



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 924**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05734321 .2**

(96) Fecha de presentación : **08.04.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1732950**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

(54) Título: **Anticuerpos para el receptor de eritropoyetina y usos de los mismos.**

(30) Prioridad: **09.04.2004 US 821497**
12.04.2004 US 822306

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2011

(73) Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/Ap6A-1 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

(72) Inventor/es: **Reilly, Edward, B.;**
Lacy, Susan, E.;
Fung, Emma;
Belk, Jonathan, P. y
Roguska, Michael

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 365 924 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para el receptor de eritropoyetina y usos de los mismos

5 Descripción

Antecedentes de la invención

10 La eritropoyetina ("Epo") es una glicoproteína que es el principal regulador de la eritropoyesis. Específicamente, Epo es responsable de promover el crecimiento, diferenciación y supervivencia de progenitores eritroides, lo que da lugar a glóbulos rojos maduros. En respuesta a cambios en el nivel de oxígeno en la sangre y tejidos, la eritropoyetina parece estimular tanto la proliferación como la diferenciación de eritroblastos inmaduros. También actúa como un factor de crecimiento, estimulando la actividad mitótica de células progenitoras eritroides, tales como unidades formadoras de colonias y formadoras de estallido eritroide. También actúa como un factor de diferenciación, desencadenando la transformación de una unidad formadora de colonias de eritrocitos en un proeritoblasto (Véase Erslev, A., New Eng. J. Med., 316: 101-103 (1987)).

Epo tiene un peso molecular de aproximadamente 34.000 Daltons y puede aparecer en tres formas - alfa, beta y asialo. Durante la fase media y la fase tardía de la gestación, la Epo se sintetiza en el hígado fetal. Posteriormente, la Epo se sintetiza en el riñón, circula en el plasma y se excreta en la orina.

Se ha aislado y purificado Epo urinaria humana (véase, Miyake *et al.*, J. Biol. Chem., 252: 5558 (1977)). Además, se conocen en la técnica métodos para identificar, clonar y expresar genes que codifican Epo (véase la Patente de Estados Unidos 4.703.008) así como que purifican Epo recombinante a partir de un medio celular (véase la Patente de Estados Unidos 4.667.016).

La actividad de Epo está mediada por la unión y activación de un receptor de la superficie celular denominado receptor de eritropoyetina (EpoR). El receptor de Epo pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas y se cree que contiene al menos dos polipéptidos distintos, una especie de 55-72 kDa y una especie de 85-100 kDa (véase la Patente de Estados Unidos 6.319.499, Mayeux *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 23380 (1991), McCaffery *et al.*, J. Biol. 6.319.499, Mayeux *et al.*, J. Biol. Chem., 266:23380 (1991), McCaffery *et al.*, J. Biol. Chem., 264: 10507 (1991)). Otros estudios han revelado otros complejos polipeptídicos de receptor de Epo que tienen pesos moleculares tales como 110, 130 y 145 kDa (véase la Patente de Estados Unidos 6.319.499).

Se han clonado y expresado los receptores de Epo tanto murinos como humanos (véase D'Andrea *et al.*, Cell, 57: 277 (1989); Jones *et al.*, Blood, 76: 31 (1990); Winkelmann *et al.*, Blood, 76: 24 (1990); documento WO 90/08822/Patente de Estados Unidos 5.278.065). El receptor de Epo humano de longitud completa es una proteína transmembrana de 483 aminoácidos con un péptido señal de aproximadamente 25 aminoácidos (véase la Patente de Estados Unidos 6.319.499). El receptor humano demuestra aproximadamente un 82% de homología de secuencia de aminoácidos con el receptor murino. Misma referencia.

En ausencia de ligando, el receptor de Epo existe en un dímero preformado. La unión de Epo a su receptor provoca un cambio conformacional de modo que los dominios citoplasmáticos se colocan en proximidad cercana. Aunque no se entiende completamente, se cree que esta "dimerización" desempeña un papel en la activación del receptor. La activación del receptor de Epo da como resultado varios efectos biológicos. Algunas de estas actividades incluyen la estimulación de la proliferación, la estimulación de la diferenciación y la inhibición de la apoptosis (véase la Patente de Estados Unidos 6.319.499, Liboi *et al.*, PNAS USA, 90: 11351 (1993), Koury, Science: 248: 378 (1990)).

Es la relación entre la dimerización del receptor de Epo y la activación la que puede usarse para identificar compuestos (es decir, tales como anticuerpos) distintos de Epo que sean capaces de: (1) dimerizar el receptor de Epo; y (2) activar al receptor. Estos compuestos serían útiles en el tratamiento de mamíferos que padecen anemia y en la identificación de mamíferos que tienen un receptor de Epo disfuncional.

En el documento WO 96/40231 se describe un método para generar anticuerpos que son agonistas de receptores. Por ejemplo, se describe un anticuerpo agonista de Epo que puede usarse en el tratamiento de anemia.

El documento WO 99/55369 describe anticuerpos que tienen inmunogenicidad reducida en seres humanos y métodos para su preparación que comprenden injertos de CDR de anticuerpos donadores de una especie no humana. Por ejemplo, se describe la preparación de un anticuerpo anti-receptor de Epo por injerto de CDR de un anticuerpo donador murino en un anticuerpo aceptor de primate no humano.

En el documento WO 97/048729 se describe un anticuerpo que activa los receptores de Epo y es útil para tratar trastornos relacionados con la activación del receptor de Epo. Por ejemplo, se describe que el anticuerpo MAb34 es capaz de unirse al receptor de Epo y muestra una K_{off} de $1,7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

El documento WO 04/035603 se refiere a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen y activan un receptor

de Epo, tal como el anticuerpo Ab 198 que tiene una K_d de 13,9 nM.

Sumario de la invención

La invención proporciona un anticuerpo aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se disocia del receptor de eritropoyetina humano (EpoR) con una constante de velocidad K_{off} mayor de aproximadamente $1,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y que activa una actividad endógena de dicho EpoR en un mamífero, comprendiendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

Q-V-Q-L-Q-E-S-G-P-G-L-V-K-P-S-E
T-L-S-L-T-C-T-V-S-G-A-S-I-S-S-Y
Y-W-S-W-I-R-Q-P-P-G-K-G-L-E-W-I
G-Y-I-X₁-X₂-X₃-G-S-T-N-Y-N-P-S-L-K
S-R-V-T-I-S-V-D-T-S-K-N-Q-F-S-L
K-L-R-S-V-T-A-A-D-T-A-V-Y-Y-C-A
R-E-R-L-G-I-G-D-Y-W-G-Q-G-T-L-V
T-V-S-S (SEC ID N°: 15)

en la que X_1 se selecciona independientemente del grupo consistente en tirosina (Y), glicina (G) y alanina (A); X_2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G), alanina (A), glutamina (E) y ácido aspártico (D); y X_3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en serina (S), glicina (G), glutamina (E) y treonina (T) con la condición de que X_1 - X_2 - X_3 sea distinto de Y-Y-S, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17. Los anticuerpos de la invención se caracterizan por la unión a EpoR con baja afinidad y la disociación de receptor de eritropoyetina humana (EpoR) con una velocidad de disociación rápida. Los anticuerpos o parte de unión a antígeno de los mismos pueden ser de longitud completa (por ejemplo, una IgG2) o pueden comprender solamente una parte de unión a antígeno (por ejemplo, un $F(ab')_2$). En una realización preferida, los anticuerpos de la invención se unen a EpoR con una K_d de aproximadamente 7 nM o mayor. En una realización más preferida, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une a EpoR con una K_d de aproximadamente 8,5 nM o mayor. En una realización aún más preferida, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une a EpoR con una K_d de aproximadamente 20 nM y, más preferiblemente, con una K_d de aproximadamente 32 nM.

En una realización más preferida, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se disocia de EpoR con una de constante de velocidad K_{off} seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente $1,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, aproximadamente $1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y aproximadamente $4,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ según se determina por resonancia de plasmón superficial.

El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser un anticuerpo monoclonal. En una realización preferida, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es un isotipo IgG2. En una realización adicional, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano.

En otra realización, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo tiene una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14.

Otro aspecto de la invención se refiere al anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción para activar una actividad endógena de un receptor de eritropoyetina humano para tratar anemia, hipoxemia, hipoxia tisular crónica, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca isquémica, insuficiencia renal, daño de células neurales o daño de tejido neural, o para promover la curación de heridas en un mamífero, mediante la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción para tratar a un mamífero que padece aplasia, mediante la administración al mamífero que necesita tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción para tratar a un mamífero que padece anemia, mediante la administración al mamífero que necesita tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a una secuencia polinucleotídica purificada o aislada que codifica un

polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Q-V-Q-L-Q-E-S-G-P-G-L-V-K-P-S-E
T-L-S-L-T-C-T-V-S-G-A-S-I-S-S-Y
Y-W-S-W-I-R-Q-P-P-G-K-G-L-E-W-I
G-Y-I-X₁-X₂-X₃-G-S-T-N-Y-N-P-S-L-K
S-R-V-T-I-S-V-D-T-S-K-N-Q-F-S-L
K-L-R-S-V-T-A-A-D-T-A-V-Y-Y-C-A
R-E-R-L-G-I-G-D-Y-W-G-Q-G-T-L-V
T-V-S-S (SEC ID N°: 15)

en la que X₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G) y alanina (A); X₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G), alanina (A), glutamina (E) y ácido aspártico (D); y X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en serina (S), glicina (G), glutamina (E) y treonina (T) a condición de que X₁-X₂-X₃ sea distinto de Y-Y-S. En otras realizaciones preferidas, el polinucleótido codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14.

En otro aspecto, la invención se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden los polinucleótidos expuestos en este documento. La invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende los vectores de expresión recombinantes. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula eucariota, célula de mamífero, célula de levadura o célula bacteriana. Más preferiblemente, la célula hospedadora es una célula CHO, célula COS o célula HEK-293.

En otro aspecto, la invención se refiere a secuencias polipeptídicas codificadas por dichas secuencias polinucleotídicas expuestas en este documento.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa un dibujo esquemático de una construcción de scFv, incluyendo enlazadores de scFv y de unión.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la unión en equilibrio de EpoR soluble con diversas construcciones de scFv de Ab12 expresadas en la superficie de células de levadura. En la FIG. 2, -■- representa una construcción de scFv de Ab12 que comprende un enlazador Gly/Ser (WT), GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID N°: 1) en las posiciones tanto de enlazador de scFv como de unión, -●- representa una construcción de scFv de Ab12 que comprende el enlazador 41, GENKVEYAPALMALS (SEC ID N°: 2) en la posición de unión y el enlazador Gly/Ser (WT) (SEC ID N°: 1) en la posición del enlazador de scFv, -▲- representa una construcción de scFv de Ab12 que comprende el enlazador 41, (SEC ID N°: 2) en la posición de unión y el enlazador 40, GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID N°: 3) en la posición del enlazador de scFv, y -▼- representa una construcción de scFv de Ab12 que comprende el enlazador 41 (SEC ID N°: 2) en la posición de unión y el enlazador 34, GHEAAVMQVQYPAS (SEC ID N°: 4) en la posición del enlazador de scFv.

La FIG. 3 representa un análisis de velocidad de disociación de 41/40 scFv de Ab12.

La FIG. 4 muestra una representación esquemática del método de construcción para generar bibliotecas mutagénicas de CDR en levadura.

La FIG. 5 muestra una representación esquemática de bibliotecas mutagénicas de CDR de cadena pesada de scFv de Ab12. Los nombres de la biblioteca se indican a la izquierda de cada secuencia de 3 aminoácidos sometida a selección aleatoria. Las secuencias de CDR de Ab12 se muestran bajo cada CDR.

La FIG. 6 muestra una representación esquemática de bibliotecas mutagénicas de CDR de cadena ligera de scFv de Ab12. Los nombres de la biblioteca se indican a la izquierda de cada secuencia de 3 aminoácidos sometida a selección aleatoria. Las secuencias de CDR de Ab12 se muestran bajo cada CDR.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de la línea germinal a partir de la cual se obtuvieron Ab12.6 y anticuerpos relacionados con Ab12.6 (SEC ID N°: 5), Ab12 (SEC ID N°: 6), Ab12.6 (SEC ID N°: 7), Ab12.56 (SEC ID N°: 8), Ab12.118 (SEC ID N°: 9), Ab12.119 (SEC ID N°: 10), Ab12.120 (SEC ID N°: 11), Ab12.121 (SEC ID N°: 12), Ab12.122 (SEC ID N°: 13), Ab12.123 (SEC ID N°: 14) y una secuencia consenso (SEC ID N°: 15).

La FIG. 8 es un gráfico que muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de la línea germinal (SEC ID N°: 16) a partir de la cual se obtuvieron Ab12.6 y anticuerpos relacionados con Ab12.6, Ab12 (SEC ID N°: 17), Ab12.6 (SEC ID N°: 17) y Ab12.56 (SEC ID N°: 17), Ab12.118 (SEC ID N°: 17), Ab12.119 (SEC ID N°: 17), Ab12.120 (SEC ID N°: 17), Ab12.121 (SEC ID N°: 17), Ab 12.122 (SEC ID N°: 17),

Ab12.123 (SEC ID N°: 17).

La FIG. 9(a)-(i) muestra las secuencias de ácido nucleico de las regiones variables de cadena pesada de Ab12, Ab12.6 y anticuerpos relacionados con Ab12.6. Los códigos de una letra que representan los aminoácidos codificados por las secuencias de ácido nucleico se muestran en la parte superior.

La FIG. 10 muestra las secuencias de ácido nucleico de la región variable de cadena ligera de Ab12, Ab12.6 y anticuerpos relacionados con Ab12.6. Los códigos de una letra que representan los aminoácidos codificados por las secuencias de ácido nucleico se muestran en la parte superior.

La FIG. 11 muestra una gráfica de los valores de CE_{50} y $Emax$ de Ab12.6 y anticuerpos relacionados con Ab12.6. Los valores de CE_{50} representan la concentración de anticuerpo o Epo a la que se consigue el 50% de la proliferación celular máxima (50% de la pendiente de una curva sigmoidea). Los valores de $Emax$ representan el máximo número de células que produce esta CE_{50} (según se mide por absorbancia).

La FIG. 12 es una gráfica que muestra la formación de CFU-E (unidades formadoras de colonias eritroides) de médula ósea humana en respuesta a tratamiento con Epogen, Ab12, Aranesp™, Ab12.6 y control de isotipo.

La FIG. 13 es una gráfica que muestra la formación de CFU-E (unidades formadoras de colonias eritroides) de células derivadas de médula ósea de ratón transgénico mEpoR^{-/-}, hEpoR⁺ en respuesta al tratamiento con Epogen, Ab12, Aranesp™, Ab12.6 y control de isotipo.

La FIG. 14 es una gráfica que muestra el cambio en hematocrito en ratones transgénicos mEpoR^{-/-}, hEpoR⁺ durante 28 días después de la administración de una sola dosis de Ab12.6 el día 0 frente a dos dosis de Aranesp™ administradas el día 0 y el día 14. En la FIG. 14, -♦- representa ausencia de tratamiento, -■- representa control de isotipo, -▲- representa Aranesp™ (3 µg/kg, 2x), -x- representa Ab12 (0,8 mg/kg) y -I- representa Ab12.6 (0,8 mg/kg).

La FIG. 15 es una exploración generada por ordenador de una transferencia de Western que muestra que Ab12.6 interacciona con el dominio extracelular de EpoR recombinante sólo en condiciones nativas y no desnaturalizantes, lo que indica que Ab 12.6 reconoce un epítipo dependiente de la conformación.

La FIG. 16 es una gráfica que muestra que el fragmento Fab monomérico derivado de Ab12.6 activa EpoR y estimula la proliferación de la línea celular eritroleucémica F36e humana.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a anticuerpos humanos aislados o partes de unión a antígeno de los mismos, que se unen a eritropoyetina humana con baja afinidad, una velocidad de disociación rápida y activación o actividad agonista para el EpoR. Diversos aspectos de la invención se refieren a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo y composiciones farmacéuticas de los mismos, así como a ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras para preparar tales anticuerpos y fragmentos. También se incluye por la invención el uso del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción para activar una actividad endógena de un receptor de eritropoyetina humano para tratar anemia, hipoxemia, hipoxia tisular crónica, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca isquémica, insuficiencia renal, daño de células neuronales o daño tisular, para promover la curación de heridas en un mamífero, para tratar aplasia o para tratar anemia. A no ser que se defina de otro modo en este documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden habitualmente por los expertos en la materia. Además, a no ser que se requiera de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán plurales y los términos plurales incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a no ser que se indique otra cosa. Además, el uso del término "incluir" así como otras formas tales como "incluye" e "incluido" no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" incluyen tanto elementos y componentes que comprenden una unidad como elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a no ser que se indique específicamente otra cosa.

Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y de ácidos nucleicos e hibridación descritas en este documento son las bien conocidas y usadas habitualmente en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención generalmente se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique otra cosa. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como habitualmente sucede en la técnica o como se describe en este documento. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, la química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en este documento son las que son bien conocidas y se usan habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos.

Se entiende que el término "anticuerpo" (abreviado en este documento como Ab), como se usa en este documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada (abreviada en este documento como CH). La región constante de cadena pesada está constituida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está constituida por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR respectivamente, dispuestas desde el extremo amino terminal al carboxi terminal en el siguiente orden. FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (a veces denominado "I").

Además, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un Ab (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, EpoR humano). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un Ab puede realizarse por fragmentos de un Ab de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un Ab incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd consistente en los dominios VH y CH1, (iv) un fragmento Fv consistente en los dominios VL y VH de un brazo sencillo de un Ab, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio de VH; y (vi) una CDR aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifiquen por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permita construirse como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH están emparejadas para formar moléculas monovalentes (conocida como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* Se pretende que tales Ab de cadena sencilla se incluyan dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un Ab. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R.J. *et al.* (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

Además, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para componer una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para componer moléculas de scFv biotiniladas y bivalentes (Kipriyanov, S.M., *et al.*, (1994) *Molecular Immunology* 31: 1047-1058). Pueden prepararse partes de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂ a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de Ab completos. Además, pueden obtenerse Ab, partes de Ab y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describe en este documento.

Se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, en la CDR2. Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, incluya anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias flanqueante humanas.

Se pretende que la expresión "anticuerpo recombinante", como se usa en este documento, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora (descrita

adicionalmente en la Sección II, posteriormente), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante (Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E. (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) Bio Techniques 29: 128-145, Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology today 21: 371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L.d., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597; Little M. *et al* (2000) Immunology Today 21: 364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina en otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos recombinantes tienen regiones variables y/o constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y de este modo las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo *in vivo*.

Se pretende que un “anticuerpo aislado”, como se usa en este documento, se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente sin otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a EpoR está sustancialmente sin anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de EpoR). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a EpoR, puede, sin embargo sin embargo, tener la reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de EpoR de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente sin otro material celular y/o compuestos químicos.

Se pretende que un “anticuerpo activador o agonista” o “anticuerpo que activa” o anticuerpo que tiene “capacidad activadora o agonista” se refiera a un anticuerpo cuya unión a EpoR da como resultado estimulación o activación de la actividad biológica de EpoR. Esta actividad biológica puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de EpoR incluyendo, pero sin limitación, la proliferación inducida por anticuerpos de una línea celular de respuesta a Epo, y cambios inducidos por anticuerpos en el recuento de reticulocitos, el porcentaje de hematocrito y/o la unión del anticuerpo a receptores de Epo. Estos indicadores de actividad biológica de EpoR pueden evaluarse por uno o más de varios ensayos *in vitro* o *in vivo* convencionales bien conocidos para los expertos en la materia.

La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de una especie y secuencias de región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena ligera y pesada murinas ligadas a regiones constantes humanas.

La expresión “anticuerpo injertado con CDR” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie pero en los que las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se reemplazan con secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en las que se han reemplazado una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) con secuencias CDR humanas.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en los que al menos una parte de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más “de tipo humano”, es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que se han introducido secuencias de CDR humanas en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes. Los medios para fabricar anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados se conocen por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567 y 5.225.539). Un método para fabricar anticuerpos humanos emplea el uso de animales transgénicos, tales como un ratón transgénico. Estos animales transgénicos contienen una parte sustancial del genoma productor de anticuerpos humanos insertado en su propio genoma y la producción de anticuerpos endógenos del propio animal se vuelve deficiente en la producción de anticuerpos. Se conocen en la técnica métodos para obtener tales animales transgénicos. Tales animales transgénicos pueden obtenerse usando la tecnología XenoMouse™ o usando un enfoque de “minilocus”. Se describen métodos para obtener Xenomice™ en las Patentes de Estados Unidos N° 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598 y 6.075.181. Se describen métodos para obtener animales transgénicos usando el enfoque “minilocus” en las patentes de Estados Unidos 5.545.807, 5.545.806 y 5.626.825. Véase también la Publicación Internacional N° WO93/12227.

La expresión “resonancia de plasmón superficial”, como se usa en este documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas a tiempo real mediante detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, Nueva Jersey). Para descripciones adicionales, véase el Ejemplo 8 y Jonsson, U., *et al.*, (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U. *et al.* (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnson, B. *et al.* (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; y Johnson, B., *et al.* (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

Se pretende que la expresión “K_{off}”, como se usa en este documento, se refiera a la constante de velocidad de

disociación para la disociación de un anticuerpo de un complejo anticuerpo/antígeno.

Se pretende que la expresión " K_{on} ", como se usa en este documento, se refiera a la constante de asociación de un anticuerpo a un antígeno.

5 Se pretende que la expresión " K_d ", como se usa en este documento, se refiera a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El valor de K_d puede obtenerse por la siguiente ecuación: $K_d(M) = K_{off}(1/s)/K_{on}(1/M \cdot s)$.

10 El término "polipéptido", como se usa en este documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" incluye proteínas, fragmentos proteicos y análogos de polipéptidos nativos o artificiales de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

15 La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociada con componentes asociados de forma natural que la acompañan en su estado nativo; carece sustancialmente de otras proteínas de la misma especie; se expresa por una célula de una especie diferente; o no aparece en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que procede de forma natural estará "aislado" de sus componentes asociados de forma natural. También puede hacerse que una proteína esté sustancialmente sin componentes asociados de forma natural por aislamiento, usando técnicas de purificación proteica bien conocidas en la materia.

20 El término "recuperación", como se usa en este documento, se refiere al proceso de hacer que una especie química tal como un polipéptido esté sustancialmente sin componentes asociados de forma natural para aislamiento, por ejemplo, usando técnicas de purificación proteica bien conocidas en la materia.

25 La expresión "actividad endógena de EpoR", como se usa en este documento, se refiere a todas y cada una de las propiedades biológicas inherentes del receptor de eritropoyetina que se producen como consecuencia de la unión de un ligando natural. Las propiedades biológicas de EpoR incluyen, pero sin limitación, supervivencia, diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas, un aumento en la producción de glóbulos rojos y aumento del hematocrito *in vivo*.

30 Las expresiones "unión específica" o "que se une específicamente", como se usan en este documento, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significa que la interacción es dependiente de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contenga el epítipo A (o A no marcado libre) en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

35 El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. En ciertas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando preferentemente reconoce su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

40 El término "polinucleótido", como se usa en este documento, significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono- y bicatenarias de ADN, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

45 La expresión "polinucleótido aislado", como se usa en este documento, significará un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, de ADNc o sintético, o alguna combinación de los mismos) de tal forma que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado": no está asociado con toda o una parte de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está unido operativamente a un polinucleótido al que no está ligado en la naturaleza; o no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

50 Se pretende que el término "vector", como se usa en este documento, se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y por lo tanto se replican junto con el genoma hospedador. Además,

ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente. Tales vectores se denominan en este documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmidos” y “vector” pueden usarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma de vector usada de forma más habitual. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos en la replicación), que cumplen funciones equivalentes.

Se pretende que la expresión “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”), como se usa en este documento, se refiera a una célula en la que se ha introducido un vector (por ejemplo, plásmido o vector de expresión recombinante). Debe entenderse que se pretende que tales términos se refieran no sólo a la célula particular, sino también a la descendencia de generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales. Dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero estar aún incluida dentro del alcance de la expresión “célula hospedadora” como se usa en este documento.

El término “ligando” se refiere a cualquier resto químico capaz de unirse a un polipéptido. Preferiblemente, un ligando es un antígeno. Los antígenos pueden poseer uno o más epítomos. Los ligandos para una primera secuencia polipeptídica y segunda secuencia polipeptídica pueden ser iguales o diferentes.

Un “secuencia enlazadora” es una secuencia polipeptídica que conecta dos o más secuencias polipeptídicas. El término “conecta” se refiere a la unión de secuencias polipeptídicas. Las secuencias polipeptídicas se unen preferiblemente por enlace peptídico.

I. Anticuerpos que se unen a EpoR Humano

La invención proporciona un anticuerpo aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se disocia del receptor de eritropoyetina humana (EpoR) con una constante de velocidad K_{off} de más de aproximadamente $1,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y que activa una actividad endógena de dicho EpoR humano en un mamífero, comprendiendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

**Q-V-Q-L-Q-E-S-G-P-G-L-V-K-P-S-E
T-L-S-L-T-C-T-V-S-G-A-S-I-S-S-Y
Y-W-S-W-I-R-Q-P-P-G-K-G-L-E-W-I
G-Y-I-X₁-X₂-X₃-G-S-T-N-Y-N-P-S-L-K
S-R-V-T-I-S-V-D-T-S-K-N-Q-F-S-L
K-L-R-S-V-T-A-A-D-T-A-V-Y-Y-C-A
R-E-R-L-G-I-G-D-Y-W-G-Q-G-T-L-V
T-V-S-S (SEC ID N°: 15)**

en la que X₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G) y alanina (A); X₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G), alanina (A), glutamina (E) y ácido aspártico (D); y X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en serina (S), glicina (G), glutamina (E) y treonina (T) con la condición de que X₁-X₂-X₃ sea distinto de Y-Y-S, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17. El anticuerpo de activación recombinante más preferido de la invención se denomina en este documento Ab12.6. Las propiedades de unión de Ab12.6 y anticuerpos relacionados con Ab12.6, todos los cuales son “anticuerpos activadores de EpoR”, se resumen en el Ejemplo 8 posterior.

El anticuerpo anti-EpoR, y los anticuerpos relacionados, también muestran una fuerte capacidad para activar la actividad biológica de EpoR, según se evalúa por varios ensayos *in vitro* e *in vivo* (véanse los Ejemplos 9-13). Por ejemplo, estos anticuerpos activan EpoR en células UT-7/Epo con valores de CE₅₀ en el intervalo de aproximadamente 0,34 nM a 1,345 nM. Ab 12.6 activa EpoR en células UT-7/Epo con una CE₅₀ de 0,85 nM. Además la capacidad de activación de los anticuerpos de la invención se mantienen cuando el anticuerpo se expresa como un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv. Además, tales anticuerpos inducen un aumento del porcentaje de hematocrito en mamíferos que expresan EpoR humano.

Con respecto a la especificidad de unión de Ab12.6 y variantes del mismo, este anticuerpo se une a EpoR humano en diversas formas, incluyendo EpoR soluble y EpoR transmembrana. Ni Ab12.6 ni sus variantes se unen específicamente a otros receptores de citocinas.

Se entiende en la técnica que puede existir algo de variabilidad (por ejemplo, hasta $\pm 20\%$) en el cálculo de los valores de CE₅₀, K_{off} y K_{on} basada en la variación de los instrumentos y el diseño experimental. Típicamente, tales mediciones se realizan usando muestras duplicadas o triplicadas para minimizar la variabilidad. Además, dicho anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, se une de una manera suficiente para activar EpoR humano como se ha demostrado por un ensayo de proliferación *in vitro* convencional.

Más preferiblemente, el anticuerpo aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, se disocia de EpoR humano con una velocidad de disociación (K_{off}) de aproximadamente $1,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, más preferiblemente, con una K_{off} de aproximadamente $1,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, más preferiblemente, con una K_{off} de aproximadamente $1,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, más preferiblemente, con una K_{off} de aproximadamente $1,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, más preferiblemente, con una K_{off} de aproximadamente $1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor, e incluso más preferiblemente, con una K_{off} de aproximadamente $1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo humano aislado o parte de unión a antígeno del mismo se disocia del EpoR humano con una K_{off} de aproximadamente $4,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o mayor. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo humano aislado o parte de unión a antígeno del mismo, se disocia de EpoR a una velocidad de disociación de al menos $1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o al menos $4,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

En otra realización, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se asocia con EpoR humano con una constante de velocidad K_d igual o mayor a aproximadamente 7 nM y, más preferiblemente, con una constante de velocidad K_d entre aproximadamente 7-32 nM, inclusive. Más preferiblemente, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se asocia con EpoR humano con una constante de velocidad K_d al menos igual a 7 nM y de hasta 32 nM, inclusive. La K_d puede calcularse a partir de las constantes de velocidad K_{off} y K_{on} , determinándose dichas constantes por resonancia de plasmón superficial u otras metodologías bien conocidas para los expertos habituales en la materia. En una realización más preferida, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se disocia de EpoR con una K_{off} de aproximadamente $1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y una K_d de aproximadamente 20 nM. En una realización preferida, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se disocia de EpoR humano con una K_{off} de aproximadamente $4,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y una K_d de aproximadamente 32 nM. En la mayoría de las realizaciones preferidas, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se disocia de EpoR humano con una K_{off} de al menos $1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y una K_d de al menos 20 nM. En una realización preferida, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se disocia de EpoR humano con una K_{off} de al menos $4,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y una K_d de al menos 32 nM.

Más preferiblemente, el anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo, activa EpoR humano en un ensayo de proliferación *in vitro* convencional usando una línea celular eritroleucémica humana, tal como por ejemplo F36E o UT-7/Epo. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo.

El análisis de resonancia de plasmón superficial para determinar K_d y K_{off} se conoce bien por los expertos habituales en la materia y puede realizarse como se describe en este documento (véase el Ejemplo 8). En el Ejemplo 9 se describe un ensayo *in vitro* convencional para determinar la proliferación celular. Los ejemplos de anticuerpos humanos recombinantes que cumplen, o se predice que cumplen, los criterios de activación y cinéticos anteriormente mencionados incluyen anticuerpos que tienen los siguientes pares [VH/VL], cuyas secuencias se muestran en las FIGS. 7 y 8: SEC ID N°: 15/ SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 7/ SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 8/ SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 9/ SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 10/ SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 11/ SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 12/ SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 13/ SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 14/ SEC ID N°: 17.

En una realización preferida, Ab12.6 y los anticuerpos relacionados con Ab12.6 comprenden las secuencias CDR2 de cadena pesada mostradas en la Figura 7. En una realización más preferida, Ab12.6 y los anticuerpos relacionados con Ab12.6 comprenden las secuencias VE: mostradas en la Figura 9. En una realización aún más preferida, Ab12.6 y los anticuerpos relacionados con Ab12.6 comprenden adicionalmente las secuencias VL mostradas en la Figura 10.

II. Expresión de Anticuerpos

Un anticuerpo o parte de anticuerpo, de la invención puede prepararse por expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula hospedadora. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, se transfecta una célula hospedadora con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que se expresan las cadenas ligera y pesada en la célula hospedadora y, preferiblemente, se secretan en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras, pudiendo recuperarse los anticuerpos a partir de dicho medio. Se usan metodologías de ADN recombinante convencionales para obtener genes de cadena ligera y pesada de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células hospedadoras, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbour, New York, (1989), Ansubel, F.M. *et al.* (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing associates (1989) y en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.397 de Boss *et al.*

Para expresar un anticuerpo anti-EpoR de la invención, se obtienen primero fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada. Estos ADN pueden obtenerse por amplificación y modificación de secuencias variables de cadena ligera y pesada de línea germinal usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y como se describe en este documento. Para expresar Ab12.6 o un anticuerpo relacionado con Ab12.6, primero se obtienen fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada. Estos ADN pueden obtenerse por amplificación y modificación de las secuencias variables de cadena ligera y pesada de línea

germinal usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conocen en la técnica secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena pesada y ligera humanos (véase, por ejemplo, la base de datos de secuencias de línea germinal humana "Vbase"; véase también Kabat, B.A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242; Tomlinson, L.M., *et al.*, (1992) The Reportoire of Human Germiline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of V body portion of the invention can be functionally linked (by Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227: 776-798; y Cox, J.P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V78 Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24: 827-836).

Para obtener un fragmento de ADN que codifica la región variable de cadena pesada de Ab12.6 o un anticuerpo relacionado con Ab12.6, la secuencia de línea germinal humana VH4-59 se amplifica por PCR convencional. Además, la secuencia de línea germinal A30 de la familia V κ 1 se amplifica por PCR convencional. Pueden diseñarse cebadores de PCR adecuados para su uso en amplificación de la secuencia de la línea germinal VH4-59 y secuencia de la línea germinal A30 de la familia V κ 1 basándose en las secuencias de nucleótidos descritas en las referencias mencionadas anteriormente, usando métodos convencionales.

Como alternativa, puede obtenerse ADN de la línea celular que expresa Ab12 y modificarse por medios bien conocidos en la técnica (tales como mutagénesis dirigida) para generar Ab12.6 y anticuerpos relacionados con Ab12.6. Se depositó una línea celular que expresaba anticuerpo Ab12 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 1081 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, según los términos del Tratado de Budapest, el 30 de septiembre de 2003 y se le concedió el número de acceso PTA-5554. Este depósito se proporciona para la conveniencia de los expertos en la materia y no es una admisión de que dicho depósito se requiera para la práctica de la invención ni de que realizaciones equivalentes no estén dentro de la experiencia de la materia a la vista de la presente descripción. La disponibilidad pública de este depósito no es una concesión de una licencia para realizar, usar o vender el material depositado bajo ésta o cualquier otra patente. La secuencia de ácido nucleico del material depositado prevalece si está en conflicto con cualquier secuencia descrita en este documento.

Una vez que se ha obtenido la línea germinal o los fragmentos VH y VL de Ab12, estas secuencias pueden mutarse para codificar secuencias de aminoácidos de Ab12.6 o relacionadas con Ab12.6 descritas en este documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN de VH y VL de Ab12 o de la línea germinal se comparan primero con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de Ab12.6 o relacionadas con Ab12.6 para identificar los restos aminoacídicos en la secuencia de Ab12.6 o relacionada con Ab12.6 que difieren. Los nucleótidos apropiados de las secuencias de ADN de línea germinal o Ab12 se mutan de modo que las secuencias mutadas codifiquen la secuencia de aminoácidos de Ab12.6 o relacionada con Ab12.6, usando el código genético para determinar qué cambios de nucleótidos deberían hacerse. La mutagénesis de las secuencias de línea germinal o Ab12 se lleva a cabo por métodos convencionales, tales como mutagénesis mediada por PCR (en la que se incorporan nucleótidos mutados en los cebadores de PCR de modo que el producto de PCR contenga las mutaciones) o mutagénesis dirigida.

Una vez que se han obtenido los fragmentos de ADN que codifican segmentos de VH y VL de Ab12.6 o relacionados con Ab12.6 (por amplificación y mutagénesis de genes de VH y VL, como se ha descrito anteriormente), esos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN siguen estando en fase.

En un método alternativo, puede construirse un gen de scFv con regiones CDR de tipo silvestre (por ejemplo, de Ab12) y después mutarse de la manera descrita en el Ejemplo 3 posterior.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse a un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, N° de Publicación NIH 91-3242). La presente invención incluye adicionalmente todas las regiones constantes de cadena pesada humanas conocidas, incluyendo pero sin limitación todos los alotipos conocidos de la región constante de cadena pesada humana. Los fragmentos de ADN que incluyen estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante de IgG2. Para una cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse a un gen de cadena ligera de longitud completa (así

como un gen de cadena ligera de Fab) uniéndose operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, N° de Publicación NIH 91-3242). La presente invención incluye todas las regiones constantes de cadena ligera humanas conocidas, incluyendo pero sin limitación todos los alotipos conocidos de la región constante de cadena ligera humana. Los fragmentos de ADN que incluyen estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferiblemente es una región constante kappa.

Debe entenderse que las designaciones específicas de regiones FR y CDR dentro de una región variable de cadena pesada o ligera particular pueden variar dependiendo de la convención o sistema de numeración usado para identificar tales regiones (por ejemplo, Chothia, Kabat, software de formación de modelos de AbM de Oxford Molecular, todos los cuales se conocen por los expertos en la materia). Tales designaciones, sin embargo, no son críticas para la invención.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos GENKVEYAPALMALS (SEC ID N°: 2) de modo que las secuencias de VH y VL puedan expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por, por ejemplo, un segundo enlazador flexible GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID N°: 3). Para otras secuencias de enlazadores véase también, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-426, Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 y McCafferty *et al.*, Nature (1990) 348: 552-554.

Para expresar los anticuerpos o partes de anticuerpo de la invención, se insertan ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o parciales, obtenidos como se ha descrito anteriormente, en vectores de expresión de modo que los genes estén unidos operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, se pretende que la expresión "unido operativamente" significa que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de modo que secuencias de control de la transcripción y la traducción del vector cumplen su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para ser compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos convencionales (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y vector o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción en la secuencia de cadena pesada o ligera de Ab12.6 o relacionada con Ab12.6, el vector de expresión puede llevar ya secuencias de región constante del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir las secuencias de VH y VL de Ab12.6 o relacionadas con Ab12.6 en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena pesada y las regiones constantes de cadena ligera, respectivamente, de modo que el segmento VH esté unido operativamente al "segmento" CH dentro del vector y el segmento VL esté unido operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente, o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal esté unido en fase con el extremo amino terminal del gen de cadena del anticuerpo. El péptido sencillo puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpos. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Se apreciará por los expertos en la materia que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la selección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de la expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión en células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión proteica en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), Virus de Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.168.062 de Stinski, Patente de Estados Unidos N° 4.510.245 de Bell *et al.* y Patente de Estados Unidos N° 4.968.615 de Schaffner *et al.*

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen

marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.399.216; 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección con metotrexato/amplificación y el gen de neomicina (neo) para la selección de G418.

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se introducen por transfección en una célula hospedadora por técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transacción" pretenden incluir una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferiblemente células hospedadoras de mamífero, es la más preferida debido a que tales células eucariotas, y en particular las células de mamífero, tienen más probabilidades que las células procariotas de ensamblar y secretar un anticuerpo inmunológicamente activo y plegado de forma apropiada. Se ha indicado que la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen las células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS, células HEK-293 y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación proteica convencionales.

También pueden usarse células hospedadoras para producir partes de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que dentro del alcance de la presente invención se incluyen variaciones del procedimiento anterior. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la presente invención. También puede usarse tecnología de ADN recombinante para retirar algo de o todo el ADN que codifica las cadenas ligera o pesada o ambas, que no es necesario para unirse a EpoR. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también están incluidas por los anticuerpos de la invención.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO dhfr- por transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno unidos operativamente a elementos reguladores de potenciador de CMV/promotor de AdMLP para dirigir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección con metotrexato/amplificación. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

A la vista de lo anterior, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones de ácido nucleico, vector y célula hospedadora que pueden usarse para la expresión recombinante de los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de Ab12.6 y variantes del mismo se muestra en la Figura 9. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de Ab12.6 se muestra en la Figura 10. El dominio CDR1 de la HCVR de Ab12.6 incluye los nucleótidos 26-35 de la SEC ID N°: 7, el dominio CDR2 incluye los nucleótidos 50-65 de la SEC ID N°: 7 y el dominio CDR3 incluye los nucleótidos 98-105 de la SEC ID N°: 7. Se apreciará por el experto en la materia que las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos relacionados con Ab12.6, o parte de los mismos (por ejemplo, un dominio CDR, tal como un dominio CDR2), pueden derivar de secuencias de nucleótidos que codifican las LCVR y HCVR de Ab12.6 usando el código genético y técnicas de biología molecular convencionales.

En una realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

Q-V-Q-L-Q-E-S-G-P-G-L-V-K-P-S-E
T-L-S-L-T-C-T-V-S-G-A-S-I-S-S-Y

Y-W-S-W-I-R-Q-P-P-G-K-G-L-E-W-I
 G-Y-I-X₁-X₂-X₃-G-S-T-N-Y-N-P-S-L-K
 S-R-V-T-I-S-V-D-T-S-K-N-Q-F-S-L
 K-L-R-S-V-T-A-A-D-T-A-V-Y-Y-C-A
 R-E-R-L-G-I-G-D-Y-W-G-Q-G-T-L-V
 T-V-S-S (SEC ID N°: 15)

en la que:

X₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G) y alanina (A);
 X₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G), alanina (A), glutamina (E) y ácido aspártico (D); y
 X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en serina (S), glicina (G), glutamina (E) y treonina (T)

con la condición de que X₁-X₂-X₃ sea distinto de Y-Y-S.

En otra realización más, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14.

En otra realización más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17. El ácido nucleico puede codificar solamente la HCVR o puede también codificar una región constante de cadena ligera del anticuerpo, unida operativamente a la LCVR. En una realización, este ácido nucleico está en un vector de expresión recombinante. Los expertos en la materia apreciarán que los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención no están limitados a los específicamente descritos en este documento, sino que también incluyen, debido a la degeneración del código genético, cualquier ADN que codifique las secuencias polipeptídicas en este documento. La degeneración del código genético está bien establecida en la técnica (Véase, por ejemplo, Bruce Alberts *et al.* (eds.), *Molecular Biology of the Cell*, Segunda Edición, 1989, Garland Publishing Inc., Nueva York y Londres). En consecuencia, las secuencias de nucleótidos de la invención incluyen las que comprenden todos y cada uno de los codones degenerados en todas y cada una de las posiciones en el nucleótido, siempre que dichos codones codifiquen las secuencias de aminoácidos que se exponen en este documento.

En otra realización más, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 (es decir, la LCVR de Ab12.6) aunque el experto en la materia apreciará que debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17. El ácido nucleico puede codificar la LCVR ligada de forma operativa a la HCVR. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una región constante de IgG1 o IgG2 o IgG4. En una realización preferida, el ácido nucleico comprende una región constante de IgG2. En otra realización más, este ácido nucleico está en un vector de expresión recombinante.

La invención también proporciona vectores de expresión recombinantes que codifican tanto una cadena pesada de anticuerpo como una cadena ligera de anticuerpo. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que codifica:

a) una cadena pesada de anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7 (es decir, la HCVR de Ab12.6); y

b) una cadena ligera de anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7 (es decir, la LCVR de Ab12.6).

La invención también proporciona células hospedadoras en las que se han introducido uno o más de los vectores de expresión recombinantes de la invención. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero, más preferiblemente la célula hospedadora es una célula CHO, una célula NSO o una célula HEK-293 o una célula COS. Además, la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante humano de la invención mediante el cultivo una célula huésped de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo humano recombinante de la invención. El método puede comprender adicionalmente aislar el anticuerpo humano recombinante del medio de cultivo.

III. Selección de Anticuerpos Recombinantes

Los anticuerpos recombinantes de la invención, además de los anticuerpos Ab12.6 o anticuerpos relacionados con Ab12.6 descritos en este documento, puede aislarse explorando una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante, preferiblemente una biblioteca de presentación en levadura de scFv, preparada usando ADNc de VL y VH quiméricos, humanizados o humanos (por ejemplo, Ab12). Las metodologías para preparar y explorar tales

bibliotecas se conocen en la técnica. Además de vectores disponibles en el mercado para generar bibliotecas de presentación en levadura (por ejemplo, vector pYD1, Invitrogen, Carlsbad, California) pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles para su uso en la generación y exploración de bibliotecas de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, Boder E. T. y Wittrup K.D., *Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity and stability*, *Methods Enzymol.*, 328: 430-440 (2000) y Boder E. T. y Wittrup K.D., *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries*, *Nat Biotechnol.* 15(6): 553-7 (junio de 1997).

En una realización preferida, para aislar anticuerpos humanos con baja afinidad y una tasa de disociación rápida para EpoR, se usa primero un anticuerpo agonista humano (tal como, por ejemplo, Ab12) para generar secuencias de cadena pesada y ligera humanas expresadas como scFv en la superficie de una levadura (preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*). Se analizan scFv de Ab12 para determinar los que tienen los mayores niveles de expresión. Tales construcciones se exploran después, preferiblemente usando EpoR humano recombinante soluble. Esas construcciones de scFv que tienen el mayor grado de unión de EpoR soluble se seleccionan para mutagénesis posterior de las regiones variables de cadena ligera y pesada para generar bibliotecas mutagénicas de CDR.

Para aumentar adicionalmente la constante de disociación para unión de EpoR, los segmentos VH y VL del par o los pares de VH/VL preferidos pueden mutarse aleatoriamente, preferiblemente dentro de la región CDR2 de VH, en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración de afinidad *in vitro* puede conseguirse reemplazando una parte de cada CDR con un oligonucleótido monocatenario degenerado que codifica tres aminoácidos dentro de la CDR al que se dirige. El reemplazo de una parte de cada CDR con una nueva secuencia seleccionada de forma aleatoria (hasta 8000 posibilidades) puede conseguirse por recombinación homóloga en levadura (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3). Estos segmentos de VH mutados de forma aleatoria pueden analizarse con respecto a la unión a EpoR en el contexto de un scFv; pueden aislarse después los scFv que muestran una fluorescencia mejorada y una velocidad de disociación rápida y la mutación de CDR puede identificarse por secuenciación.

Después de la exploración de una biblioteca de presentación de scFv recombinante, se seleccionan clones que tengan las características deseadas para conversión, preferiblemente en anticuerpos de cadena ligera kappa/inmunoglobulina kappa de tipo 2 (IgG2/K). El ácido nucleico que codifica el anticuerpo seleccionado puede recuperarse del paquete de presentación (por ejemplo, del vector de expresión de levadura) y subclonarse en otros vectores de expresión por técnicas de ADN recombinante convencionales. Si se desea, el ácido nucleico puede manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo de la invención (por ejemplo, ligadas a ácidos nucleicos que codifican dominios de inmunoglobulina adicionales, tales como regiones constantes adicionales). Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado por exploración de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en células hospedadoras de mamífero, como se describe en mayor detalle en la Sección II anterior.

IV. Usos de anticuerpos anti-EpoR

Los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, tienen varios usos. En general, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos pueden usarse para tratar cualquier afección tratable por eritropoyetina o una variante biológicamente activa o análogo de la misma. Por ejemplo, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, de la invención, son útiles para tratar trastornos caracterizados por bajos niveles de glóbulos rojos y/o niveles reducidos de hemoglobina (por ejemplo, anemia). Además, tales anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos pueden usarse para tratar trastornos caracterizados por niveles reducidos o por debajo de lo normal de oxígeno en la sangre o en tejidos, tales como, por ejemplo, hipoxemia o hipoxia tisular crónica y/o enfermedades caracterizadas por una circulación inadecuada de la sangre o un flujo sanguíneo reducido. Los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos también puede ser útiles para promover la curación de heridas o para proteger contra el daño en tejidos y/o células neurales, debido a una lesión en el cerebro/médula espinal, apoplejía. Los ejemplos no limitantes de afecciones que pueden tratarse con anticuerpos de la invención incluyen anemia, tal como anemia inducida por quimioterapia, anemia asociada con cáncer, anemia de enfermedad crónica, anemia asociada a VIH, anemia asociada a trasplante de médula ósea y similares, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca isquémica e insuficiencia renal. Como tales, los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar cualquiera de las enfermedades o afecciones anteriormente mencionadas administrando a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención también pueden usarse para identificar y diagnosticar mamíferos que tienen un receptor de EPO disfuncional. Los mamíferos que tienen un receptor de EPO disfuncional se caracterizan por trastornos tales como anemia. Preferiblemente, el mamífero que se identifica y diagnostica es un ser humano. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de anemia en mamíferos que padecen aplasia de glóbulos rojos. La aplasia de glóbulos rojos puede resultar de la formación de anticuerpos anti-eritropoyetina neutralizadores en pacientes durante el tratamiento con eritropoyetina recombinante (Casadevall, N. *et al.*, *n. Eng. J. Med.* 346: 469 (2002)). Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar aplasia administrando a un mamífero que padece dicha aplasia y que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos de la presente invención.

En una realización de la invención, los anticuerpos del receptor de EPO y partes de unión a antígeno de los mismos también pueden usarse para detectar el receptor de EPO (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como muestras de ensayo tisulares, células intactas o extractos de las mismas), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La invención proporciona un método para detectar el receptor de EPO en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención y detectar el anticuerpo (o parte del anticuerpo), para detectar de este modo el receptor de EPO en la muestra biológica. El anticuerpo o parte de unión a antígeno se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo unido o no unido. Pueden ponerse en práctica una diversidad de formatos de inmunoensayo (tales como ensayo competitivo, inmunoensayos de tipo sándwich directos o indirectos) y se conocen bien por los expertos en la materia.

Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; y un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H . Dada su capacidad para unirse a EpoR humano, los anticuerpos anti-EpoR o partes de los mismos, de la invención pueden usarse para activar o estimular la actividad de EpoR. Los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos son capaces preferiblemente de activar la actividad de EpoR tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, tales anticuerpos y partes de anticuerpos pueden usarse para activar la actividad de EpoR, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene EpoR, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen EpoR con los que un anticuerpo de la invención reacciona de forma cruzada.

En otra realización, la invención proporciona el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción para activar una actividad endógena de un receptor de eritropoyetina humano para tratar anemia, hipoxemia, hipoxia tisular crónica, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca isquémica, insuficiencia renal, daño tisular o daño de células neurales o para promover la curación de heridas en un mamífero, mediante la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención. Preferiblemente, el mamífero es un sujeto humano.

Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano con el que el anticuerpo es capaz de unirse para fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a lo segundo, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, para ensayar las dosificaciones y cursos temporales de la administración).

En otro aspecto, la invención proporciona el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción para tratar a un mamífero que parece aplasia, mediante la administración a un mamífero que necesite tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la invención. Además, la invención proporciona el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción para tratar un mamífero que padece anemia mediante la administración al mamífero que necesita tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención.

V. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol y etanol así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares y polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. También pueden incluirse sustancias farmacéuticamente aceptables tales como humectantes o cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o eficacia del anticuerpo o parte del anticuerpo. Opcionalmente, pueden incluirse agentes disgregantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o una sal de los mismos, tal como alginato sódico. Además de los excipientes, la composición farmacéutica puede incluir uno o más de los siguientes, proteínas vehículo tales como albúmina de suero, tampones, agentes aglutinantes, edulcorantes y otros agentes saporíferos; agentes colorantes y polietilenglicol.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una diversidad de formas. Incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (es decir, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtrado. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo de principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Puede conseguirse una absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención pueden administrarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo preferido de administración es inducción o infusión intravenosa. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que proteja al compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes si se desea) también puede incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en un comprimido, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención por una administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrarlo con, un material que evite su inactivación.

También pueden incorporarse compuestos activos complementarios a las composiciones. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o parte de anticuerpo se co-formula con y/o co-administra con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con monoterapias o, como alternativa, actuar de forma sinérgica o aditiva para mejorar el efecto terapéutico.

Como se usa en este documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" significa una cantidad de anticuerpo o parte de anticuerpo eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. La dosis exacta podrá determinarse por un experto en la materia. Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes basados en la edad, peso corporal, sexo, dieta, momento de administración, interacción de fármacos y gravedad de la afección y podrá determinarse con experimentación rutinaria por los expertos en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Pueden ajustarse los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o puede reducirse o aumentarse la dosis proporcionalmente según se indique

por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y permitir la uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a ensayar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención se dictan por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a alcanzar y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de dicho compuesto activo tal para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante ejemplar para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención es de 0,1-20 mg/kg, más preferiblemente 0,5-10 mg/kg. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en este documento son ejemplares solamente y no se pretende que limiten el alcance o práctica de la composición reivindicada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Conversión de Ab12 en un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla

El objetivo inicial del presente estudio fue reducir la velocidad de disociación de Ab12 IgG2/K usando la tecnología de presentación en levadura. Para cumplir este objetivo, se convirtió Ab12 IgG2/K en un scFv usando secuencias enlazadoras. Se exploraron varias secuencias enlazadoras diferentes durante la construcción de Ab12 scFv (FIG. 1). Cada combinación enlazadora se evaluó por análisis de expresión de scFv de Ab12 en la superficie de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). La combinación enlazadora que dio como resultado la mayor expresión de superficie de scFv de Ab12 se seleccionó como la construcción a usar para mutagénesis posteriores de regiones de CDR y separación de células activadas por fluorescencia (FACS). La FIG. 1 representa una descripción esquemática de una construcción de scFv, que muestra la localización de los enlazadores de scFv y de unión y la selección de secuencias disponibles. Las secuencias enlazadoras se combinaron en diversos órdenes para obtener la mayor expresión de scFv en la superficie de levadura.

Se co-transformaron diversos oligonucleótidos monocatenarios que codificaban scFv de Ab12 con un vector "con huecos" linealizado derivado de pYD1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en levadura por técnicas bien conocidas para los expertos en la materia. Se comparó la expresión proteica en la superficie celular funcional incubando la levadura transformada con concentraciones crecientes de EpoR soluble (EposR) a 37°C (FIG. 2). Se detectó el antígeno unido usando un anticuerpo monoclonal para EpoR, MAB307 obtenido comercialmente de R and D Systems (Minneapolis, MN) seguido de ficoeritrina anti-ratón (PE, Southern Biotech, Birmingham, AL). La construcción de scFv de Ab12 que mostró la mayor expresión empleaba el enlazador 41 (SEC ID N°: 2) como el enlazador de unión y el enlazador 40 (SEC ID N°: 3) como el enlazador de scFv (en lo sucesivo en este documento Ab12 41/40). Esta construcción se usó en todos los experimentos de FACS posteriores como se describe más adelante.

Ejemplo 2: Análisis de la velocidad de disociación de ScFv de Ab12 en levadura

Se realizaron mediciones de la velocidad de disociación de scFv de Ab12 41/40 por incubación de EposR 0,5 µM con levadura 0,1 D.O. (aproximadamente 1×10^6 células de levadura) durante 1,5 horas a 37°C; a continuación, estas células se enfriaron en hielo y se lavaron a 4°C. Un exceso de 10.000 veces de Ab12 IgG1 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), calentado a 37°C, se añadió a las células y se retiraron muestras individuales en diversos puntos temporales, se enfriaron y se leyeron después en un citómetro de flujo Epics XL1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El experimento se diseñó de modo que a medida que EposR se disociaba de ScFv de Ab12, se unía inmediatamente a Ab12 IgG1 (presente a una concentración de saturación) y ya no se detectaría en la superficie de levadura. El EposR unido restante se detectó mediante la adición de MAB307 seguido de la adición de PE anti-ratón. La Figura 3 representa un análisis de velocidad de disociación de ScFv de Ab12 41/40. Como muestra la Figura 3, la mayor parte de EposR se había disociado a los 20 minutos de la competición y este parámetro se tuvo en cuenta en la FACS de velocidad de disociación analizada posteriormente.

Ejemplo 3: Creación de bibliotecas mutagénicas de CDR de ScFv de Ab12

Las 6 CDR de Ab12 41/40 (tres en la cadena pesada y tres en la cadena ligera) se sometieron a selección aleatoria, y se generaron bibliotecas compuestas de 8 miembros cada una. Se modificó el vector pYD1 "con huecos" linealizado (Invitrogen) para incluir un sitio de proteasa TEV y también para contener una secuencia de ScFv de Ab12 41/40 (es decir pYD1Tev-Ab12- 41/40). A continuación, se prepararon vectores pYD1-Tev-Ab12-41/40 con huecos, que carecían de regiones específicas de cada CDR por PCR y el hueco se reemplazó por un oligonucleótido monocatenario degenerado que codificaba tres aminoácidos dentro de la CDR a la que se dirigía. El reemplazo de una parte de cada CDR con una nueva secuencia seleccionada aleatoriamente (hasta 8.000 posibilidades) se

consiguió por recombinación homóloga en levadura. Se muestra un esquema de este método de construcción de biblioteca en la Figura 4, indicando que se introducen por co-transformación el vector con huecos y el oligonucleótido monocatenario en levadura. El vector con huecos y el oligonucleótido experimentan recombinación homóloga, generando de este modo una biblioteca de CDR seleccionadas aleatoriamente. Se generaron un total de 50 bibliotecas usando este método. Las bibliotecas se muestran esquemáticamente en las Figuras 5 y 6.

Ejemplo 4: FACS de Bibliotecas de ScFv de Ab12 41/40

Las 50 bibliotecas de ScFv de Ab12 y la levadura de ScFv de Ab12 de tipo silvestre se sometieron a análisis FACS de velocidad de disociación en un separador de células de alta velocidad MoFlo (Dako Cytomation California Inc. Carpinteria, CA). Se incubaron células de levadura transformadas (0,6 D.O.) con EposR 0,5 μ M a 37°C hasta que se alcanzó el equilibrio (2 horas). Después se enfriaron las células, se lavaron y se añadió un exceso molar de 10.000 veces (5 μ g/ml) de IgG1 Ab12 precalentada a 37°C. Después de una incubación de 20 minutos a 37°C, las células se enfriaron de nuevo, se lavaron y se marcaron dependiendo si se estaba preparando para FACS de “un color” o FACS de “dos colores”. Para el primero, las células se marcaron con una mezcla de MAB307 y PE anti-ratón. Para la segunda, las células se marcaron primero con una mezcla de MAB307 y anticuerpo de conejo anti-6-his (Research Diagnostics, Flanders, NJ), seguido de una mezcla de PE anti-ratón y FITC anti-conejo de cabra (Southern Biotech, Birmingham, AL). También se prepararon muestras de control individuales para establecer la compensación de MoFlo y para asegurar que no existía tinción de fondo no específica.

Para el FACS de disociación de Ciclo 1, cada muestra de la biblioteca se comparó con levadura ScFv de Ab12 (control WT) con respecto a pruebas de una población de células que tuvieran una fluorescencia de FL2 aumentada (y por lo tanto, una velocidad de disociación potencialmente más larga). En cada caso, se seleccionó el 1% más brillante de las células en el eje FL2, se recogió y se volvió a cultivar en medio (producción de Ciclo 1). Para el FACS de disociación Ciclo 2, se realizó un procedimiento de incubación celular idéntico en cada producción de biblioteca de Ciclo 1 para algunas bibliotecas; para otras, el Ciclo 2 de FACS implicó reactivos adicionales para detectar la expresión de superficie. Para cada análisis de FACS de disociación de Ciclo 2, se realizó una selección alrededor del 0,1% superior de células en el eje FL2 y esta selección se impuso en todas las producciones de biblioteca de Ciclo 1, cuando fue aplicable. Se seleccionaron las bibliotecas que presentaban una población de células que tenían una FL2 mayor que las de la selección de WT para FACS, las que no tenían células dentro del intervalo de referencia no se analizaron adicionalmente. Para las bibliotecas seleccionadas, se seleccionó y se recogió el 0,1% más brillante de las células en el eje de FL2. Se sembró una alícuota en placas en medio selectivo para levadura (SD o “exclusión individual”) para el aislamiento de colonias de levadura y el resto se cultivó como cultivos líquidos para futuros análisis celulares.

Ejemplo 5: Análisis de Clones Aislados después de la Separación por Disociación

Se cultivaron producciones de Ciclo 2 en bruto seleccionadas en medio líquido y se sometieron a análisis de disociación (datos no mostrados). Las producciones que presentaban curvas de disociación mejoradas se seleccionaron para un análisis adicional. Se recuperaron clones individuales de estas producciones después de sembrar en placas en medio selectivo y del aislamiento de ADN plasmídico. Se usó PCR para amplificar la región de scFv de cada clon y se secuenciaron los productos para identificar las sustituciones de aminoácidos. La Tabla 1 resalta los resultados de secuenciación de cada producción de Ciclo 2. Se nombraron todos los clones únicos y se apuntó la frecuencia de su prevalencia.

Tabla 1

Secuencia de CDRH2 de Ab12 Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S

Nombre de biblioteca y número de clon secuenciado	Nombre de IgG2/K futuro	Secuencia CDR sustituida en biblioteca mutagénica
H2-1-1 WT		Y I Y
H2-1-1 R2 número 1,8	Ab12.26	Y V G
H2-1-1 R2 número 2	Ab12.27	Y A S
H2-1-1 R2 número 3	Ab12.28	R V G
H2-1-1 R2 número 4	Ab12.29	V R A
H2-1-1 R2 número 5	Ab12.30	K C G
H2-1-1 R2 número 6	Ab12.31	G V G
H2-1-1 R2 número 7	Ab12.32	H R R
H2-1-1 R2 número 9	Ab12.33	A G L
H2-1-1 R2 número 10	Ab12.34	Y G A
H2-1-2 WT		I Y Y
H2-1-2 R2 número 1	Ab12.35	T G P
H2-1-2 R2 número 2	Ab12.36	G G V
H2-1-2 R2 número 6	Ab12.37	V A I
H2-1-2 R2 número 7	Ab12.38	A Y G

H2-1-2 R2 número 8	Ab12.39	V G M
H2-1-2 R2 número 9	Ab12.40	V G A
H2-1-2 WT		I Y Y
H2-1-2 R2 número 11	Ab12.41	Q G H
H2-1-2 R2 número 12	Ab12.42	V W G
H2-1-2 R2 número 13	Ab12.43	G T S
H2-1-2 R2 número 14, 15	Ab12.44	V E S
H2-1-2 R2 número 16	Ab12.45	V H M
H2-1-2 R2 número 17	Ab12.46	V G L
H2-1-2 R2 número 18	Ab12.47 ,	C A G
H2-1-2 R2 número 19	Ab12.48	Y G G
H2-1-2 R2 número 20 (número 5 desde 1c/2c)	Ab12.49	T T E
H2-1-3 WT		Y Y S
H2-1-3 R2 número 1	Ab12.1	A S G
H2-1-3 R2 número 2	Ab12.2	G A G
H2-1-3 R2 número 3	Ab12.3	G N G
H2-1-3 R2 número 4	Ab12.4	A G G
H2-1-3 R2 número 5	Ab12.5	G G H
H2-1-3 R2 número 6	Ab12.6	G G E
H2-1-3 R2 número 7, 8, 9	Ab12.7	G G G
H2-1-3 R2 número 10	Ab12.8	M G G
H2-1-3 WT		Y Y S
H2-1-3 R2 número 11	Ab12.55	A G E
H2-1-3 R2 número 12, 13, 24, 25, 27-31)	Ab12.56	A G T
H2-1-3 R2 número 14, 15	Ab12.107	G V G
H2-1-3 R2 número 16	Ab12.108	A D E
H2-1-3 R2 número 17	Ab12.109	E V G
H2-1-3 R2 número 18	Ab12.110	A D G
H2-1-3 R2 número 19	Ab12.111	A G G
H2-1-3 R2 número 20	Ab12.112	G V S
H2-1-3 R2 número 21	Ab12.113	G V T
H2-1-3 R2 número 22	Ab12.114	E G G
H2-1-3 R2 número 23	Ab12.115	G E E
H2-1-3 R2 número 26	Ab12.116	T E R
H2-4-1 WT		Y S G
H2-4-1 R2 número 1	Ab12.64	P F S
H2-4-1 R2 número 2	Ab12.65	S P V
H2-4-1 R2 número 3	Ab12.66	P P F
H2-4-1 R2 número 5	Ab12.67	P G V
H2-4-1 R2 número 6	Ab12.68	S P I
H2-4-1 R2 número 7	Ab12.69	P F T
H2-4-1 R2 número 8, 9	Ab12.70	S P S
H2-4-1 R2 número 10	Ab12.71	S P I
H2-4-1 WT número 4	Ab12	Y S G

Para determinar qué clones de la maduración de afinidad se convertirían en un formato IgG2/K, se analizaron las producciones de cada biblioteca y se consideraron con respecto a los siguientes parámetros: frecuencia de aislamiento, cambio de secuencia consenso en la CDR y desplazamiento de fluorescencia global de producciones en bruto y clones de levadura individuales. Los clones que aparecían a una mayor frecuencia, que contenían un cambio de consenso representativo de la secuencia de CDR y que tenían la mayor señal global de FL2 en análisis de unión del equilibrio y disociación se seleccionaron para la conversión.

Ejemplo 6: Clonación y Expresión de Anticuerpos Derivados de Presentación de Levaduras

Se convirtieron los scFv seleccionados en anticuerpos IgG2/K por amplificación por PCR de los dominios variables, seguido de ligación de estos dominios a una región constante de IgG2 intacta o región K presente en el vector pBOS (Mizushima y Nagata, Nucleic Acids Research, Vol 18, pág. 5322, 1990). Los plásmidos pBOS que codificaban las reacciones tanto de cadena pesada como ligera se introdujeron por transfección transitoria en células COS y los sobrenadantes resultantes de cultivos celulares se purificaron sobre una columna de sepharose de proteína A. Los anticuerpos purificados se dializaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se cuantificaron por lectura

espectrofotométrica de densidad óptica 280 (D.O. ₂₈₀). Cada anticuerpo se sometió a mediciones de afinidad por BIAcore y se usó como un artículo de ensayo en ensayo de proliferación celular de F36E y UT-7/Epo.

Ejemplo 7: Análisis BIAcore de Anticuerpos Derivados de Presentación en Levaduras

Se realizaron análisis BIAcore en un BIAcore 2000 utilizando el software de BIAcontrol versión 3.1.0 y en un BIAcore 000 utilizando el software de BIAcontrol versión 4.0.1 (BIAcore, Uppsala, Suecia) usando EposR como el antígeno de ensayo. La Tabla 2 resalta los parámetros de afinidad en cada clon de Ab12 mutado en comparación con Ab12.

Tabla 2

Nombre	K_{on} (1/M x s)	K_{off} (1/s)	K_d (nM)
Ab12	$1,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{-3}$	11
Ab12.6	$1,5 \times 10^5$	$4,8 \times 10^{-3}$	32
Ab12.56	$9,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^{-3}$	20
Ab12.17	$1,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^{-5}$	0,33
Ab12.25	$6,5 \times 10^4$	7×10^{-5}	1
Ab12.61	$8,5 \times 10^4$	$9,0 \times 10^{-5}$	1
Ab12.70	$1,6 \times 10^5$	$9,9 \times 10^{-4}$	6
Ab12.76	$2,1 \times 10^5$	$9,9 \times 10^{-5}$	0,48

Como muestra la Tabla 2, Ab12.6 y Ab12.56 mostraron velocidades de disociación más rápidas y valores de K_d mayores en relación con Ab12.

Ejemplo 8: Generación de Sub-variantes de Ab12.6

Para determinar la contribución de las sustituciones de aminoácidos presentes en la secuencia de Ab12.6, se sintetizaron sub-variantes usando ADN de Ab12.6 IgG2/K y cebadores de PCR adecuados diseñados para crear sustituciones cuando fuera apropiado. También se sometieron las sub-variantes a análisis de BIAcore como se ha descrito anteriormente. La Tabla 3 resalta los parámetros de afinidad de cada clon sub-variante.

Tabla 3

Nombre	K_{on} (1/M x s)	K_{off} (1/s)	K_d (nM)
Ab2.118	$2,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^{-3}$	22
Ab12.119	$2,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^{-3}$	21
Ab12.120	$2,7 \times 10^5$	2×10^{-3}	7
Ab12.121	$2,1 \times 10^5$	$6,3 \times 10^{-3}$	31
Ab12.122	$2,2 \times 10^5$	$4,9 \times 10^{-3}$	23
Ab12.123	$1,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{-3}$	25

Ejemplo 9: ensayo de Proliferación de Células Humanas Dependiente de Anticuerpo

Se ensayaron Ab12, Ab12.6 y variantes relacionadas con Ab12.6 en ensayos de proliferación celular *in vitro* establecidos. Se mantuvieron cultivos madre de las líneas celulares eritroleucémicas, UT-7/Epo o células F36E en medio DMEM o RPMI 1640 respectivamente con suero bovino fetal al 10% y 1 unidad por ml de eritropoyetina humana recombinante. Antes de los ensayos, las células se cultivaron durante una noche a una densidad de $4,0 \times 10^5$ células por ml en medio de crecimiento sin Epo. Las células se recuperaron, lavaron y resuspendieron a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células por ml en el medio de ensayo (RPMI 1640 o DMEM + FBS al 10%) y se añadieron 50 μ l de células a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se añadieron 50 μ l de cada patrón de Ab o Epo (Epo humana recombinante (rHuEpo)) en medio de ensayo a los pocillos a concentraciones finales que variaban de 25 nM a 0,098 nM y las placas se incubaron en un incubador humidificado a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de 72 horas, se añadieron 20 μ l de reactivo Promega Cell Titer 96 Aqueous® (preparado según las instrucciones del fabricante, Madison, Wisconsin) a todos los pocillos. Las placas se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 4 horas y se determinó la densidad óptica a 490 nm en un lector de placas Spectra Max 190.

Los valores de CE₅₀ y Emax (mostrados en la Tabla 4 presentada a continuación) se determinaron a partir de gráficas generadas con los datos espectrofotométricos. Los anticuerpos de mayor afinidad (Ab12.17, Ab12.25, Ab12.61 y Ab12.76) produjeron curvas con forma de campana a partir de las cuales no pudieron obtenerse datos de CE₅₀ y/o Emax. Por el contrario, las curvas generadas a partir de los anticuerpos de menor afinidad (mostrados en la Tabla 4) produjeron curvas sigmoideas (como el ligando nativo Epo). Además, como muestra la Tabla 4 y la Figura 11, Ab12.6 y variantes relacionadas con Ab12.6 (con la excepción de AB12.119) estimularon de forma inesperada la proliferación celular en un mayor medida que Ab12.

Tabla 4

Material de Ensayo	CE ₅₀	E _{max}
Epo	0,297	2,82
Ab12	1,29	1,98
Ab12.6	0,58	2,81
AB12.56	1,17	2,512
Ab12.118	1,13	2,65
Ab12.119	1,34	2,53
Ab12.120	0,34	2
Ab12.121	0,465	2,3
Ab12.122	0,42	2,4
Ab12.123	0,91	2,7

Ejemplo 10: Construcción de Ratones Transgénicos mEpoR -/-, hEopR +

Se generaron ratones transgénicos que producían solamente EpoR humano (hEopR +, alelo sencillo) y no EpoR de ratón endógeno (mEpoR -/-, mutación de alelo doble) como se describe en Liu, C. et al., Journal of Biological Chemistry, 272:32395 (1997) y Yu, X., et al., Blood, 98(2):475 (2001). Se establecieron colonias de reproducción para generar ratones para estudios *in vivo* de eritropoyesis.

Ejemplo 11: Ensayo de CFU-E de Médula Ósea Humana

Se eliminaron los glóbulos rojos de médula ósea humana fresca obtenida de Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. (Walkersville, MD) por métodos bien conocidos en la técnica y se resuspendió a $2,5 \times 10^6$ células/ml en IMDM-FBS al 2%. Se añadieron células (0,1 ml) a 17 tubos de cultivo de 100 ml (VWR, West Chester, PA) que contenían 2,4 ml de Methocult (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), 0,6 ml de IMDM-FBS al 2%, 0,066 ml de factor de crecimiento de células madre (Sigma, St. Louis, Missouri, 1 µg/ml), y Epogen™ (Dik Drug Co., Chicago, IL), Aranesp™ (Dik Drug Co.), Ab12, Ab12.6 o Ab de control de isotipo a las concentraciones indicadas. Después de mezclar, se añadieron 1,1 ml de la suspensión de Methocult a una placa petri estéril tratada con cultivo no tisular de 35 mm y se incubó a 37°C, CO₂ al 5% durante 2 semanas. Las colonias, identificadas por microscopía, eran de color rojo. Los resultados en la Figura 12 indican que Ab12.6 era más eficaz que Ab12 para soportar la formación de colonias de CFU-E humanas.

Ejemplo 12: Ensayo de CFU-E de Médula Ósea de Ratón Transgénico

Se eliminaron los glóbulos rojos de médula ósea recogida recientemente de fémures de ratones transgénicos mEpoR-/-, hEpoR+ por métodos bien conocidos en la técnica y se resuspendió a 2×10^6 células/ml en IMDM-FBS al 2%. Se añadieron células (0,1 ml) a 17 tubos de cultivo de 100 ml (VWR, West Chester, PA) que contenían 3,0 ml de Methocult (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), 0,165 ml de factor de crecimiento de células madre (Sigma, St. Louis, Missouri, 1 µg/ml) y Epogen™ (Dik Drug Co., Chicago, IL), Aranesp™ (Dik Drug Co.), Ab12, Ab12.6 o Ab de control de isotipo a las concentraciones indicadas. Después de mezclar, se añadieron 1,1 ml de la suspensión de Methocult a una placa petri estéril tratada con cultivo no tisular de 35 mm y se incubó a 37°C, CO₂ al 5% durante 2 semanas. Las colonias teñidas con benzidina (Reference Fibach, E., 1998 Hemoglobin, 22:5-6, 445-458) se identificaron por microscopía. Los resultados de la Figura 13 indican que Ab12.6 era más eficaz que Ab12 para soportar la formación de colonias de CFU-E de ratón transgénico de forma similar a los resultados observados en el ensayo de CFU-E humano (véase la Figura 12 anterior).

Ejemplo 13: Efecto de la Administración de Ab12.6 sobre el Cambio de Hematocrito en Ratón Transgénico mEpoR-/-, hEpoR+

Se realizaron experimentos para determinar el efecto de una dosis única de Ab12.6 sobre la eritropoyesis con respecto a Aranesp™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), una variante de actuación más larga de Epogen. Se inyectó a ratones transgénicos (mEpoR-/-, hEpoR+ como se ha descrito en el Ejemplo 10) por vía subcutánea una vez con Ab12, Ab12.6 o un Ab de control de isotipo a 0,8 mg/kg en 0,2 ml de vehículo (solución salina tamponada con fosfato [PBS] que contenía albúmina de suero bovino [BSA] al 0,2%). Se inyectó a los animales de control del mismo modo Aranesp™ a 3 µg/kg, sólo que también se administró una segunda dosis de Aranesp™ el día 14 (el régimen de dosificación terapéutico de Aranesp™ convencional es de ~ 3 µg/kg administrado bisemanalmente). Se tomaron muestras de sangre el día 0, 7, 14, 21 y 28 para determinar los hematocritos por métodos bien conocidos en la técnica. Como se muestra en la Figura 14, en comparación con Ab12, Ab12.6 tenía potencia mejorada en la elevación y mantenimiento de los niveles de hematocrito durante un periodo de tiempo de 28 días. Ab12.6 a 0,8 mg/kg también provocó una velocidad más rápida de aumento del hematocrito medido el día 7 que una dosis sencilla de Aranesp™ administrada a 3 µg/kg. Además, una dosis sencilla de Ab12.6 era al menos tan eficaz al elevar el hematocrito el día 28 como Aranesp™ administrado dos veces el día 0 y el día 14.

Ejemplo 14: Generación de biblioteca de enlaces

Se generaron enlazadores oligonucleotídicos degenerados, de 45 nucleótidos de longitud, de acuerdo con el siguiente diseño: 5' GGA NHS NHS NHS NHS NHS NHS NHS NHS NHS NHS NHS NHS NHS NHS AGT 3' (SEC ID N°: 28) y 5' GGA VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS VNS AGT 3' (SEC ID N°: 29) en los que N es A o G o C o T; V es A o C o G; H es A o C o T; y S es C o G.

En la primera secuencia enlazadora, el uso del codón NHS evita la creación de GGC y GGG, los dos codones posibles para glicina en esta selección de codón con preferencia. Además, el codón NHS evita la creación de TGC (único codón posible para cisteína) y TGG (único codón posible para triptófano), TGC, CGG y AGG (todos los codones posibles para arginina) y AGC (uno de los tres codones de serina posibles). En la secuencia de enlazador inferior, el uso del codón VNS limita la creación de TCC y TCG, dos de los tres posibles codones de serina. Además, el codón VNS evita la creación de TTC (único codón posible para fenilalanina), TAC (único codón posible para tirosina), TGC (único codón posible para cisteína), TGG (único codón posible para triptófano), TAG (único codón de parada posible) y TGG (uno de los tres codones posibles para leucina). Estas secuencias enlazadoras se sintetizaron como parte de un oligonucleótido sintético más largo que también contenía elementos complementarios a una parte de una secuencia de ADN de scFv de control LT28-A que tenía una secuencia enlazadora (G₄S)₃. LT28-SA se generó usando técnicas de biología molecular convencionales reemplazando la secuencia CDR3 de LT28 Ala-Ala-Trp-Asp-Asp-Ser-Leu-Ser-Gly-Pro-Val (descrita en el documento WO 01/58956, publicado el 16 de agosto de 2001) con Ala-Ala-Gly-Asp-Asp-Phe-Leu-Val-Ser-Met-Leu. La secuencia enlazadora (G₄S)₃ se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.258.498 y 5.482.858.

Los oligonucleótidos de la biblioteca de enlazadores prolongados se incorporaron en el scFv de LT-28-8A por PCR.

Se generaron productos de PCR de enlazador VNS y NHS, se purificaron y se mezclaron con plásmido de presentación en levaduras digerido por restricción (pYD-1) que contenía regiones homólogas de secuencias de ADN complementarias presentes en los extremos tanto 5' como 3' de los productos de PCR enlazadores de VNS y NHS. Los productos generados por PCR que codificaban el scFv de LT28-8A completo (con un enlazador codificado por NHS o VNS) se insertaron por recombinación homóloga en el vector pYD-1 inducible por galactosa de modo que estaban en fase. Se seleccionaron recombinantes homólogos por cultivo posterior en medio sin triptófano y sin uracilo. Se evaluaron los títulos de las bibliotecas de enlazador de BNS y NHS resultantes por recuento de colonias y las bibliotecas se prepararon para análisis por un separador de células activadas por fluorescencia (FACS).

Ejemplo 15: Análisis de Biblioteca

Se compararon dos gráficos de bibliotecas de scFv de LT28-8A de enlazadores de VNS y NHS del Ejemplo 14 con los de scFv de LT28-8A cuando se incubaron células de levadura inducidas de todos los grupos con anticuerpo monoclonal V5-FTTC (Invitrogen, Carlsbad, CA). El marcador epitópico V5 se codificó dentro del scFv y estaba en el extremo 3' del polipéptido, y como resultado la presencia de este epítipo indicaba que el scFv se traducía completamente y la señal generada por unión de anticuerpo era representativa de los niveles de expresión del scFv en la superficie de levadura. El porcentaje de células que se tiñeron de forma positiva para FICT: LT28-8A fue del 58%; la biblioteca de NHS fue del 31%; y la biblioteca de VNS fue del 47%.

Se compararon los análisis FACS de células de los tres grupos de ensayo después de la adición de IL-18 biotinilada, preparado como se describe en el documento WO 01/58956, y estreptavidina R-ficoeritrina (RPE) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y V5-FITC. La fluorescencia de RPE representa la unión de antígeno a los scFv en la superficie de levadura y, junto con la presencia del epítipo de V5, se genera una señal de color dual por clones que expresan scFv de longitud completa y antígeno de unión. Se seleccionó una concentración de IL-18 biotinilada 30 nM para este análisis debido a que el scFv de LT-28-8A tenía una K_D de 30 nM en la superficie de levadura. El porcentaje de células que se tiñeron de forma positiva tanto para FITC como para RPE:LT28-8A fue del 55%; biblioteca de NHS fue del 25%; y biblioteca de VNS fue del 36%.

Las células de las bibliotecas de scFv de LT-28-8A-NHS o -VNS que demostraron fluorescencia idéntica al control se seleccionaron individualmente y se recogieron usando un separador de células. Estas poblaciones recogidas (denominadas "producciones") se amplificaron en un cultivo líquido y se sembraron alícuotas del cultivo en medio sólido para aislar colonias individuales. Se extrajo ADN de colonias individuales y se determinó la secuencia de nucleótidos del enlazador por secuenciación de ADN.

Ejemplo 16: Comparación de scFv que Contienen Secuencias Enlazadoras Variables

Para terminar si los enlazadores que contenían aminoácidos variables tenían algún efecto sobre el comportamiento de scFv *in vitro* o *in vivo*, se seleccionaron 11 clones de scFv de producción de NHS-R1 aleatorios del Ejemplo 15, que contenían enlazadores con solamente una glicina y serina, y se ensayaron en una serie de ensayos.

Ejemplo 17: medición de K_d en la superficie de levadura

Las constantes de disociación (K_d) de 11 clones de scFv de producción de NHS-R1 y scFv de LT-28-8A (con el

enlazador (G₄S)₃) se midieron en un análisis de valoración de siete puntos. Esto incluyó los clones de scFv de producción de NHS-R1: 13, 19, 22, 23, 30, 33, 34, 38, 40, 41 y 44. Se ensayó la unión de antígeno como se describe en el Ejemplo 14. Todos los clones de scFv de producción de NHS-R1 y los scFv de control mostraron una K_d de aproximadamente 22-26 nM.

Ejemplo 18: expresión y purificación de scFv soluble en bacterias

Se analizó la expresión *in vivo* de 10 clones de producción de NHS-R1 (10, 13, 19, 30, 33, 34, 38, 40, 41, 44) y scFv de LT-28-8A después de la construcción de construcciones de expresión que codifican los scFv. Las 10 secuencias de scFv de LT28-8A se ligaron en el vector de expresión inducible pUC19/pCANTAB (Patente de Estados Unidos N° 5.872.215) y se utilizaron para transformar células TG-1. Después del crecimiento en expresión restringida, se inició la inducción de scFv por adición de IPTG 1 mM y se purificó por afinidad el scFv soluble a partir de preparaciones periplásmicas de células TG-1 inducidas. Los clones 13, 19 y 30 crecieron muy poco y no se indujeron. Se ensayó el scFv purificado con respecto a concentración proteica por ensayo BCA:

Tabla 5

Muestra	Concentración (µg/ml)	Muestra	Concentración (µg/ml)
NHS-R1-10	41	NHS-R1-40	4156
NHS-R1-33	826	NHS-R1-41	607
NHS-R1-34	1600	NHS-R1-44	55
NHS-R1-38	619	LT-28-8A	516

Ejemplo 19: Actividad de scFv soluble en un bioensayo

Los scFv solubles producidos por LT-28-8A y los clones de scFv de producción de NHS-R1 33, 34, 38, 40, 41 y 44 se ensayaron en un bioensayo de neutralización como se describe en el documento WO 01/58956. Todas las preparaciones de scFv mostraron valores de CI₅₀ de aproximadamente 1x10⁻⁷ a 2x10⁻⁷ M. La secuencia enlazadora 33 es la SEC ID N°: 27; la secuencia enlazadora 34 es la SEC ID N°: 4; la secuencia enlazadora 40 es la SEC ID N°: 3; y la secuencia enlazadora 41 es la SEC ID N°: 2.

Ejemplo 20: Ab12.6 reconoce un epítipo dependiente de conformación

Se produjo dominio extracelular de EpoR expresado recombinante a través de la expresión en células CHO y se purificó hasta la homogeneidad. Se sometieron a electroforesis 3 µg de dominio extracelular de EpoR por carril en geles de poliacrilamida al 4-20% en condiciones desnaturalizantes (en tampón SDS) o condiciones nativas (sin tampón SDS). Para el análisis de transferencia de Western, se transfirieron los geles a membranas de PVDF, se bloquearon con leche en polvo al 5% y se incubaron con Ab 12.6 (10 µg/ml) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas 4 veces con PBS/Tween, se incubaron con anticuerpo anti-humano de cabra conjugado con HRP (1:2.500) y se revelaron con 4-cloro-1-naftol como sustrato. Como muestra la Figura 15, Ab12.6 interacciona con el dominio extracelular de EpoR recombinante sólo en condiciones nativas y no desnaturalizantes, lo que indica que Ab12.6 reconoce un epítipo dependiente de la conformación.

Ejemplo 21: Fab de Ab12.6 monomérico activa EpoR

Se prepararon fragmentos F(ab')₂ bivalentes y Fab monoméricos de Ab12.6 y se purificaron usando condiciones de digestión con papaína y pepsina convencionales (Kits de Preparación de Fab y F(ab')₂ de Pierce ImmunoPure; Pierce, Rockford IL). Se mantuvieron cultivos madre de la línea celular eritroleucémica humana F36E en medio RPMI 1640 con suero bovino fetal al 10% y una unidad por ml de eritropoyetina humana recombinante. Antes de los ensayos, las células se cultivaron durante una noche a una densidad de 4,0 a 5,0 x 10⁵ células por ml en medio de crecimiento sin EPO. Las células se recuperaron, se lavaron y resuspendieron a una densidad de 1,0 x 10⁶ células por ml en medio de ensayo (RPMI 1640 + FBS al 10%) y se añadieron 50 µl de células a pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de cada uno de Ab12.6, Fab de Ab12.6, F(ab')₂ de Ab12.6 o patrones de EPO (EPO humana recombinante (rHuEPO)) en medio de ensayo a los pocillos y las placas se incubaron en un incubador humidificado a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de 72 horas, se añadieron 20 µl de reactivo Promega Cell Titer 96 Aqueous® (preparado según las instrucciones del fabricante, Madison, Wisconsin) a todos los pocillos. Las placas se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 4 horas y la densidad óptica a 490 nm se determinó usando un lector de microplacas (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter, Wallac Company, Boston, MA). Los resultados, vistos en la Figura 16, mostraron que el Fab de Ab12.6 monomérico estimuló la proliferación de la línea celular F36E.

La presente invención se ilustra por la anterior descripción y ejemplos.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Abbot Laboratories
Reilly, Edward B.
Lacy, Susan E.
Fung, Emma
Belk, Johathan P.
10 Roguska, Michael
- <120> Anticuerpos Para El Receptor De Eritropoyetina Y Usos De Los Mismos
- <130> 7349W001
- 15 <140>
<141>
- <150> 10/821.497
20 <151> 09-04-2004
- <150> 10/822.306
<151> 12-04-2004
- 25 <160> 29
- <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
- <210> 1
30 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
35 <223> enlazador de scFv
- <400> 1
- Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**
1 5 10 15
- 40 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> enlazador de scFv
- <400> 2
- Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser**
1 5 10 15
- 50 <210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
<223> enlazador de scFv
- <400> 3
- 60

Gly Pro Ala Lys Glu Leu Thr Pro Leu Lys Glu Ala Lys Val Ser
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> enlazador de scFv

10 <400> 4

Gly His Glu Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser
1 5 10 15

<210> 5

<211> 116

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

20

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
      20          25          30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35          40          45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85          90          95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100          105          110
Thr Val Ser Ser
      115

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85          90          95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100          105          110
Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
      20          25          30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35          40          45
Gly Tyr Ile Gly Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85          90          95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100          105          110
Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
      20           25           30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35           40           45
Gly Tyr Ile Ala Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      50           55           60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85           90           95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100          105          110
Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 9
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
      20           25           30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35           40           45
Gly Tyr Ile Gly Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      50           55           60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85           90           95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100          105          110
Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 10
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
Gly Tyr Ile Tyr Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50           55           60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85           90           95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 11
 <211> 116
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50           55           60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85           90           95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 12
 <211> 116
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
      20           25           30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35           40           45
Gly Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      50           55           60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85           90           95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100          105          110
Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 13
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
      20           25           30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35           40           45
Gly Tyr Ile Tyr Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
      50           55           60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65           70           75           80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85           90           95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100          105          110
Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 14
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1      5      10      15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
20      25      30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35      40      45
Gly Tyr Ile Gly Tyr Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50      55      60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65      70      75      80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85      90      95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100      105      110
Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 15
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 52, 53, 54

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 15

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1      5      10      15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Ser Tyr
20      25      30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35      40      45
Gly Tyr Ile Xaa Xaa Xaa Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50      55      60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65      70      75      80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85      90      95
Arg Glu Arg Leu Gly Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100      105      110
Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20      25      30

```

```

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
   35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro
   85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
   100           105

```

<210> 17
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
   20           25           30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
   35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Pro
   85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
   100           105

```

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4, 5

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 18

```

Tyr Ile Xaa Xaa Xaa Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
  1           5           10           15

```

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

<400> 19

```

Tyr Ile Gly Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
  1           5           10           15

```

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 20

 Tyr Ile Ala Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

 10 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 21

 Tyr Ile Gly Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

 20 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 22

 Tyr Ile Tyr Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

 30 <210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

 Tyr Ile Tyr Tyr Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 35
 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 24

 Tyr Ile Gly Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 45
 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 25

Tyr Ile Tyr Gly Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 26
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

Tyr Ile Gly Tyr Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

10 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia enlazadora
 <400> 27

Gly Phe Lys Asp Ala Leu Lys Gln Pro Met Pro Tyr Ala Thr Ser
1 5 10 15

<210> 28
 <211> 45
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> variación
 <222> 4 - 19, 21 - 42
 30 <223> n = A, T, C o G; h = A, C o T; s = C o G
 <400> 28

gganhsnhsn hsnhsnhsnh snhsnhsnhs nhsnhsnhsn hsagt 45

35 <210> 29
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> variación
 <222> 4 - 19, 21 - 42

45 <223> n = A, T, C o G; s = C o G; v = A, C o G
 <400> 29

ggavnsvnsv nsvnsvnsvn svnsvnsvns vnsvnsvnsv nsagt 45

50

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se disocia del receptor de eritropoyetina humano (EpoR) con una constante de velocidad K_{off} mayor de $1,3 \times 10^{-3} s^{-1}$ y que activa una actividad endógena de dicho EpoR humano en un mamífero, comprendiendo dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

Q-V-Q-L-Q-E-S-G-P-G-L-V-K-P-S-E
T-L-S-L-T-C-T-V-S-G-A-S-I-S-S-Y
Y-W-S-W-I-R-Q-P-P-G-K-G-L-E-W-I
G-Y-I-X₁-X₂-X₃-G-S-T-N-Y-N-P-S-L-K
S-R-V-T-I-S-V-D-T-S-K-N-Q-F-S-L
K-L-R-S-V-T-A-A-D-T-A-V-Y-Y-C-A
R-E-R-L-G-I-G-D-Y-W-G-Q-G-T-L-V
T-V-S-S (SEC ID N°: 15)

en la que:

X₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G) y alanina (A);
 X₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G) y alanina (A), glutamina (E) y ácido aspártico (D); y
 X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en serina (S), glicina (G), glutamina (E) y treonina (T)
 con la condición de que X₁ - X₂ - X₃ sea distinto de Y-Y-S, y
 la región variable de cadena ligera comprenda una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17.

2. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que dicha constante de velocidad K_{off} se selecciona del grupo que consiste en $1,4 \times 10^{-3} s^{-1}$ o mayor, $1,9 \times 10^{-3} s^{-1}$ y $4,8 \times 10^{-3} s^{-1}$.

3. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

4. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo es un isotipo IgG2.

5. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo humano.

6. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que se une a EpoR humano con una K_d de 7 nM o mayor.

7. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 6 en el que dicha K_d es de 7 a 32 nM inclusive.

8. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14.

9. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para activar una actividad endógena de un receptor de eritropoyetina humano para tratar anemia, hipoxemia, hipoxia tisular crónica, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca isquémica, insuficiencia renal, daño de células o tejido neural, o para promover la curación de heridas en un mamífero, mediante la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.

10. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para tratar a un mamífero que padece aplasia, mediante la administración al mamífero que necesita tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.

11. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para tratar a un mamífero que padece anemia, mediante la administración al mamífero que necesita tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.

12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Una secuencia polinucleotídica aislada o purificada que codifica una región variable de cadena pesada y una

región variable de cadena ligera, en la que la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

5 **Q-V-Q-L-Q-E-S-G-P-G-L-V-K-P-S-E**
 T-L-S-L-T-C-T-V-S-G-A-S-I-S-S-Y
 Y-W-S-W-I-R-Q-P-P-G-K-G-L-E-W-I
 G-Y-I-X₁-X₂-X₃-G-S-T-N-Y-N-P-S-L-K
 S-R-V-T-I-S-V-D-T-S-K-N-Q-F-S-L
 K-L-R-S-V-T-A-A-D-T-A-V-Y-Y-C-A
 10 **R-E-R-L-G-I-G-D-Y-W-G-Q-G-T-L-V**
 T-V-S-S (SEC ID N°: 15)

en la que:

15 X₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G) y alanina (A);
 X₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en tirosina (Y), glicina (G) y alanina (A), glutamina
 (E) y ácido aspártico (D); y
 X₃ se selecciona independientemente del grupo que consiste en serina (S), glicina (G), glutamina (E) y treonina
 (T)
 con la condición de que X₁ - X₂ - X₃ sea distinto de Y-Y-S, y
 la región variable de cadena ligera comprenda una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17.

20 14. El polinucleótido de la reivindicación 13, donde dicho polinucleótido codifica una región variable de cadena
 pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID
 N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14.

25 15. Un vector de expresión recombinante que comprende el polinucleótido de la reivindicación 13.

 16. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 15.

30 17. La célula hospedadora de la reivindicación 16 que es una célula de mamífero.

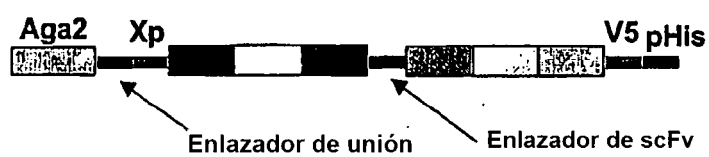
 18. La célula hospedadora de la reivindicación 17 seleccionada del grupo que consiste en una célula CHO, una
 célula COS y una célula HEK-293.

35 19. La célula hospedadora de la reivindicación 16 que es una célula de levadura.

 20. La célula hospedadora de la reivindicación 16 que es una célula bacteriana.

 21. Una secuencia polipeptídica codificada por dicha secuencia polinucleotídica de la reivindicación 13.

FIGURA 1



Enlazador WT - GGGGSGGGGSGGGGS
 Enlazador 41 - GENKVEYAPALMALS
 Enlazador 40 - GPAKELTPLKEAKVS
 Enlazador 34 - GHEAAVMQVQYPAS

FIGURA 2

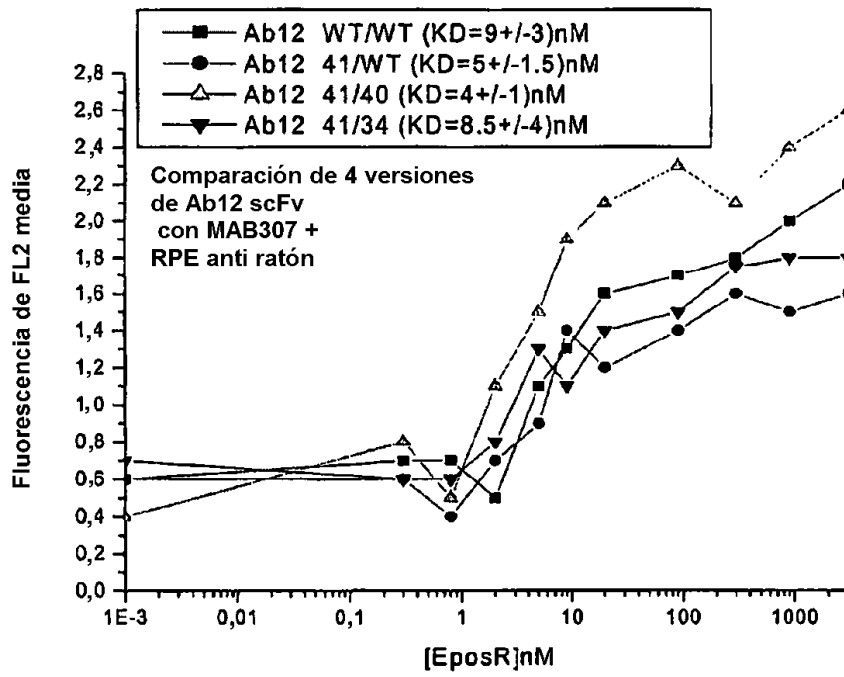


FIGURA 3

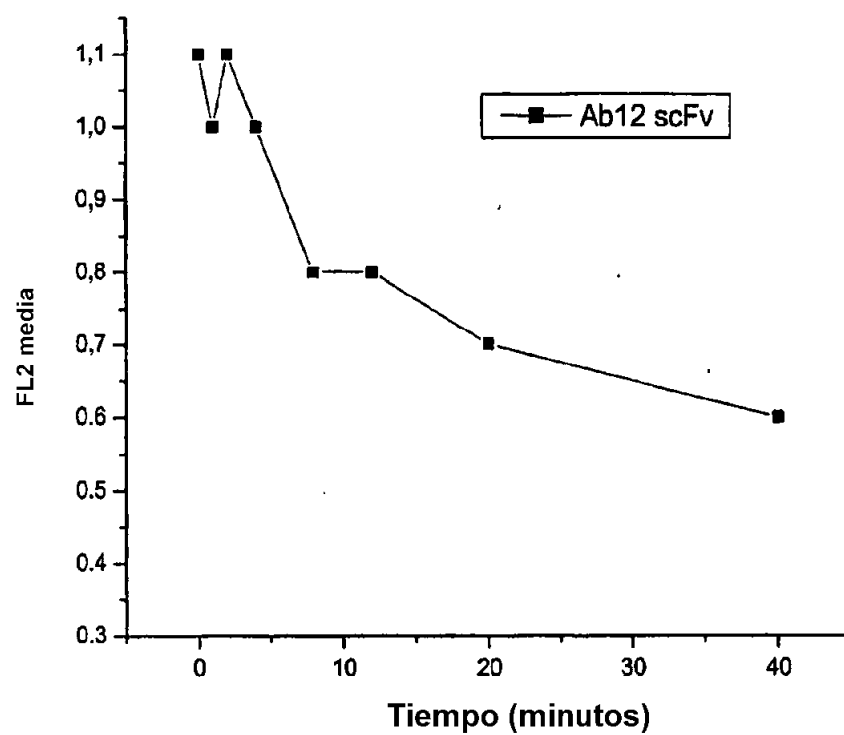


FIGURA 4

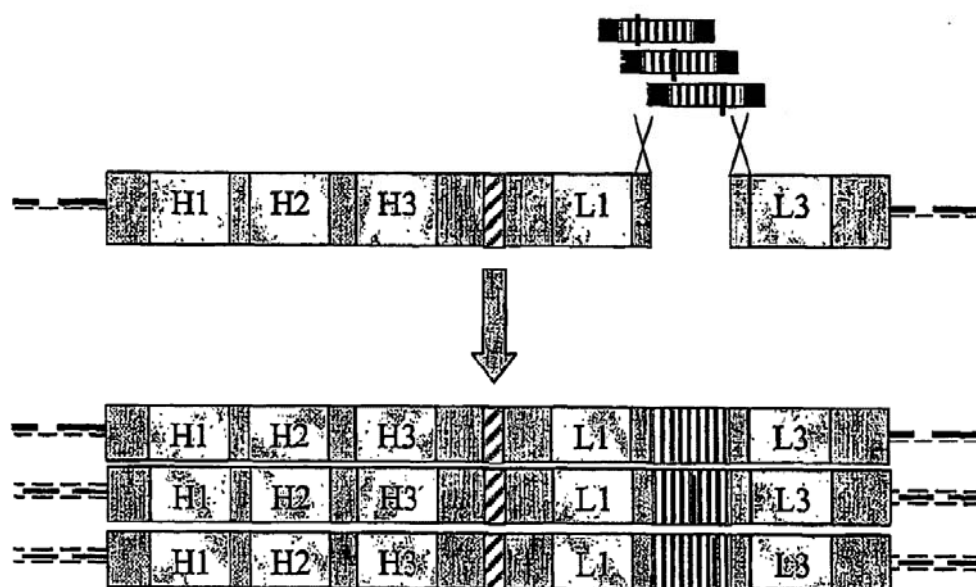


FIGURA 5

	H2-1-1	YIY		
	H2-1-2	IYY		
	H2-1-3	YYS		
	H2-4-1	YSG		
	H2-4-2	SGS		
	H2-2-1	GST		
	H2-2-2	STN		
	H2-2-3	TNY		
	H2-5-1	NYN		
	H2-5-2	YNP		
	H2-3-1	NPS		
	H2-3-2	PSL		
	H2-3-3	SLK		
	H2-3-4	LKS		
	H3-1-1	ERL		
	H3-1-2	RLG		
	H3-3-1	LGI		
	H3-3-2	GIG		
	H3-2-1	IGD		
	H3-2-2	GDY		

H1	H2	H3
SYWWS	YTYSGSTNYNP SLKS	ERL GIDGY

FIGURA 6

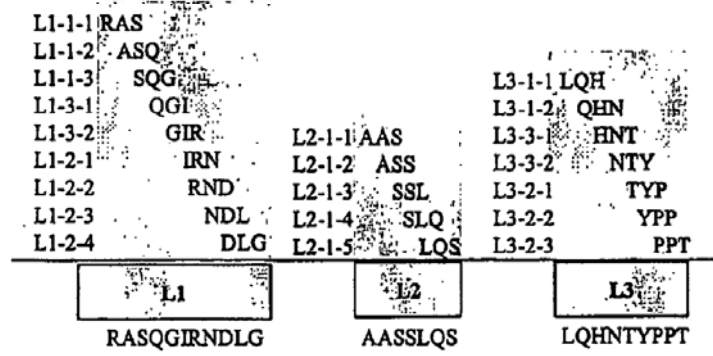


FIGURA 7

SEC ID N°	Ab	FR1	CDR1	PR2	CDR2
5	Línea germinal	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYSGSTNYPNPSLKS
6	12	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYSGSTNYPNPSLKS
7	12.6	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIGGEGSTNYPNPSLKS
8	12.56	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIAGTGSTNYPNPSLKS
9	12.118	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIGYSGSTNYPNPSLKS
10	12.119	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYSGSTNYPNPSLKS
11	12.120	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYEGSTNYPNPSLKS
12	12.121	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIGGSGSTNYPNPSLKS
13	12.122	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYEGSTNYPNPSLKS
14	12.123	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIGYEGSTNYPNPSLKS
15	Consenso	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GASISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	Y IXXzXaGSTNYPNPSLKS

Ab	PR3	CDR3	FR4
Línea germinal	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12.6	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12.56	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12.118	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12.119	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12.120	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12.121	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12.122	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
12.123	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS
Consenso	RVTIISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	ERLGIGDY	WGQGTLLTVSS

FIGURA 8

SEC ID N°	Ab	FR1	CDR1	FR2	CDR2
16	Línea germinal	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12.6	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12.56	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12.118	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12.119	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12.120	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12.121	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12.122	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS
17	12.123	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQIRNDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	AASSLQS

Ab	FR3	CDR3	FR4
Línea germinal	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNSYPPT	FGQGTKVEIK
12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK
12.6	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK
12.56	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK
12.118	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK
12.119	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK
12.120	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK
12.121	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK
12.122	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK
12.123	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	LQHNTYPPT	FGQGTKVEIK

FIGURA 9

A. Ácido nucleico de VH de Ab12 (SEC ID N° 36) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 6)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I Y Y S G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

B. Ácido nucleico de VH de Ab12.6 (SEC ID N° 37) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 7)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I G G E G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCGGGGGGGAGGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

FIGURA 9 (Continuación)

C. Ácido nucleico de VH de Ab12.56 (SEC ID N° 38) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 8)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I A G T G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCGCCGGGACGGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

D. Ácido nucleico de VH de Ab12.118 (SEC ID N° 39) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 9)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I G Y S G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCGGTTACAGTGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

FIGURA 9 (Continuación)

E. Ácido nucleico de VH de Ab12.119 (SEC ID N° 30) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 10)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I Y G S G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATGGCAGTGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

F- Ácido nucleico de VH de Ab12.120 (SEC ID N° 31) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 11)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I Y Y E G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACGAAGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

FIGURA 9 (Continuación)

G. Ácido nucleico de VH de Ab12.121 (SEC ID N° 32) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 12)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I G G S G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCGGGGGGTCTGGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

H. Ácido nucleico de VH de Ab12.122 (SEC ID N° 33) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 13)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I Y G E G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATGGGGAAGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

FIGURA 9 (Continuación)

I. Ácido nucleico de VH de Ab12.123 (SEC ID N° 34) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 14)

```

      Q V Q L Q E S G P G L V K P
1  CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCT
   S E T L S L T C T V S G A S
43 TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCC
   I S S Y Y W S W I R Q P P G
85 ATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG
   K G L E W I G Y I G Y E G S
127 AAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCGGGTACGAGGGGAGC
   T N Y N P S L K S R V T I S
169 ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCA
   V D T S K N Q F S L K L R S
211 GTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGGTCT
   V T A A D T A V Y Y C A R E
253 GTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
   R L G I G D Y W G Q G T L V
295 CGACTGGGGATCGGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
   T V S S
337 ACCGTCTCCTCA

```

FIGURA 10

Ácido nucleico de VL (SEC ID N° 35) y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID N° 17) de Ab de Ab12, Ab12.6 y anticuerpos relacionados con Ab12.6
FIGURA

```

      D I Q L T Q S P S S L S A S
1  GACATCCAGCTGACCCAATCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT
   V G D R V T I T C R A S Q G
43 GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGC
   I R N D L G W Y Q Q K P G K
85 ATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
   A P K R L I Y A A S S L Q S
127 GCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
   G V P S R F S G S G S G T E
169 GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAA
   F T L T I S S L Q P E D F A
211 TTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
   T Y Y C L Q H N T Y P P T F
253 ACTTATTACTGTCTACAGCATAATACTTACCCTCCGACGTTTC
   G Q G T K V E I K
295 GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

```

FIGURA 11

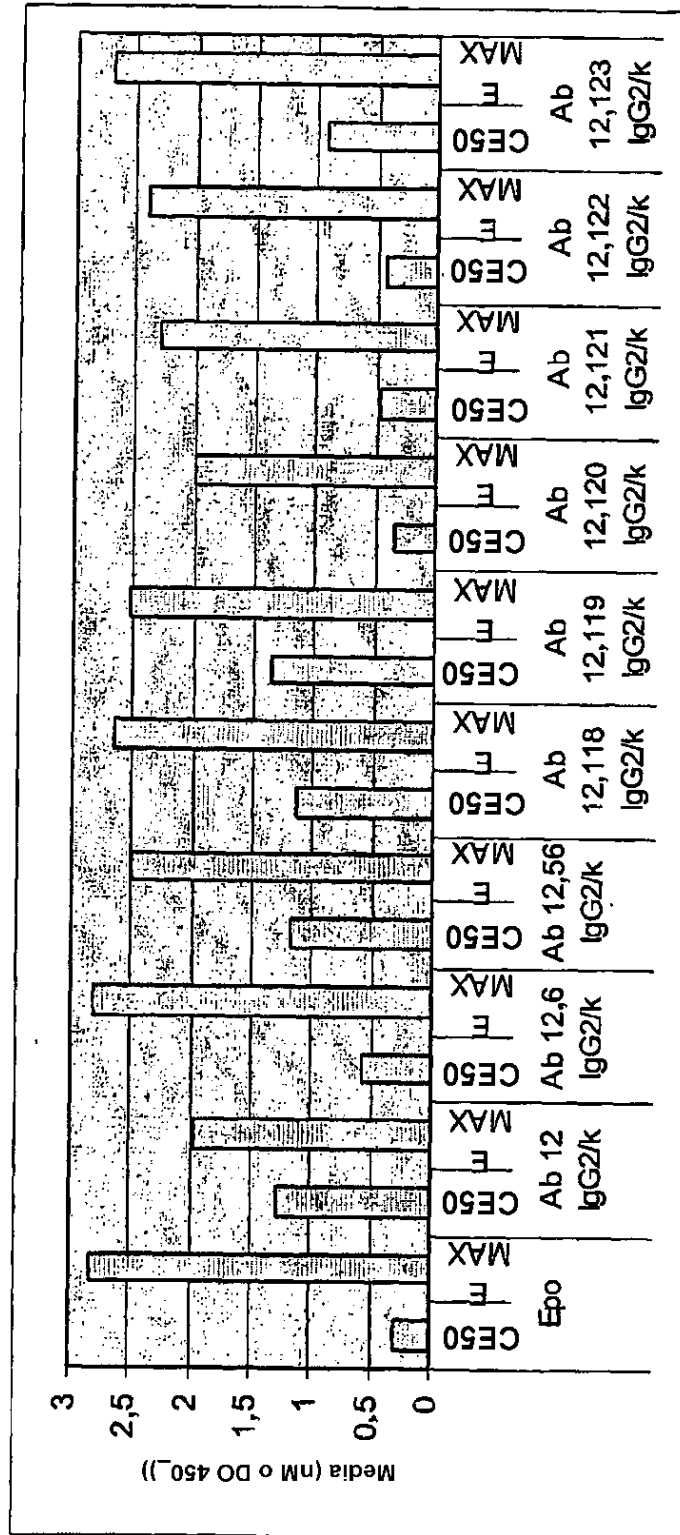




FIGURA 12

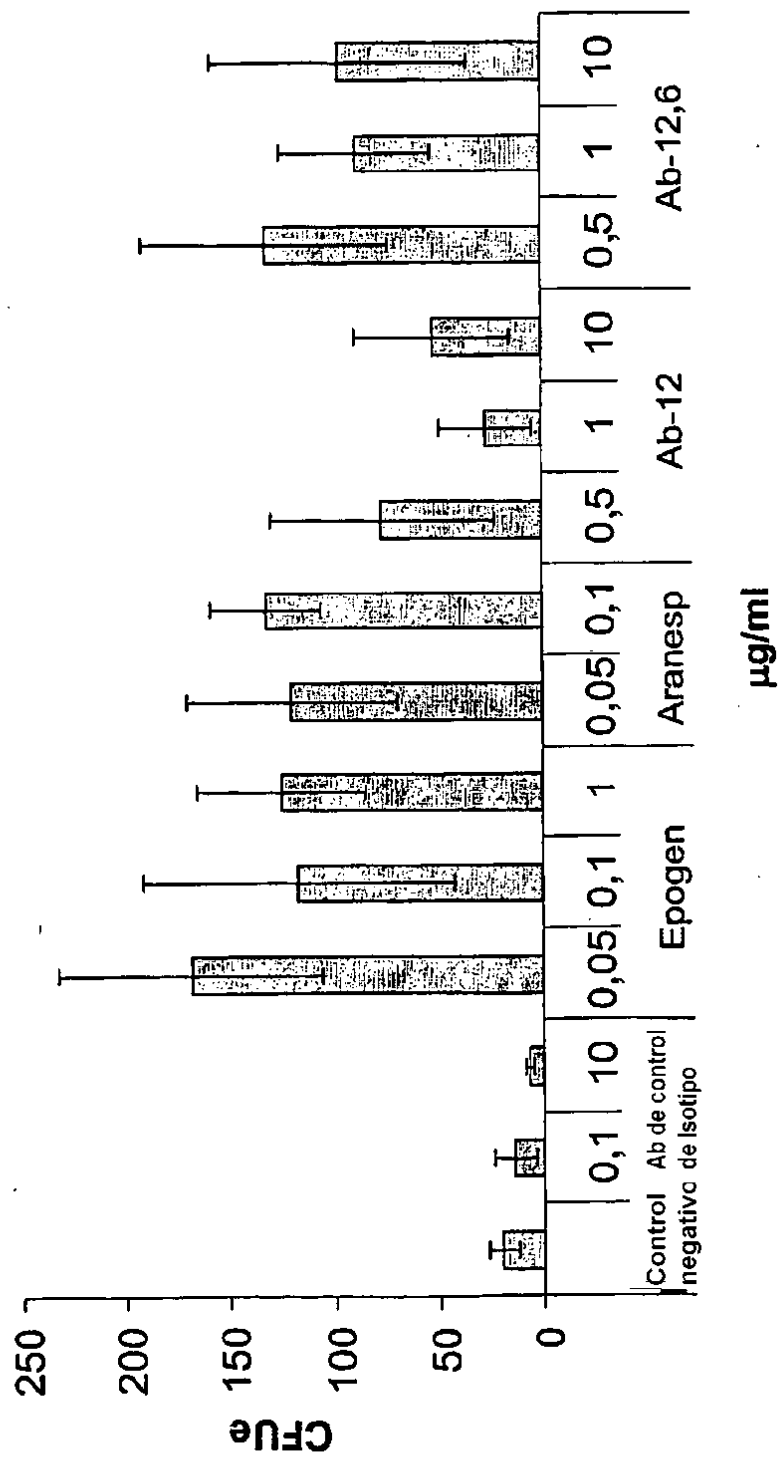


FIGURA 13

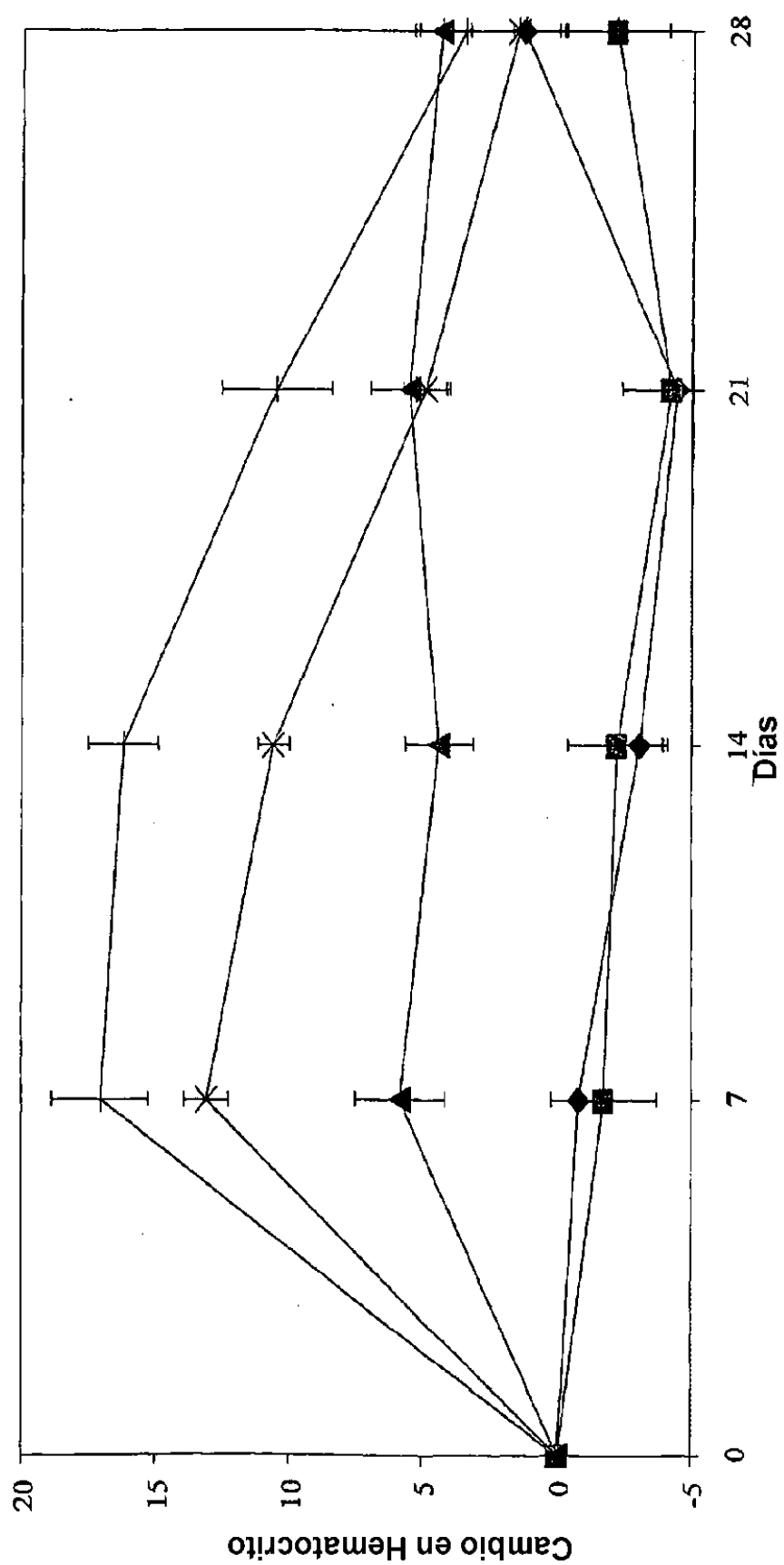


FIGURA 14

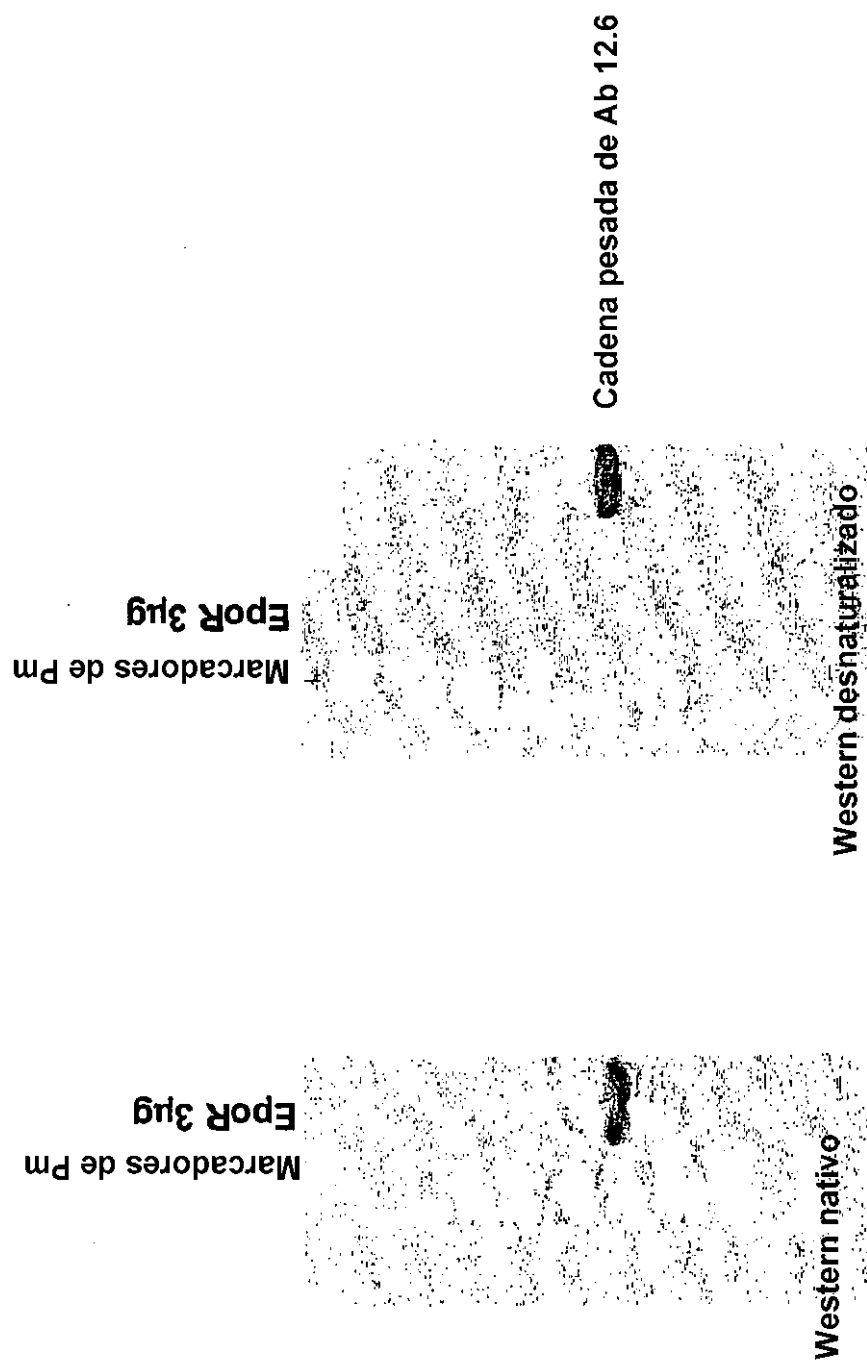


FIGURA 15

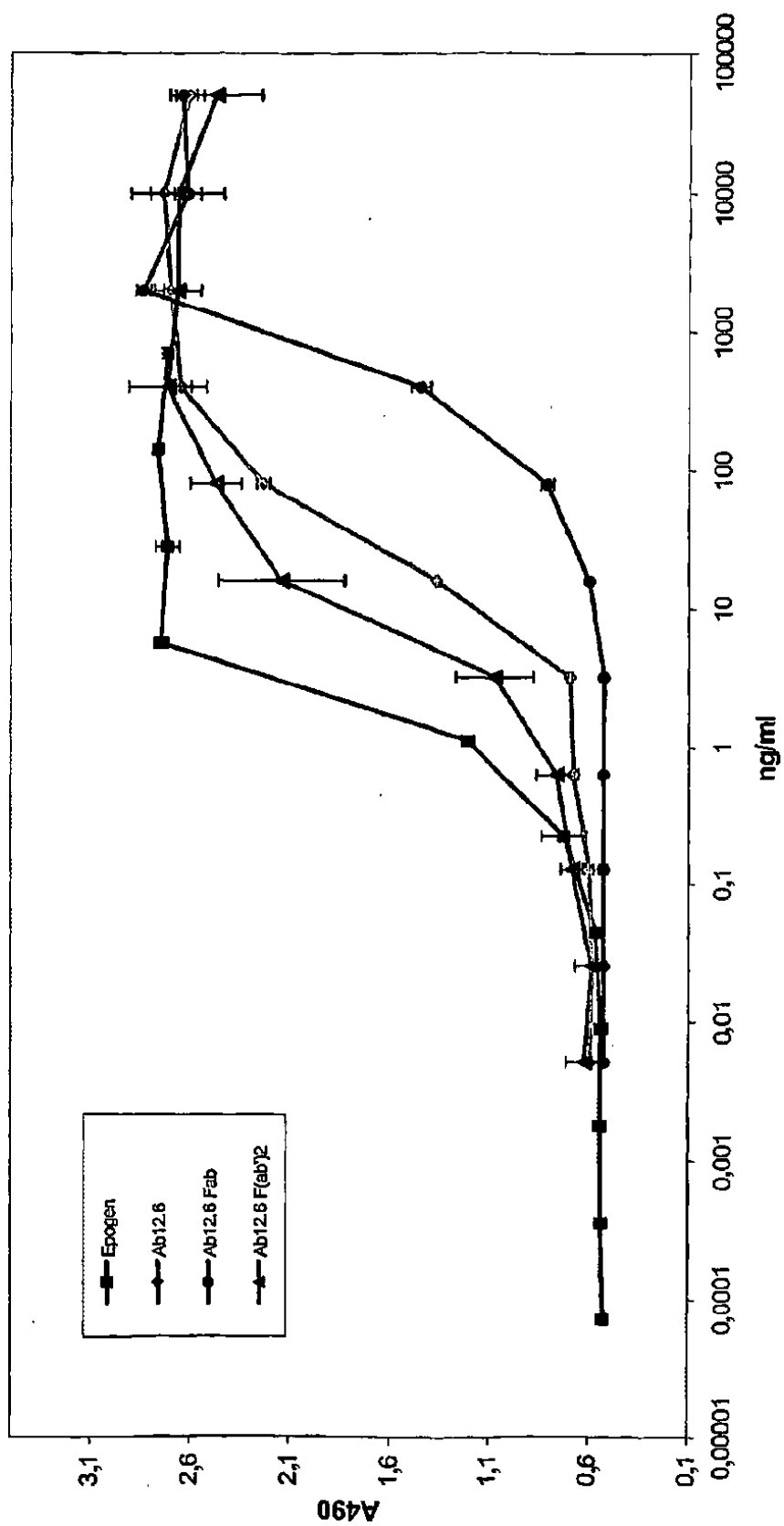


FIGURA 16