningún cambio en la esplenomegalia de los ratones $Hbb^{th3/+}$.

[0273] También se recogió un panel de hemograma de los animales tratados. Como se ve en los ejemplos anteriores, el panel de recuento sanguíneo muestra que el tratamiento con REGN7999 aumenta significativamente el recuento de glóbulos rojos en ratones $Hbb^{th3/+}$ (Tabla 33). El tratamiento con Acvr2b(L79D)-Fc aumentó significativamente la hemoglobina, pero no el recuento de glóbulos rojos en comparación con los controles de $Hbb^{th3/+}$. Sin embargo, el tratamiento con REGN7999 mostró un aumento significativo del recuento de glóbulos rojos (Tabla 33).

[0274] Se utilizó citometría de flujo para confirmar este hallazgo. Se incubaron glóbulos rojos aislados de bazo o médula ósea con bloqueador de Fc murino (anti-CD16/32, BD Biosciences) durante 10 minutos, seguido de incubación con isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-Ter119, ficoeritrina (PE) anti-CD71, alofococianina (APC) anti-CD44 y un cóctel de APC-cianina7 (APC-Cy7) anti-CD45/CD11b/Ly6G durante 30 minutos (todos anticuerpos de BD Biosciences). Para excluir las células muertas del análisis, las células se tiñeron con Sytox AADvanced durante 30 minutos (Thermofisher). Todos los procedimientos de tinción se realizaron en hielo. Los controles de compensación se realizaron utilizando OneComp Beads (Invitrogen) y se prepararon en el momento de la tinción celular. Se preparó un panel de control menos uno para controlar correctamente las poblaciones objetivo. Todas las muestras se midieron en un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman-Coulter).

[0275] Los datos de citometría de flujo mostraron un aumento de glóbulos rojos maduros esplénicos solo en ratones tratados con REGN7999, pero no en ratones tratados con Acvr2b(L79D)-Fc (**Figura 7**). El tratamiento con REGN7999 también mostró una reducción de reticulocitos, que no se observó con el tratamiento con Acvr2b(L79D)-Fc (**Figura 8**).

Tabla 33: Panel de recuento sanguíneo de ratones $Hbb^{th3/+}$ tratados con REGN7999 o Acvr2b(L79D)-Fc

Grupo	WT REGN1945	$Hbb^{th3/+}$ REGN1945	$Hbb^{th3/+}$ REGN7999	$Hbb^{th3/+}$ Acvr2b(L79D)-Fc
<i>n</i>	7	7	6	6
Glóbulos rojos (m/mL)	10,25 ± 0,52	9,82 ± 1,47	11,65 ± 0,44**	11,08 ± 1,19
Reticulocitos (% de glóbulos rojos)	0,001 ± 0,004	0,26 ± 0,41	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,21
Hematocrito (%)	42,64 ± 3,65	30,90 ± 3,95*	30,58 ± 1,76	31,82 ± 4,29
Hemoglobina (g/dL)	14,26 ± 0,63	10,11 ± 1,23*	10,37 ± 0,39	11,82 ± 1,24**
Volumen corpuscular medio (fL)	41,7 ± 1,27	31,63 ± 2,55*	26,25 ± 0,83**	31,35 ± 2,09***

SECUENCIAS

5

Tabla 34: Secuencias de ADN y proteínas (PRT) ejemplares de la descripción

SEQ ID NO:	Secuencia de ADN/PRT	Secuencia
1	ADN	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATA ACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG AGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTAATGAATATTATTCA GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGC TGTATATTACTGTGCGAGAGATCAGGACTACGGTGGTAACCTCTTTC ATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA
2	PRT	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNNGMHVWRQAPGKGLE WVAIISYDGSNEYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDQDYGGNLFHYWGQGLTVTVSS

3	ADN	GGATTCACCTTCAATAACTATGGC
4	PRT	GFTFNNG
5	ADN	ATATCATATGATGGAAGTAATGAA
6	PRT	ISYDGSNE
7	ADN	GCGAGAGATCAGGACTACGGTGGTAACCTCTTTCATTAC
8	PRT	ARDQDYGGNLFHY
9	ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAG CTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTT CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT CTGCAACCTGAAGATTTTGCACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAG TACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
10	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPIT FGQGTRLEIK
11	ADN	CAGAGCATTAGCAGCTAT
12	PRT	QSISSY
13	ADN	GCTGCATCC
14	PRT	AAS
15	ADN	CAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCC
16	PRT	QQSYSTPPIT
17	ADN	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAATA ACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG AGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTAATGAATATTATTCA GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGC TGTATATTACTGTGCGAGAGATCAGGACTACGGTGGTAACCTCTTTC ATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCAC CTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACG

		AAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTG CCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGT TCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTC TCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
18	PRT	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNNGMHVWRQAPGKGLE WVAIISYDGSNEYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYY CARDQDYGGNLFHYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK*
19	ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAG CTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTT CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT CTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAG TACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA

		GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT AG
20	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPPIT FGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
21	ADN	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGT ACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTAATGACTACTATTT AGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGACACGG CTGTGTATTACTGTGCGAAAGATCAGGGGCTACGGTGGTAACCTCTTT GCCTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
22	PRT	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLE WVAIISYDGSNDYYLDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNNLRAEDTAVYY CAKDQGYGGNLFASWGQGTLVTVSS
23	ADN	GGATTCACCTTCAGTACCTATGGC
24	PRT	GFTFSTYG
25	ADN	ATATCATATGATGGAAGTAATGAC
26	PRT	ISYDGSND
27	ADN	GCGAAAGATCAGGGCTACGGTGGTAACCTCTTTGCCTCC
28	PRT	AKDQGYGGNLFAS
29	ADN	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGT ACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTAATGACTACTATTT AGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGACACGG

		CTGTGTATTACTGTGCGAAAGATCAGGGCTACGGTGGTAACCTCTTT GCCTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGC ACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCC TGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTC CCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCA GTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCT CTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
30	PRT	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLE WVAIISYDGSNDYYLDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNNLRAEDTAVYY CAKDQGYGGNLFASWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK*
31	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCGGGG

		GGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAA CGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTTGGCCGTATTAAGCAAACTGATAGTGGGACAACAGAC TACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATT CAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA CACAGCCGTGTATTACTGTACCACAGTGGATAACGATTTTTGGAGTG GTTATTATAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC TGTCTCCTCA
32	PRT	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDSGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAV YYCTTVDNDFWWSGYYNWFDPWGQGLVTVSS
33	ADN	GGATTCACTTTTCAGTAACGCCTGG
34	PRT	GFTFSNAW
35	ADN	ATTAAGCAAACTGATAGTGGGACAACA
36	PRT	IKSKTDSGTT
37	ADN	ACCACAGTGGATAACGATTTTTGGAGTGGTTATTATAACTGGTTCGA CCCC
38	PRT	TTVDNDFWWSGYYNWFDP
39	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCGGGG GGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAA CGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTTGGCCGTATTAAGCAAACTGATAGTGGGACAACAGAC TACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATT CAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA CACAGCCGTGTATTACTGTACCACAGTGGATAACGATTTTTGGAGTG GTTATTATAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC TGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTC CCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCAT CAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCC

		CGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAA GACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCC TCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA CAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
40	PRT	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLE WVGRIKSKTDSGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAV YYCTTVDNDFWSGYYNWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPSPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*
41	ADN	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTAAGCCTGGG GGGTCCCTGAGAATTTCTGTGCAGCCTCTGGATTTATTTTTGTTGA TTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGA GTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGTATAGGCTATGCG GACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA AGTCCCTGTATCTGCAAATGAGTGGTCTGAGACCTGAGGACACGGC CTTGATTATTGTGTAAAAAGTGGGTTCTATTACGTTAGGTCTTACTT TGACAACCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
42	PRT	EVQLVESGGGLVKPGGSLRISCAASGFIFVDYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMSGLRPEDTALYYC VKSGFYVRSYFDNWGQGLTVTVSS
43	ADN	GGATTTATTTTTGTTGATTATGCC

44	PRT	GFIFVDYA
45	ADN	ATTAGTTGGAATAGTGGTAGTATA
46	PRT	ISWNSGSI
47	ADN	GTAAAAAGTGGGTTCTATTACGTTAGGTCTTACTTTGACAAC
48	PRT	VKSGFYVRSYFDN
49	ADN	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGGA TAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACTGGTACCTGCGGAAGCCA GGGCAGTCTCCACAACCTCCTGATCTATACGCTTTCTATCGGGCCTC TGGAGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTT ACACTGAAAATCAGTAGGGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTA CTGCATGCAACGTATAGAGTTTCCGCTCACTTTCTGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAA
50	PRT	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLDSDDGNTYLDWYLRKPGQ SPQLLIYTLSYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCMQ RIEFPLTFGGGTKVEIK
51	ADN	CAGAGCCTCTTGATAGTGATGATGGAAACACCTAT
52	PRT	QSLDSDDGNTY
53	ADN	ACGCTTTCC
54	PRT	TLS
55	ADN	ATGCAACGTATAGAGTTTCCGCTCACT
56	PRT	MQRIEFPLT
57	ADN	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTAAGCCTGGG GGGTCCCTGAGAATTTCTGTGCAGCCTCTGGATTTATTTTTGTTGA TTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGA GTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGTATAGGCTATGCG GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA AGTCCCTGTATCTGCAAATGAGTGGTCTGAGACCTGAGGACACGGC CTTGATTATTGTGTAAAAAGTGGGTTCTATTACGTTAGGTCTTACTT TGACAACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGC ACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA

		CGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCC TGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCA GTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCT CTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
58	PRT	EVQLVESGGGLVKPGGSLRISCAASGFIFVDYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMSGLRPEDTALYYC VKSGFYVRSYFDNWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLK*
59	ADN	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCTG GAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGGA TAGTGATGATGGAAACACCTATTTGGACTGGTACCTGCGGAAGCCA GGGCAGTCTCCACAACCTCCTGATCTATACGCTTTCCTATCGGGCCTC TGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTC ACACTGAAAATCAGTAGGGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTTTATTA CTGCATGCAACGTATAGAGTTTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT

		CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGTTAG
60	PRT	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLRKPGQ SPQLLIYTLSYRASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCMQ RIEFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
61	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGG CGGTCCCTGAGACTCTCCTGTATAGCTTCTGGATTCAACTTTGGTGA TTATGGTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTAGGTTTCATTAGAAGCAAAGCTTATGGTGGGACAACAGAA TACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATT CCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA CGCAGCCATGTATTACTGTTCTAGAGATTATTACGATATTTTGACTGG TTATTATGGCGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
62	PRT	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCIASGFNFGDYGMSWVRQAPGKGLE WVGFIIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDAAM YYCSRDIYDILTGYYG DYWGQGLTVTVSS
63	ADN	GGATTCAACTTTGGTGATTATGGT
64	PRT	GFNFGDYG
65	ADN	ATTAGAAGCAAAGCTTATGGTGGGACAACA
66	PRT	IRSKAYGGTT
67	ADN	TCTAGAGATTATTACGATATTTTGACTGGTTATTATGGCGACTAC
68	PRT	SRDIYDILTGYYG DY
69	ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAG CTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC CTGATCTATCAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGCAGC

		CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAATATAATAGT TATTCTCGGACGTTCTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
70	PRT	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY QASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYSRT FGQGTKVEIK
71	ADN	CAGAGTATTAGTAGCTGG
72	PRT	QSISSW
73	ADN	CAGGCGTCT
74	PRT	QAS
75	ADN	CAACAATATAATAGTTATTCTCGGACG
76	PRT	QQYNSYSRT
77	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGG CGGTCCCTGAGACTCTCCTGTATAGCTTCTGGATTCAACTTTGGTGA TTATGGTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTAGGTTTCATTAGAAGCAAAGCTTATGGTGGGACAACAGAA TACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATT CCAAAAGCATCGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA CGCAGCCATGTATTACTGTTCTAGAGATTATTACGATATTTTGACTGG TTATTATGGCGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCT CCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATG CCCACCCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTC CTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCG AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG

		GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAG AAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
78	PRT	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCIASGFNFGDYGMSWVRQAPGKGLE WVGFIISKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDAAM YYCSRDIYDILTGYYGDIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*
79	ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAG CTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC CTGATCTATCAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAATATAATAGT TATTCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
80	PRT	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY QASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYNYSRT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

81	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGG GGGTCCCTGAGAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGTCACTTTCAGTA ACGTCTGGATGAGTTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGGAAGGGGCTGG AATGGGTTGGCCGTATTAAGCAAACTGATGGTGGGACAACAGA CTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTTACCATCTCAAAGATGATT CAAAAATACGTTGTTCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGAC ACAGCCGTGTATTACTGTACCACAGAGACCGGCGATTTTTGGAGTG GTTATTATCCTCGCTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAC CGTCTCCTCA
82	PRT	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGVTFSTNVWMSWVRQVPGKLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISKDDSKNTLFLQMNSLKTEDTAV YYCTTETGDFWSGYYPHFQHWGQGTLVTVSS
83	ADN	GGAGTCACTTTCAGTAACGTCTGG
84	PRT	GVTFSTNVW
85	ADN	ATTAAGCAAACTGATGGTGGGACAACA
86	PRT	IKSKTDGGTT
87	ADN	ACCACAGAGACCGGCGATTTTTGGAGTGGTTATTATCCTCGCTTCCA GCAC
88	PRT	TTETGDFWSGYYPHFQ
89	ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTATATTAGCAC CTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAGCCTCC TGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGATCTTACTCCTGTCAACAGAGTTACAGT ACCCCTCCGTACACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
90	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISTYLNWYQQKPGKAPSLIY AASSLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFASYSCQSYSTPPY TFGQGTKLEIK
91	ADN	CAGTATATTAGCACCTAT
92	PRT	QYISTY
93	ADN	CAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGTACACT
94	PRT	QSYSTPPYT
95	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGG GGGTCCCTGAGAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGTCACTTTCAGTA

		ACGTCTGGATGAGTTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGGAAGGGGCTGG AATGGGTTGGCCGTATTAAGCAAACTGATGGTGGGACAACAGA CTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTTACCATCTCAAAGATGATT CAAAAATACGTTGTTCTTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAAGAC ACAGCCGTGTATTACTGTACCACAGAGACCGGCGATTTTTGGAGTG GTTATTATCCTCGCTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCAC CGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTC CCCCATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCAT CAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAA GACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCC TCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT ACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA CAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
96	PRT	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGVTFSTNVWMSWVRQVPGKLE WVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISKDDSKNTLFLQMNSLKTEDTAV YYCTTETGDFWSGYPRFQHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG

		LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK*
97	ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTATATTAGCAC CTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAGCCTCC TGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCATCTTACTCCTGTCAACAGAGTTACAGT ACCCCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTA G
98	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISTYLNWYQQKPGKAPSLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFASYSCQQSYSTPPY TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
99	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTA GCTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGATACTAGCACATACTACGCA GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA ACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTATATTACTGTGCGAAACATCAAGATTACGATTTTTCCTACTACTA CTCCGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCA
100	PRT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLE WWSAISGSDTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYY CAKHQDYDFSYYYSAMDVWGQGTITVTVSS

101	ADN	GGATTCACCTTTAGTAGCTATGCC
102	PRT	GFTFSSYA
103	ADN	ATTAGTGGTAGTGATACTAGCACA
104	PRT	ISGSDTST
105	ADN	GCGAAACATCAAGATTACGATTTTTCTACTACTACTCCGCTATGGACGTC
106	PRT	AKHQDYDFSYYYSAMDV
107	ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCATCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGATTTCAACAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACTCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCGACTTACTATTGTCAGCAGACTGACAGTTTCCCATTCACTTTTGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
108	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDFNSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTDSFPFTFGPGTKVDIK
109	ADN	CAGGATTTCAACAGCTGG
110	PRT	QDFNSW
111	ADN	CAGCAGACTGACAGTTTCCCATTCACT
112	PRT	QQTDSFPFT
113	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGATACTAGCACATACTACGCA GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACATCAAGATTACGATTTTTCTACTACTACTCCGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGC

		AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCAT GCCACCCCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTT CCTGTTCCCCC AAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCC GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAG AAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
114	PRT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLE WWSAISGSDTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYY CAKHQDYDFSYYYSAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK*
115	ADN	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCATCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGATTTCAACAG CTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACTC CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC CTGCAGCCTGAAGATTTTGCGACTTACTATTGTCAGCAGACTGACAG TTTCCCATTCACTTTTGGCCCTGGGACCAAAGTGATATCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA

		TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACCTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
116	PRT	DIQMTQSPSSLSASVGDRIITCRASQDFNSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTDSFPFTF GPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
117	PRT	GYKAEVMVSQVYSGSLRVLNRHFSQDLTRRESSAFRSETAKAQKMLK ELITSTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFILQIPEHRRMLLSPEVVQA LLVEELLSTVNSSAAVPYRAEYEVDP EGLVILEASVKDIAALNSTLGCYR YSYVGQGQVLRRLKGPDLASSCLWHLQGP KDLMLKLRLEWTLAECD RLAMYDVAGPLEKRLITSVYGCSRQEPVVEVLASGAIMAVVWKKGLHS YYDPFVLSVQPWFQACEVNLTLDNRLDSQGVLPSTPYFPSYSPQTHC SWHLTVPSLDYGLALWFDAYALRRQKYDLPCTQGQWTIQNRRLCGLRI LQPYAERIPVVATAGITINFTSQISLTGPGVRVHYGLYNQSDPCPGEFLC SVNGLCVPACDGVKDCPNGLDERNCVCRATFQCKEDSTCISLPKVCD GQPDCLNGSDEEQCQEGVPCGTFTFQCEDRSCVKKPNPQCDGRPDC RDGSDEEHCDCLGQGPSSRIVGGAVSSEGEWPWQASLQVRGRHICG GALIADRWVITAAHCFQEDSMASVLTWTVFLGKVVQNSRWPGEVSFK VSRLLLHPYHEEDSHDYDVALQLDHPVVRSAAVRPVCLPARSHFFEP GLHCWITGWGALREGGPISNALQKVDVQLIPQDLCSEVYRYQVTPRML CAGYRKGGKDACQGDAGGPLVCKALSGRWFLAGLVSWGLGCGRPNY FGVYTRITGVISWIIQQVVTEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH
118	PRT	KA EVTVSQVYSGSLRVLNRHFSQDLGRRESIAFRSES AKAQKMLQELV ASTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFILDIPEYQRLTLSPEVVRELLV DELLSNSSTLAS YKTEYEVDP EGLVILEASVNDIVLNLSTLGCYRYSYVN PGQVLP LKGPDQQTTSCLWHLQGPEDLMIKVRLEWTRVDCRDRVAMY DAAGPLEKRLITSVYGCSRQEPVMEVLASGSVM AVVWKKGMHSYYDP FLLSVKSVAFQDCQVNLTEGRLDTQGFLRTPYYPSYSPSTHCSWHL TVPSLDYGLALWFDAYALRRQKYNRLCTQGQWMIQNRRLCGFRTLQP YAERIPMVASDGV TINFTSQISLTGPGVQVYYSLYNQSDPCPGEFLCSV NGLCVPACDGIKDCPNGLDERNCVCRAMFQCQEDSTCISLPRVCDRQ

		PDCLNGSDEEQCQEGVPCGTFTFQCEDRSCVKKPNPECDGQSDCRD GSDEQHCDCLQLGLSSRIVGGTVSSEGEWPWQASLQIRGRHICGGALI ADRWVITAAHCFQEDSMASPKLWTVFLGKMRQNSRWPGEVSFKVSRL FLHPYHEEDSHDYDVALLQLDHPVVYSATVRPVCLPARSHFFEPGQHC WITGWGAQREGGPVSNTLQKVDVQLVPQDLCSEAYRYQVSPRMLCA GYRKGGKDACQGDAGGPLVCREPSGRWFLAGLVSWGLGCGRPNFFG VYTRVTRVINWIQQVLTEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH
119	PRT	GYKAEVTVSQVYSGSLRVLNRHFSQDLTRRESSAFRSETAKAQKMLKE LIASTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFILQIPEHRRMLLSPEVVQAL LVEELLSTVNSSAAVPYRAEYEVDP EGLVILEASVKDIAALNSTLG CYRY SYVGQGGVLRRLKGPDLHLASSCLWHLQGPEDLMLKLRLEWTLAECDR LAMYDVAGPLEKRLITSVYGCSRQEPVVEVLASGAIMAVVWKKGLHSY YDPFMLSQSVVFQACEVNLTLDDRIDSQGVLPSTPYFPSYSPRTHCS WHLTVPSLDYGLALWFDAYALRRQKYDLPCTQGQWTIQNRRLCGLRIL QPYAERIPVVATAGITINFTSQISLTGPGVRVHYGLYNQSDPCPGEFLCS VNGLCVPACDGVKDCPNGLDERNCVCRAFQCEQEDSTCISLLKVC DG QPDCLNGSDEERCQEGVPCGTFTFQCEDQSCVKKPNPQCDGRPD CR DGSDEQHCDCLQLGPSSRIVGGAVSSEGEWPWQASLQVRGRHICGG ALIADRWVITAAHCFQEDSMASPALWTVFLGKVVQNSRWPGEVSFKV SRLLLHPYHEEDSHDYDVALLQLDHPVVRSAAVRPVCLPARSHFFEPG LHCWITGWGALREGGPTSNALQKVDVQLIPQDLCSEAYRYQVTPRMLC AGYRKGGKDACQGDAGGPLVCKALSGRWFLAGLVSWGLGCGRPNYF GVYTRITGVIGWIQQVVTEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH
120	PRT	SHFFEPGLHCW
121	PRT	LVSWGLGCGRPNYFGVYTRITGVISW
122	PRT	LITSTRLGT
123	PRT	GEWPWQASL
124	PRT	STVLWTVFLGKVVQNSRWPGEVSFK
125	PRT	ITGWGALREGGPISNALQKVD
126	PRT	MLLLFHSKRMPVAEAPQVAGGQGDGGDGEEAEPEGMFKACEDSKRK ARGYLRLVPLFVLLALLVLASAGVLLWYFLGYKAEVMVSQVYSGSLRVL NRHFSQDLTRRESSAFRSETAKAQKMLKELITSTRLGTYYNSSSVYSFG EGPLTCFFWFILQIPEHRRMLLSPEVVQALLVEELLSTVNSSAAVPYRAE YEVDP EGLVILEASVKDIAALNSTLG CYRYSYVGQGGVLRRLKGPDLHLAS SCLWHLQGPDLMLKLRLEWTLAECDRLAMYDVAGPLEKRLITSVYG

		CSRQEPVVEVLASGAIMAVVWKKGLHSYYDPFVLSVQPVVFQACEVNL TLDNR LDSQGV LSTPYFPSYSPQTHCSWHLTVPSLDYGLALWFDAYA LRRQKYDLPCTQGQWTIQNRRLCGLRILQPYAERIPVVATAGITINFTSQ ISLTGPGVRVHYGLYNQSDPCPGEFLCSVNGLCVPACDGVKDCPNGL DERNCVCRATFQCKEDSTCISLPKVC DGQPDCLNGSDEEQCQEGVPC GTFTFQCEDRSCVKPNPQCDGRPD CRDGSDEEHCD CGLQGPSSRIV GGAVSSEGEWPWQASLQVRGRHICGGALIADRWVITAAHCFQEDSMA STVLWTVFLGKVVQNSRWPGEVSFKVSRLLLHPYHEEDSHDYDVALL QLDHPVVRSAAVRPVCLPARSHFFEPGLHCWITGWGALREGGPISNAL QKVDVQLIPQDLCSEVYRYQVTPRMLCAGYRK GKKDACQGD SGGPLV CKALSGRWFLAGLVSWGLGCGRPNYFGVYTRITGVISWIQQVVT
127	ADN	CTTGAGCCAGACCCAGTCCAGCTCTGGTGCCTGCCCTCTGGTGCGA GCTGACCTGAGATGCACTTCCCTCCTCTGTGAGCTGTCTCGGCACC CACTTGCAGTCACTGCCGCTGATGTTGTTACTCTTCCACTCCAAAA GGATGCCCCGTGGCCGAGGCCCCCAGGTGGCTGGCGGGCAGGGG GACGGAGGTGATGGCGAGGAAGCGGAGCCGGAGGGGATGTTCAA GGCCTGTGAGGACTCCAAGAGAAAAGCCCCGGGGCTACCTCCGCCT GGTGCCCCTGTTTGTGCTGCTGGCCCTGCTCGTGCTGGCTTCGGC GGGGGTGCTACTCTGGTATTTCTAGGGTACAAGGCGGAGGTGATG GTCAGCCAGGTGTACTCAGGCAGTCTGCGTGTACTCAATCGCCACT TCTCCCAGGATCTTACCCGCCGGGAATCTAGTGCCTTCCGCACTGA AACCGCCAAAGCCCAGAAGATGCTCAAGGAGCTCATCACCAGCACC CGCCTGGGAACCTACTACA ACTCCAGCTCCGTCTATTCTTTGGGGA GGGACCCCTCACCTGCTTCTTCTGGTTCATTCTCCAAATCCCCGAGC ACCGCCGGCTGATGCTGAGCCCCGAGGTGGTG CAGGCACTGCTGG TGGAGGAGCTGCTGTCCACAGTCAACAGCTCGGCTGCCGTCCCCTA CAGGGCCGAGTACGAAGTGGACCCCGAGGGCCTAGTGATCCTGGA AGCCAGTGTGAAAGACATAGCTGCATTGAATTCCACGCTGGGTGTT ACCGCTACAGCTACGTGGGCCAGGGCCAGGTCCTCCGGCTGAAGG GGCCTGACCACCTGGCCTCCAGCTGCCTGTGGCACCTGCAGGGCC CCAAGGACCTCATGCTCAA ACTCCGGCTGGAGTGGACGCTGGCAG AGTGCCGGGACCGACTGGCCATGTATGACGTGGCCGGGCCCCTGG AGAAGAGGCTCATCACCTCGGTGTACGGCTGCAGCCGCCAGGAGC CCGTGGTGGAGGTTCTGGCGTCGGGGGCCATCATGGCGGTCTGCT GGAAGAAGGGCCTGCACAGCTACTACGACCCCTTCGTGCTCTCCGT

	GCAGCCGGTGGTCTTCCAGGCCTGTGAAGTGAACCTGACGCTGGA CAACAGGCTCGACTCCCAGGGCGTCTCAGCACCCCGTACTTCCCC AGCTACTACTCGCCCCAAACCCACTGCTCCTGGCACCTCACGGTGC CCTCTCTGGACTACGGCTTGGCCCTCTGGTTTGATGCCTATGCACT GAGGAGGCAGAAGTATGATTTGCCGTGCACCCAGGGCCAGTGGAC GATCCAGA ACAGGAGGCTGTGTGGCTTGCGCATCCTGCAGCCCTACGCCGAGA GGATCCCCGTGGTGGCCACGGCCGGGATCACCATCAACTTCACCTC CCAGATCTCCCTCACCGGGCCCCGGTGTGCGGGTGCCTATGGCTT GTACAACCAGTCGGACCCCTGCCCTGGAGAGTTCCTCTGTTCTGTG AATGGACTCTGTGTCCCTGCCTGTGATGGGGTCAAGGACTGCCCCA ACGGCCTGGATGAGAGAACTGCGTTTGCAGAGCCACATTCCAGTG CAAAGAGGACAGCACATGCATCTCACTGCCCAAGGTCTGTGATGGG CAGCCTGATTGTCTCAACGGCAGCGACGAAGAGCAGTGCCAGGAA GGGGTGCCATGTGGGACATTACCTTCCAGTGTGAGGACCGGAGC TGCCTGAAGAAGCCCAACCCGCACTGTGATGGGCGGCCCGACTGC AGGGACGGCTCGGATGAGGAGCACTGTGACTGTGGCCTCCAGGGC CCCTCCAGCCGCATTGTTGGTGGAGCTGTGTCCTCCGAGGGTGAGT GGCCATGGCAGGCCAGCCTCCAGGTTCCGGGGTCGACACATCTGTG GGGGGGCCCTCATCGCTGACCGCTGGGTGATAACAGCTGCCCACT GCTTCCAGGAGGACAGCATGGCCTCCACGGTGCTGTGGACCGTGT TCCTGGGCAAGGTGTGGCAGAACTCGCGCTGGCCTGGAGAGGTGT CCTTCAAGGTGAGCCGCCTGCTCCTGCACCCGTACCACGAAGAGGA CAGCCATGACTACGACGTGGCGCTGCTGCAGCTCGACCACCCGGT GGTGCCTCGGCCGCGCTGCGCCCCGTCTGCCTGCCCGCGCGCT CCCACTTCTTCGAGCCCGGCCTGCACTGCTGGATTACGGGCTGGG GCGCCTTGCGCGAGGGCGGGCCCCATCAGCAACGCTCTGCAGAAAG TGGATGTGCAGTTGATCCCACAGGACCTGTGCAGCGAGGTCTATCG CTACCAGGTGACGCCACGCATGCTGTGTGCCGGCTACCGCAAGGG CAAGAAGGATGCCTGTCAGGGTGACTCAGGTGGTCCGCTGGTGTG CAAGGCACTCAGTGGCCGCTGGTTCCCTGGCGGGGCTGGTCAGCTG GGGCCTGGGCTGTGGCCGGCCTAACTACTTCGGCGTCTACACCCG CATCACAGGTGTGATCAGCTGGATCCAGCAAGTGGTGACCTGAGGA ACTGCCCCCCTGCAAAGCAGGGCCCACCTCCTGGACTCAGAGAGC CCAGGGCAACTGCCAAGCAGGGGGACAAGTATTCTGGCGGGGGGT
--	---

		GGGGGAGAGAGCAGGCCCTGTGGTGGCAGGAGGTGGCATCTTGTCTCGTCCCTGATGTCTGCTCCAGTGATGGCAGGAGGATGGAGAAGTGCCAGCAGCTGGGGGTCAAGACGTCCCCTGAGGACCCAGGCCCCACACCCAGCCCTTCTGCCTCCCAATTCTCTCTCCTCCGTCCCCTTCCTCCACTGCTGCCTAATGCAAGGCAGTGGCTCAGCAGCAAGAATGCTGGTTCTACATCCCGAGGAGTGTCTGAGGTGCGCCCCACTCTGTACAGAGGCTGTTTGGGCAGCCTTGCCTCCAGAGAGCAGATTCCAGCTTCGGAAGCCCCTGGTCTAACTTGGGATCTGGGAATGGAAGGTGCTCCCATCGGAGGGGACCCTCAGAGCCCTGGAGACTGCCAGGTGGGCCTGTGTGCCACTGTAAGCCAAAAGGTGGGGAAGTCCTGACTCCAGGGTCCTTGCCCCACCCCTGCCTGCCACCTGGGCCCTCACAGCCCAGACCCTCACTGGGAGGTGAGCTCAGCTGCCCTTTGGAATAAAGCTGCCTGATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
128	PRT	MPVAKAPQVAGGQGDGGDGEEAEPEGMFEACEDSKRKARGYLRLAPLWLTLLVLTSGVLLWYFLGYKAEVTVSQVYSGSLRVLNRHFSQDLTRRESSAFRSETAKAQKMLKELIASTRLGTYYNSSSVYSFGEGPLTCFFWFIHQIPEHRRMLSPVVQALLVEELLSTVNSSAAVPYRAEYEVDP EGLVILEASVKDIAALNSTLGCYRYSYVGQGVLRRLKGPDLHLASSCLWHLQGPEDLMLKLRLEWTLAECDRLAMYDVAGPLEKRLITSVYGCSRQEPVVEVLASGAIMAVVWKKGLHSYYDPFMLSQSVVFQACEVNLTDDRDLDSQGVLPSTPYFSPSYSPRTHCSWHLTVPSLDYGLALWFDAYALRRQKYDLPCTQGQWTIQNRRLCGLRILQPYAERIPVVATAGITINFTSQISLTGPGVRVHYGLYNQSDPCPGEFLCSVNGLCVPACDGVKDCPNGLDERNCVCRAFTQCQEDSTCISLLKVC DGQPDCLNGSDEERCQEGVPCGTFTFQCEDQSCVKKPNPQCDGRPDCRDGSDEQHCDGLQGPSSRIVGGAVSSEGEWPWQASLQVRGRHICGGALIADRWVITA AHCFQEDSMASPALWTVFLGK V WQNSRWPGEVSFKVSRLLLHPYHEEDSHDYDVALLQLDHPVVRSAAVRPVCLPARSHFFEPGLHCWITGWGALREGGPTSNALQKVDVQLIPQDLCSEAYRYQVTPRMLCAGYRKGGKDACQGDSSGGLVCKALSGRWFLAGLVSWGLGCRPNYFGVYTRITGVIGWVQVVT
129	ADN	CTCAGTCACAGTGCCGTCCTGGGCCCAGCAGGAGGAGCCCCATGGAGCCTGGGGCCACAGGCCACAGGGGACAAGGGCCAGACACCCTGGCCATGGCTCTAGGCCATTGATCCAGGCCGGGCTGGCACGGTGGGGGTAGGGAGGCCTTGGCCTGGACAAACAAAGGCTTCTGAGGCCTGCGTG CAGGCC CAGCACCTATCCGCCACTCCCAAAGGATGCCTGTG

		GCCAAGGCCCCCAGGTGGCTGGTGGGCAGGGGGACGGAGGTGA TGGCGAGGAAGCGGAGCCAGAGGGGATGTTTCGAGGCCTGTGAGGA CTCCAAGAGAAAAGCCCGGGGCTACCTCCGCCTGGCGCCCCCTGTG GCTGACCCTGGTTGTGCTGACTTCAGTGGGGGTGCTACTCTGGTAT TTCCTAGGGTACAAGGCGGAGGTGACGGTCAGCCAGGTGTACTCA GGCAGCCTTCGCGTGCTCAATCGCCACTTCTCCCAGGATCTTACCC GCCGGGAATCCAGTGCCTTCCGCAGTGAAACCGCCAAAGCCCAGA AGATGCTCAAGGAGCTCATCGCCAGCACCCGCCTGGGAACTTATTA CAACTCCAGCTCCGTCTATTCTTTGGGGAGGGACCGCTCACCTGC TTCTTCTGGTTTATTCTCCAAATCCCCGAGCACCGCCGGCTGATGCT GAGCCCCGAGGTGGTGCAGGCACTGCTGGTGGAGGAGCTGCTGTC CACAGTCAACAGCTCGGCGGCCGTCCCCTACAGGGCCGAGTACGA AGTGGACCCCCGAGGGCCTAGTGATCCTAGAAGCCAGTGTGAAAGAC ATAGCTGCACTGAATTCCACGCTGGGTTGTTACCGCTACAGCTACGT GGGCCAGGGTCAGGTCCTCCGGCTGAAGGGACCCGACCACCTGGC CTCCAGCTGCCTGTGGCACCTGCAGGGCCCCGAAGACCTCATGCT GAAACTCCGGCTGGAGTGGACGCTGGCCGAGTGCCGGGACCGACT GGCCATGTATGACGTGGCTGGGCCCCCTGGAGAAGAGGCTCATCAC CTCGGTGTATGGCTGCAGCCGCCAGGAGCCTGTGGTGGAAAGTCCT GGCATCGGGGGCCATCATGGCGGTGGTCTGGAAGAAGGGCCTGCA CAGCTACTACGACCCCTTTATGCTCTCCGTGCAGTCGGTGGTCTTC CAGGCCTGCGAGGTAAACCTGACGCTGGATGACAGGCTGGACTCC CAGGGCGTCCTCAGCACCCCGTACTTCCCCAGCTACTACTCGCCCC GAACCCACTGCTCCTGGCACCTCACGGTGCCTTCTCTGGACTACGG CTTGGCCCTCTGGTT TGACGCCTACGCACTGCGGAGGCAGAAAGTATGATTTGCCGTGCACC CAGGGCCAGTGGACGATCCAGAACAGGAGGCTGTGTGGCCTGCGC ATCCTGCAGCCTTACGCTGAGAGGATCCCCGTGGTGGCCACGGCC GGCATCACCATCAATTTACCTCCCAGATCTCCCTCACAGGGCCTG GTGTGCGGGTGCACTATGGCTTGTAACCAAGTCGGACCCCTGCC TGGAGAGTTCCTCTGCTCTGTGAACGGACTCTGCGTCCCTGCCTGT GATGGGGTCAAGGACTGCCCCAACGGCCTGGATGAGAGAACTGC GTTTGCAGAGCCACATTCCAGTGCCAAGAGGACAGCACGTGCATCT CACTGCTTAAGGTCTGTGACGGGCAGCCTGACTGTCTCAACGGCAG CGATGAAGAGCGGTGCCAGGAAGGGGTGCCCTGCGGGACATTCAC
--	--	---

		CTTCCAGTGTGAGGACCAGAGCTGCGTGAAGAAGCCCAACCCACAG TGTGATGGGCGGCCCCGACTGCAGGGACGGCTCAGACGAGCAGCAC TGTGACTGTGGCCTCCAGGGCCCCTCCAGTCGCATTGTTGGTGGG GCCGTGTCCTCCGAGGGTGAGTGGCCATGGCAGGCCAGCCTCCAG GTTCCGGGGTCGACACATCTGTGGGGGCGCCCTCATCGCTGACCGC TGGGTGATAACAGCTGCCCATTGCTTCCAGGAGGACAGCATGGCCT CCCCGGCGCTGTGGACGGTGTTCTGGGCAAGGTGTGGCAGAACT CGCGCTGGCCTGGAGAGGTGTCCTTCAAGGTGAGCCGCCTACTCC TGCATCCGTATCACGAAGAGGACAGCCACGACTACGACGTGGCGCT GTTGCAGCTCGACCACCCGGTGGTGCCTCGGCCGCCGTGCGTCC AGTCTGCCTGCCCCGCGCGCTCCCACTTCTTGAACCCGGCCTGCAC TGCTGGATCACTGGCTGGGGCGCCCTGCGCGAAGGCGGCCCCACC AGCAATGCTCTGCAGAAAGTGGACGTGCAGTTGATCCACAGGACC TGTGCAGCGAGGCCTATCGCTACCAGGTGACGCCACGCATGCTGT GTGCCGGCTACCGCAAGGGCAAGAAGGATGCCTGCCAGGGTGACT CGGGTGGTCCGCTGGTATGCAAGGCACTCAGTGGCCGCTGGTTCC TGGCAGGGCTGGTCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGCCGACCTAACT ACTTCGGCGTCTACACCCGCATCACAGGTGTGATCGGCTGGATCCA GCAAGTGGTGACCTGAGGAACTGCCCCCTGCAGAGCAGGTCCCA CCTCTTGGA CT CAGAGAGCCCAGGGCAATTGCCAAGCAGGGGGAC AAGTATTCTGGGGGGAGGGGGGCGCGAGCAGGCCCTGTGGTGGC AGGAGGTGGCATCTTGTCTTGTCCCTGATGTCTGCTCCAGTGATGG CAGGAGGATGGAGGAGTGCCAGCAGCTGGGGGTCAAGACGTCCCC TGGGGACCCAGGCCACACCCAGCCCTTCTGCCTCCCGATTCTCTC TCCTCCGTCCCCTTCCTCCACTGCTGCCTATTGCAAGGAAGTGGCT CAGCAGCAAGAATGCTGGCTCTACGTCCCCAGGAGTGTCTGAGCTG TGCCCCGCTCTGTACAGAGGCTGCTTGGGCAGCCTTGCCTCTAGAG AGCAGATGCCAGCTTCGGAAGCCCCTGGTCTAACTTGGGATCTGGG AATGGAAGGTGCCCCCATAGGAGGGGACCCTCACAGCCCTGGGGA CTGCCAGGTGGGCGGCTGCCACCGTAAGCCAAAAAAGGTGGGGA AGCCCTGACTCCAAGGTCCTTGCCCCACCCCTGCCTGCCACCTGGC CCCTCACAGCCCAGACCCTACCGGCAGGTGAGCTCAGCTGCCCTT TGAATAAAGCTGCCTGATCCAA
130	PRT	MPRCFQLPCSTRMPTTEVPQAADGQGDAGDGEEAAEPEGKFKPPKNT KRKNRDYVRFTPLLLVLAALVSAGVMLWYFLGYKAEVTVSQVYSGSLR

		VLNRHFSQDLGRRESIAFRSESAKAQKMLQELVASTRLGTYYNSSSVY SFGEGLTCFFWFILDIPEYQRLTSLPEVVRELLVDELLSNSSTLASYSKT EYEVDP EGLVILEASVNDIVVLNSTLGCYRYSYVNPQGVLPLKGPDQQT TSCLWHLQGPEDLMIKVRLEWTRVDCRDRVAMYDAAGPLEKRLITSVY GCSRQEPVMEVLASGSVMAVVWKKGMHSYYDPFLLSVKSVAFQDCQ VNLTLEGRLDLTQGFLRTPYYPSYSPSTHCSWHLTVPSLDYGLALWFD AYALRRQKYNRLCTQGQWMIQNRRLCGFRTLQPYAERIPMVASDGVTI NFTSQISLTGPGVQVYYSLYNQSDPCPGEFLCSVNGLCVPACDGIKDC PNGLDERNCVCRAMFQCQEDSTCISLPRVCDRQPDCLNGSDEEQCQE GVPCGTFTFQCEDRSCVKKPNPECDGQSDCRDGSDEQHCDGLQGL SSRIVGGTVSSEGEWPWQASLQIRGRHICGGALIADRWVITAACHCFQE DSMASPKLWTVFLGKMRQNSRWPGEVSFKVSRLFLHPYHEEDSHDYD VALLQLDHPVVYSATVRPVCLPARSHFFEPGQHCWITGWGAQREGGP VSNTLQKVDVQLVPQDLCSEAYRYQVSPRMLCAGYRKGGKDACQGDS GGPLVCREPSGRWFLAGLVSWGLGCGRPNFFGVYTRVTRVINWIIQQV LT
131	ADN	AGTTTCATTGTCGCCCTGGACCTGACAGGAGAGGCCCATGGAACTT GGGGCCACAGGCCACAAGGGACAAGGGCCAGACACCCAGCCATG GCTCCAGGCCATTGATCCAACCTAAGCTGGCCAGTTGGGGGTGGAA AGACCTTGGCCTGGATAAACAGAGGCCTCCAGGCCTGTGTGCAGG CCCGGCACCTACCTTCCACTCTTGAAGATGCCGAGATGTTTCCAGC TCCCCTGTTCTACCAGGATGCCCACCACCGAGGTCCCCCAAGCGGC TGATGGTCAGGGCGATGCGGGTGATGGAGAGGAAGCTGCTGAGCC AGAGGGGAAGTTCAAGCCCCCAAAAAACACCAAGAGAAAAAACCGG GACTACGTCCGCTTCACGCCACTGTTGCTGGTCTTGGCTGCGCTGG TCTCAGCAGGGGTCATGCTTTGGTATTTCTAGGGTACAAAGCGGA AGTGACCGTAAGCCAGGTGTACTCTGGCAGCCTCCGGGTGCTCAAC CGTCATTTCTCCCAGGACCTGGGCCGACGGGAGTCTATTGCTTTCC GCAGTGAATCTGCCAAAGCCCAGAAGATGCTCCAAGAACTGGTTGC CAGCACCCGCCTGGGTACTTACTACAACCTCTAGTTCTGTCTACTCCT TTGGGGAGGGACCCCTCACCTGCTTCTTCTGGTTTATCCTTGACATC CCTGAGTACCAGCGACTGACCCTGAGCCCTGAAGTAGTGCGCGAG CTCCTGGTGGATGAGCTACTGTCCAACAGCTCAACCCTGGCTTCCT ATAAGACCGAATATGAGGTGGACCCGGAAGGCCTGGTGATCCTGGA AGCCAGTGTGAACGACATAGTCGTAAGTGAATTCCACGCTGGGCTGT

	TATCGCTACAGCTATGTGAACCCAGGCCAGGTCCTCCCATTGAAGG GGCCTGACCAGCAGACCACAAGCTGCCTGTGGCATCTGCAAGGGC CCGAAGACCTCATGATCAAAGTGCGGCTGGAGTGGACCCGGGTCTG ATTGCAGAGACAGGGTGGCGATGTACGACGCAGCTGGGCCCTGG AGAAGAGACTTATCACCTCGGTCTATGGGTGCAGCCGCCAGGAACC TGTGATGGAGGTGCTGGCATCGGGCTCCGTATGGCCGTGGTGTG GAAAAAGGGCATGCATAGCTACTATGACCCTTTCCTGCTCTCAGTGA AGTCTGTGGCCTTCCAGGACTGCCAGGTGAACCTGACACTGGAGG GCCGGCTGGACACACAGGGCTTCCCTCCGTACACCCTACTACCCAG TTACTACTCTCCCAGTACCCACTGCTCCTGGCATCTCACGGTACCCT CTCTGGACTACGGCTTGGCGCTCTGGTTCGATGCCTACGCACTGAG GAGGCAGAAGTACAACCGACTGTGTACTCAGGGCCAGTGGATGATC CAGAACAGGAGGCTGTGTGGCTTCCGTACCCTGCAGCCATATGCTG AGAGGATCCCCATGGTGGCCTCAGATGGTGTACCATCAACTTCAC CTCCCAGATCTCCCTCACAGGCCCGGGTGTGCAAGTGTACTACAGC TTGTACAACCAATCAGACCCCTGCCCTGGTGAGTTCCTCTGCTCTGT GAAT GGACTGTGTGTCCCTGCGTGTGACGGGATCAAGGACTGCCCCAATG GCCTGGATGAGAGAACTGTGTCTGCAGAGCCATGTTCCAGTGCCA AGAGGACAGCACGTGCATTTCACTGCCTAGAGTCTGTGACCGGCAG CCCGACTGTCTCAATGGCAGTGACGAAGAACAGTGCCAAGAAGGAG TGCCCTGTGGGACATTCACTTTCCAGTGTGAGGACCGGAGCTGTGT GAAGAAGCCCAACCCAGAGTGTGACGGCCAGTCAGATTGCAGAGA CGGCTCAGATGAGCAAACTGTGACTGTGGCCTCCAGGGCCTCTCC AGCCGTATTGTGGGCGGGACCGTGTCTCCGAGGGTGAGTGGCCA TGGCAGGCCAGCCTCCAGATTCGGGGTCGACACATCTGTGGGGGG GCTCTCATCGCTGACCGCTGGGTCATAACGGCCGCCCACTGCTTCC AGGAGGACAGCATGGCCTCCCCGAAGCTGTGGACCGTGTTCCTGG GAAAGATGCGGCAGAACTCGCGCTGGCCAGGCGAGGTGTCCTTCA AGGTGAGCCGTCTGTTCTGCACCCGTACCACGAGGAGGACAGCC ATGACTACGACGTGGCCCTGCTGCAGCTCGACCACCCCGTGGTGTA CTCGGCCACTGTGCGCCCCGTCTGCCTGCCTGCCCGCTCCCACTTC TTTGAGCCAGGCCAGCACTGCTGGATCACAGGCTGGGGAGCCCAG CGAGAGGGTGGTCCGGTGAGCAACACCCTGCAGAAGGTGGACGTA CAGCTGGTCCCTCAGGACCTCTGCAGTGAGGCCTACCGCTACCAG
--	--

		GTGTCCCCACGCATGCTCTGTGCTGGCTACCGCAAGGGCAAGAAAG ATGCCTGCCAGGGTGACTCTGGAGGCCCACTGGTTTGCAGGGAGC CCAGTGGCCGCTGGTTCCTGGCAGGGTTGGTTAGCTGGGGCCTGG GCTGTGGCCGACCCAATTTCTTTGGCGTCTACACCCGTGTCACACG TGTGATCAACTGGATCCAGCAGGTGCTGACCTGAGGGCTGTTCTAC AGAGCTGGACCTGCCTCCAGGCCAAGTTCAGGGTGTCCACCCAGC CAGGACACAAGTATTCTGGGGCAAGTGACCCTGCTAAGGCCTGTTT CCCTCAGGCCTACCCCAGTGACAGTACAGAGAAGGATGTCAGCTGG TGGTTAGGATGCCTCCTGAGGTCCAGGGGCCAGCCTCGGCTAGGT TTCATTCTAACCCTTTCTTATTCTAGTCCTTTCCCCTCCCTGCTCCT ACCACTGTTTTGGAGTGGGGTCTGGCGGCCATGACCTTGGCCTCCG GGTCTCTGTAGGAAAGAAAGAATCCTTCCCCTTGCAAAAGCCTCTTG GGGGAAGTGCACAGAGAAAGAAGGTGCCTCTATCAAGGCTCTATCA GAGCCCTTGAGTCTGCCAAGTGGGCTGTACTCTAAGCCAAATCACC GGGCAGCCTCAGCTGCAGATGCCTGCTGAAGCTCTGCCTGCTACAG GGGCCTCCCTGCCATTCACTGGAGGCCCACTGTCTGTTCTGGGAAT AAAGCACTTGACCAAGCCCTGACACTGAAAAAAAAAAAAAAAAA
--	--	--