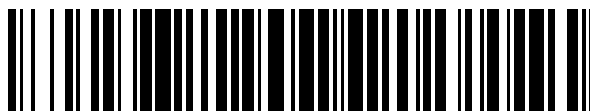


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 772**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/26** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08835406 .3**  
96 Fecha de presentación: **02.10.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2200647**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Anticuerpos específicos para la hepcidina humana**

30 Prioridad:  
**02.10.2007 EP 07291196**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.07.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR y  
Centre National de la Recherche Scientifique**

72 Inventor/es:  
**VAULONT, Sophie;  
GASCAN, Hugues y  
FROGER, Josy**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 385 772 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 específicos para la hepcidina humana

La presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de éstos que reconocen la forma madura de la hepcidina humana y a su uso para tratar y diagnosticar enfermedades asociadas con la hepcidina.

5 El hierro es un elemento esencial que se requiere para el crecimiento y supervivencia de casi todos los organismos. Por lo tanto, las alteraciones en el metabolismo del hierro se han implicado en varias enfermedades significativas de mamíferos, incluyendo, pero no limitadas a anemia por deficiencia de hierro, hemosiderosis o la enfermedad de sobrecarga de hierro hemocromatosis (PIETRANGELO, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282, G403-14, 2002; ANDREWS, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 1, 75-98, 2000; PHILPOTT, *Hepatology*, 35, 993-1001, 2002; ANDERSON y POWELL, *Int J Hematol*, 76, 203-7, 2002; BEUTLER *et al.*, *Drug Metab Dispos*, 29, 495-9, 2001).

10 La deficiencia de hierro es el trastorno nutricional más común en el mundo. Hasta 4-5 billones de personas (es decir, 65-80% de la población mundial) puede ser deficiente en hierro y 2 billones de personas (más del 30% de la población mundial, la mayor parte niños y mujeres con edad de tener niños) son anémicos, debido principalmente a deficiencia de hierro. La deficiencia de hierro afecta a más gente que ninguna otra afección, constituyendo una afección de salud pública de proporciones epidémicas.

15 En los mamíferos, el equilibrio del hierro está regulado principalmente al nivel de la absorción duodenal del hierro de la dieta. Después de la absorción, el hierro férrico se carga en apo-transferrina en la circulación y se transporta a los tejidos, incluyendo los precursores eritroides, donde es captado por endocitosis mediada por el receptor de la transferrina. Los macrófagos reticuloendoteliales juegan un papel principal en el reciclado del hierro de la degradación de la hemoglobina de los eritrocitos senescentes, mientras los hepatocitos contienen la mayor parte del almacenamiento del hierro del organismo en polímeros de ferritina. Existe un mecanismo de retroalimentación que aumenta la absorción del hierro en individuos que son deficientes en hierro, mientras la absorción del hierro se reduce en personas con sobrecarga de hierro. En la hemocromatosis hereditaria (HH), sin embargo, este mecanismo regulador parece que está alterado; a pesar de una sobrecarga de hierro, cantidades elevadas de hierro se absorben de la dieta y da lugar a la acumulación de hierro en exceso en órganos internos, lo que resulta en la disfunción y fallo orgánico. El mecanismo molecular por el que el intestino responde a las alteraciones de los requerimientos de hierro del cuerpo no se entiende bien. En este contexto se ha mostrado que la hepcidina, un péptido de mamíferos identificado recientemente (KRAUSE *et al.*, *FEBS Lett*, 480, 147-50, 2000; PARK *et al.*, *J Biol Chem*, 276, 7806-10, 2001), es un componente de señalización clave que regula la homeostasis del hierro (NICOLAS *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 4596-601, 2002).

20 La hepcidina regula la homeostasis del hierro uniéndose al exportador de hierro celular ferroportina y causando su internalización y degradación (NEMETH *et al.*, *Science*, 306, 2090-3, 2004). La consecuencia de la degradación de la ferroportina es la retención del hierro en las células y así una disminución del hierro circulante. Por este mecanismo, la hepcidina disminuye el flujo de salida del hierro desde los tejidos exportadores de hierro en el plasma y así reduce la absorción del hierro de la dieta, liberación del hierro reciclado de los macrófagos, liberación del hierro almacenado en los hepatocitos y transferencia del hierro a través de la placenta.

25 La hepcidina es un péptido pequeño rico en cisteína producido principalmente en el hígado. Esta molécula regula la absorción del hierro en el intestino e inhibe la liberación del hierro de los macrófagos. La hepcidina se aisló inicialmente de plasma y orina humanos como un péptido de 25 aminoácidos (aa) que presentaba una actividad antimicrobiana (KRAUSE *et al.*, *FEBS Lett*, 480, 147-50, 2000; PARK *et al.*, *J Biol Chem*, 276, 7806-10, 2001). Los ADNc de hepcidina que codifican un precursor de 83 aa en ratones y un precursor de 84 aa en rata y ser humano, incluyendo un péptido señal putativo de 24 aa, se identificaron posteriormente buscando genes específicos del hígado que estuvieran regulados por el hierro (PIGEON *et al.*, *J Biol Chem*, 276, 7811-9, 2001). La hepcidina humana se expresa como un prepropeptido de 84 aminoácidos que se procesa en el amino terminal en un precursor de 60 residuos de aminoácidos (prohepcidina) de aproximadamente 10 kDa, que se procesa adicionalmente en un péptido maduro de 25 aminoácidos (hepcidina-25) de aproximadamente 3 kDa. Además de la forma de 25 aminoácidos, también se detectaron formas de 20 y 22 aminoácidos truncadas en el N-terminal en orina (PARK *et al.*, *J Biol Chem*, 276, 7806-10, 2001). Sin embargo, estas variantes truncadas en N no parecen tener una función reguladora del hierro (RIVERA *et al.*, *Blood*, 106, 2196-9, 2005; NEMETH *et al.*, *Blood*, 107, 328-33, 2006). De acuerdo con esto, se admite generalmente que la hepcidina-25 es la forma bioactiva que es responsable principalmente del efecto hipoferrémico de la hepcidina.

30 La hepcidina es un regulador central de la homeostasis del hierro. La deficiencia en hepcidina juega un papel central en la mayor parte de los trastornos de sobrecarga de hierro y también se ha mostrado que el exceso de hepcidina está implicado en varias formas de anemia. Por ejemplo, Nicolas G, *et al* (2002) mostraron que la sobreexpresión de hepcidina resultaba en anemia grave en ratones transgénicos (NICOLAS *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 4596-601, 2002). Un estudio reciente indicó que la hepcidina es un mediador clave de anemia de inflamación (NEMETH *et al.*, *Blood*, 101, 2461-3, 2003). Además, una concentración anormalmente alta de hepcidina se ha indicado en anemia con diferentes etiologías, tales como anemia asociada con enfermedad renal (TOMOSUGI *et al.*, *Blood*, 108,

1381-7, 2006), anemia asociada con sepsis grave (KEMNA *et al.*, Blood, 106, 3268-70, 2005), anemia asociada con la enfermedad de Crohn (SEMRIN *et al.*, Inflamm Bowel Dis, 12, 1101-6, 2006) y anemia refractaria a hierro asociada con adenomas hepáticos (WEINSTEIN *et al.*, Blood, 100, 3776-81, 2002).

5 Debido a la implicación de la hepcidina en trastornos de homeostasis del hierro, se han propuesto varios ensayos para su detección y cuantificación en plasma u orina con vistas al diagnóstico y monitorización de estos trastornos.

10 Sin embargo, el desarrollo de reactivos inmunoquímicos se ha visto dificultado por la falta de disponibilidad de anticuerpos anti-hepcidina. Se ha descrito un ensayo inmunoquímico usando anticuerpos de conejo policlonales anti-hepcidina (NEMETH *et al.*, Blood, 101, 2461-3, 2003) pero éste sólo permite cuantificar la hepcidina en orina y no en plasma. También se han descrito antisueros de conejo producidos frente a los aa 28-47 (EG(1)-HepN y EG(2)-HepN) y los aa 70-84 (EG(1)-HepC) de prohepcidina (solicitud PCT WO 2004/058044; (KULAKSIZ *et al.*, Gut, 53, 735-43, 2004). Estos antisueros detectaron prohepcidina en suero humano; sin embargo, ninguno de ellos reconoció la hepcidina-25 bioactiva.

US 2007/224186 describe anticuerpos monoclonales producidos en ratones frente al péptido que abarca los residuos 74-81 de la pro-hepcidina humana.

15 Hasta ahora, no se ha descrito ningún anticuerpo capaz de reconocer la hepcidina-25 en suero y los únicos ensayos disponibles para la determinación de hepcidina-25 en suero se basan en espectrometría de masas (TOMOSUGI *et al.*, Blood, 108, 1381-7, 2006) (MURPHY *et al.*, Blood, 110, 1048-54, 2007).

20 Además, los anticuerpos que actúan como antagonistas de la hepcidina, es decir capaces de inhibir la unión de la hepcidina a ferroportina y la posterior internalización y degradación de la ferroportina, serían útiles en el tratamiento de afecciones que resultan de un exceso de hepcidina.

Así, los anticuerpos que reconocen la hepcidina-25 y que permiten su determinación en suero y que además son capaces de inhibir la unión de la hepcidina a la ferroportina parecen altamente deseables.

Los inventores han tenido ahora éxito en la obtención de dicho anticuerpo.

25 Este anticuerpo monoclonal, designado de aquí en adelante en la presente memoria "AN-LP1" es producido por el hibridoma depositado según los términos del Tratado de Budapest, en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia), el 14 de agosto, 2007, con el número de depósito I-3794.

30 Los inventores han clonado y secuenciado el dominio variable (VL) de la cadena ligera y el dominio variable (VH) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal AN-LP1. Los límites de las secuencias que codifican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo se han obtenido, clásicamente, mediante el alineamiento de estas secuencias VH y VL frente a la base de datos de referencia IMGT (LEFRANC *et al.*, Nucl. Acids Res., 33, Database issue D593-597, 2005), usando el programa de software IMGT/V-QUEST (GIUDICELLI *et al.*, Nucl. Acids Res., 32, Web Server issue W435-440, 2004). Estas secuencias se describen a continuación en la Tabla 1 (para la cadena pesada) y en la Tabla 2 (para la cadena ligera).

TABLA 1

Dominios mAb AN-LP1	Secuencia
VH	GAGGTACAGCTGGAGGAGTCTGGGGGAGGTTTGTAGTCAGCCT GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCATT TCAGTAGATATAGCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGAGAA GAGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTGATGGTGGTGGTAG CACCTACTCTCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTTCAGCATTTCC AGAGACAATGCCCAGAACACCCTTTACCTACAAATGAGCAGTC TGAAGTCTGAGGACACGGCCATATTTTACTGTGTAAGACATGC GCGATTAGAGGGATACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCTC GGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT (SEQ ID NO:1)
VH-CDR1	GGATTCACCTTTCAGTAGATATAGC (SEQ ID NO:2)
VH-CDR2	ATTAGTGATGGTGGTGGTAGCACC (SEQ ID NO:3)
VH-CDR3	GTAAGACATGCGCGATTAGAGGGATACTTCGATGTC (SEQ ID NO:4)

TABLA 2

Dominios mAb AN-LP1	Secuencia
VL	GACGTGTTGACGCGAGTCTCCAGCTTCTGTGGCTGTGTCTCTAG GGCAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTG ATAATTATGGCAATAGTTTTATGAACTGGTACCAGCAGAAACCA GGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCGTGATCCAACCTAG AATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTAGGA CAGACTTCACCCTCACCATTAATCCTGTGGAGGCTGATGATGT GCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGACGTTCCG GTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCAC CAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCT GGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCA AAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACA AAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGAC AGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCCAGGAC GAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGGCCACTCACA AGACATCAACCTCACCCATTGTCAAGAGCCTCAACAGGGGAAA GTGTTAG (SEQ ID NO:5)
VL-CDR1	GAAAGTGTGATAATTATGGCAATAGTTTT (SEQ ID NO:6)
VL-CDR2	CGTGCATCC (SEQ ID NO:7)
VL-CDR3	CAGCAAAGTAATGAGGATCCGACG (SEQ ID NO:8)

Un objeto de la presente invención es una proteína de unión a antígeno caracterizada porque es capaz de unir la hepcidina-25 humana y porque comprende la VH-CDR3 de la cadena pesada y la VL-CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo AN-LP1,

- 5 la VH-CDR1 de la cadena pesada y la VL-CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo AN-LP1, y la VH-CDR2 de la cadena pesada y la VL-CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo AN-LP1.

La VH-CDR3 y la VL-CDR3 de AN-LP1 están codificadas respectivamente por SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8. La VH-CDR1 y la VL-CDR1 de AN-LP1 están codificadas respectivamente por SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6. La VH-CDR2 y la VL-CDR2 de AN-LP1 están codificadas respectivamente por SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7.

- 10 Las proteínas de unión a antígeno de la invención engloban en particular:

- a) el anticuerpo monoclonal AN-LP1 producido por el hibridoma CNM I-3794;
- b) los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo AN-LP1;
- c) los anticuerpos quiméricos o humanizados obtenidos de AN-LP1;
- d) los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos c) anteriores.

- 15 A no ser que se especifique otra cosa, el término "hepcidina-25" en la presente memoria se refiere al polipéptido de hepcidina humano que tiene la secuencia siguiente: DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCKT (SEQ ID NO: 9).

Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad) de un anticuerpo son las partes de los dominios variables que están implicadas en la especificidad del reconocimiento del antígeno. Cada cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina tiene tres CDR, designadas VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 y VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, respectivamente.

- 5 Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo contienen los dominios variables que comprenden las CDR de dicho anticuerpo. Los fragmentos de unión a antígeno básicos incluyen Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>.

Los fragmentos Fv consisten en los dominios VL y VH de un anticuerpo asociados conjuntamente por interacciones hidrofóbicas; en los fragmentos dsFv, el heterodímero VH::VL está estabilizado por un puente disulfuro; en los fragmentos scFv, los dominios VL y VH están conectados entre sí mediante un conector peptídico flexible formando así una proteína de cadena única. Los fragmentos Fab se pueden obtener por digestión con papaína de un anticuerpo; comprenden la cadena L completa y aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H, unidos entre sí mediante un enlace disulfuro. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> puede producirse por digestión con pepsina de un anticuerpo; comprende dos fragmentos Fab y adicionalmente una parte de la región bisagra de la molécula de inmunoglobulina. Los fragmentos Fab' se pueden obtener a partir de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> cortando un enlace disulfuro en la región bisagra. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> son divalentes, es decir, comprenden dos sitios de unión a antígeno, como la molécula de inmunoglobulina nativa; por otra parte, los fragmentos Fv, dsFv, scFv, Fab y Fab' son monovalentes, es decir, comprenden un único sitio de unión a antígeno.

Estos fragmentos de unión a antígeno básicos pueden combinarse entre sí para obtener fragmentos de unión a antígeno multivalentes, tales como fragmentos divalentes, trivalentes o tetravalentes. Estos fragmentos de unión a antígeno multivalentes también son parte de la presente invención.

El término "anticuerpo quimérico" en la presente memoria se refiere a un anticuerpo modificado por ingeniería que tiene los dominios variables del anticuerpo monoclonal del que se obtiene y que tiene los dominios constantes de otro anticuerpo, preferiblemente de un anticuerpo humano.

El término "anticuerpo humanizado" en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que se ha modificado por ingeniería con el fin de reducir su inmunogenicidad, a la vez que retiene su especificidad de unión a antígeno reemplazando tanto como es posible de las secuencias murinas por sus equivalentes humanos. En los dominios variables, estos reemplazos de secuencias tienen generalmente como diana las regiones marco (FR), es decir, las secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR. Sin embargo, algunos métodos para humanizar anticuerpos implican reemplazos de secuencias en las CDR 1 y 2.

- 30 Los anticuerpos quiméricos y humanizados de la invención pueden pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina. Preferiblemente, pertenecerán a una subclase de la clase IgG tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Según una realización preferida de una proteína de unión a antígeno de la invención, ésta es capaz de inhibir la unión de hepcidina a ferroportina, inhibiendo de esta manera la degradación de la ferroportina.

La capacidad de inhibir la unión de hepcidina a ferroportina puede ensayarse fácilmente usando, por ejemplo, un ensayo *in vitro* que usa células que expresan ferroportina en su superficie. En presencia de hepcidina, la ferroportina se internaliza y degrada. En presencia de un inhibidor de la unión de hepcidina a ferroportina, la internalización y degradación de la ferroportina se reducen o suprimen. La evaluación del nivel de ferroportina permite determinar las propiedades inhibitorias.

40 Las proteínas de unión a antígeno según la invención pueden obtenerse por técnicas convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de unión a antígeno como Fv, Fab o F(ab')<sub>2</sub>, pueden obtenerse por digestión enzimática del anticuerpo completo.

Estos fragmentos así como otros fragmentos de unión a antígeno monovalentes y multivalentes, y los anticuerpos quiméricos o humanizados, también pueden prepararse por técnicas de ingeniería genética clásicas, tales como las descritas por SAMBROOK *et al.* [MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)].

Los polinucleótidos que codifican las regiones variables del anticuerpo AN-LP1 o las CDR de éste, pueden obtenerse, por ejemplo, clonando dichas regiones de una biblioteca de ADNc del hibridoma CNM I-3794. También pueden prepararse, completamente o parcialmente, por síntesis de ácido nucleico, tomando como base las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente memoria.

50 Los métodos para preparar fragmentos de unión a antígeno recombinantes, o anticuerpos quiméricos combinando las regiones variables de un anticuerpo con conectores apropiados, o con las regiones constantes de otro anticuerpo, son muy conocidos en sí mismos.

Los métodos para humanizar anticuerpos también son muy conocidos en la técnica y se describen por ejemplo por ROUTLEDGE *et al.* ["Reshaping antibodies for therapy", en Protein Engineering of Antibody Molecules for

Prophylactic and Therapeutic Applications in Man, 13-44, Academic Titles, Nottingham, Inglaterra (1993)] o por ROGUSKA *et al.* Protein Engineering, 9(10), 895-904, (1996)]. Estos métodos también pueden aplicarse a fragmentos de unión a antígeno, tales como scFv.

5 Como ejemplo, el método conocido como "modificación de superficie" consiste en reemplazar el conjunto de residuos de la superficie en los marcos de la región variable de un anticuerpo no humano con un conjunto humano de residuos de la superficie, mientras que el método conocido como injerto de CDR consiste en transferir las CDR de un anticuerpo no humano a las regiones marco de un anticuerpo humano. El injerto de CDR se completa generalmente por la optimización del marco, que consiste en el reemplazo de algunos residuos del marco humano, con el fin de optimizar la afinidad de unión.

10 La etapa de optimización del marco se ha simplificado recientemente por el uso de bibliotecas combinatorias (ROSOK *et al.* J. Biol. Chem. 271, 22611-22618, 1996; BACA *et al.* J. Biol. Chem. 272, 10678-10684, 1997).

Otra estrategia reciente para la humanización de anticuerpos conserva sólo las secuencias CDR3 no humanas originales de la cadena ligera y pesada mientras que la secuencia restante se selecciona de bibliotecas de gen V humano parental (RADER *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8910-8915, 1998).

15 Un contenido de la presente invención es también cualquier polinucleótido que codifica una proteína de unión a antígeno de la invención que comprende las CDR del anticuerpo AN-LP1 y también cualquier vector recombinante, en particular cualquier vector de expresión, que comprende dicho polinucleótido.

20 Un contenido de la presente invención es también cualquier célula que expresa una proteína de unión a antígeno según la invención que comprende las CDR del anticuerpo AN-LP1. Esto engloba en particular el hibridoma CNCM I-3794 y también cualquier célula huésped genéticamente transformada con un polinucleótido de la invención.

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ventajosamente, además de una secuencia que codifica una proteína de unión a antígeno según la invención, una secuencia que codifica un péptido señal que permita la secreción de dicha proteína. También pueden comprender una o más secuencias que codifican uno o más péptidos marcadores para detectar, y/o facilitar la purificación de, dicha proteína.

25 Los vectores de expresión según la invención comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a antígeno según la invención, asociada con elementos para controlar la transcripción y traducción que son activos en la célula huésped elegida. Hay una amplia variedad de vectores huésped, conocidos en sí mismos, que pueden usarse para construir vectores de expresión según la invención; la elección de un vector apropiado depende principalmente de la célula huésped que se pretende usar.

30 Las células huésped que pueden usarse en el contexto de la presente invención pueden ser células procariotas o eucariotas. Los ejemplos de células huésped eucariotas incluyen bacterias tales como *E. coli*. Entre las células eucariotas que pueden usarse, se hará mención en particular a células de plantas (en el caso de plantículos), células de levadura, tales como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, o *Pichia pastoris*, células de insecto, tales como células de *Drosophila* o *Spodoptera*, y células de mamífero tales como células HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, Heck 293, COS, etc.

35 La construcción de vectores de expresión según la invención y la transformación de las células huésped pueden realizarse por técnicas convencionales de biología molecular.

40 Un contenido de la invención es también un método para producir una proteína de unión a antígeno según la invención, caracterizado porque comprende cultivar al menos una célula según la invención, y recuperar dicha proteína de dicho cultivo.

Si la proteína se secreta, puede recuperarse directamente del medio de cultivo; si no, se realizará la lisis celular previamente.

45 La proteína puede purificarse entonces del medio de cultivo o del lisado celular, por procedimientos convencionales, conocidos en sí mismos para los expertos en la técnica, por ejemplo por precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.

50 Si se desea, las proteínas de unión a antígeno de la invención pueden modificarse adicionalmente con el fin, por ejemplo, de facilitar su detección, facilitar su administración in vivo, o aumentar sus propiedades terapéuticas. Como ejemplos no limitativos, pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva, un marcador de spin para formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN), o cualesquiera otros marcadores conocidos en la técnica, también pueden acoplarse con moléculas, tales como polietilén glicol, que prolongan su vida media en el plasma.

Un anticuerpo de la invención puede marcarse con una molécula radiactiva por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen, pero no están limitadas a, átomos radiactivos para estudios

escintigráficos tales como I123, I124, In111, Re186, Re188. Los anticuerpos de la invención también pueden marcarse con (también conocido como formación de imágenes de resonancia magnética, rmi), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso, o hierro.

5 Las proteínas de unión a antígeno de la invención pueden usarse para diagnosticar enfermedades relacionadas con la hepcidina.

En particular, pueden usarse para detectar hepcidina, y/o evaluar su cantidad en una muestra biológica, en particular muestras de sangre, orina, fluido amniótico, o biopsias de órganos. Por lo tanto, pueden usarse para diagnosticar todas las enfermedades asociadas con niveles anormales de hepcidina, ya estén asociados con exceso de hepcidina o deficiencia de hepcidina.

10 Un objeto de la invención es un método para detectar hepcidina, y/o evaluar su cantidad en una muestra biológica, en particular una muestra de suero o plasma, de un sujeto humano, en el que dicho método comprende poner en contacto dicha muestra con una proteína de unión a antígeno de la invención bajo condiciones que permitan la formación de un complejo inmune entre la hepcidina y dicha proteína de unión a antígeno, y detectar o medir el complejo inmune formado.

15 El complejo inmune formado puede detectarse o medirse por varios métodos usando técnicas estándar, incluyendo, como ejemplos no limitativos, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) u otros inmunoensayos de fase sólida, radioinmunoensayo, electroforesis, inmunofluorescencia o transferencia Western.

20 Un objeto adicional de la invención es un método para diagnosticar una enfermedad asociada con niveles anormales de hepcidina, en el que dicho método comprende evaluar la cantidad de hepcidina, como se ha indicado anteriormente, en una muestra biológica de un sujeto que se va a ensayar, y comparar la cantidad determinada con un valor control de hepcidina en un sujeto normal.

25 El método de la invención puede usarse para diagnosticar enfermedades asociadas con niveles excesivos de hepcidina, tales como anemia de enfermedad crónica, anemia de cáncer, y anemia de insuficiencia renal así como para diagnosticar enfermedades asociadas con niveles insuficientes de hepcidina, tales como anemias congénitas crónicas o anemia deficiente de hierro (hemorragia crónica, gastritis ulcerosa...) o con una deficiencia relativa o completa de hepcidina tal como hemocromatosis hereditaria.

30 La invención también proporciona kits que comprenden una proteína de unión a antígeno de la invención, asociada con uno o más dispositivos y/o reactivos para llevar a cabo un inmunoensayo. Por ejemplo, los kits de la invención pueden contener una proteína de unión a antígeno de la invención acoplada a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o lechos (por ejemplo, lechos de sefarosa) y reactivos para llevar a cabo un inmunoensayo.

35 Las proteínas de unión a antígeno de la invención, capaces de inhibir la unión de hepcidina a ferroportina, también pueden usarse como medicamentos. Son útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas con un exceso de hepcidina, en particular anemia de cáncer, anemia de insuficiencia renal y anemia de enfermedad crónica. La anemia de enfermedad crónica, también conocida como anemia de inflamación, es asimismo la anemia más frecuente en pacientes hospitalizados. Esta anemia normocítica a microcítica de leve a moderada se encuentra con una frecuencia entre 8% y 95% en pacientes que padecen enfermedades que están asociadas con la activación inmune crónica, tal como trastornos autoinmunes incluyendo artritis reumatoide y malignidades e infecciones crónicas incluyendo VIH.

40 La invención proporciona así un método para tratar anemia en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a antígeno de la invención, capaz de inhibir la unión de hepcidina a ferroportina.

45 Las afecciones que se pueden tratar con las proteínas de unión a antígeno de la presente invención incluyen por ejemplo anemia de enfermedad crónica, anemia asociada con una disminución o pérdida de función renal (fallo renal crónico), anemia asociada con terapia mielosupresora, tal como fármacos quimioterapéuticos o anti-virales (tales como AZT), anemia asociada con la progresión de cánceres no mieloides, anemia asociada con infecciones virales (tales como VIH), anemia en pacientes con enfermedad de Crohn, anemia con activación inmune crónica, anemia del anciano y anemia de lesión termal.

50 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión a antígeno de la invención. Las proteínas de unión a antígeno de la invención pueden administrarse por sí mismas, o mezcladas con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Pueden usarse sistémicamente o localmente. Una vía preferida de administración es la vía parenteral, incluyendo por ejemplo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas o intraperitoneales. La vía oral también puede usarse, siempre que el medicamento esté en una forma adecuada para administración oral, capaz de proteger el principio activo de las enzimas gástricas e intestinales.

La presente invención se ilustrará adicionalmente por la descripción adicional que sigue, que se refiere a ejemplos que describen el anticuerpo monoclonal AN -LP1. Debe entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan sólo como ilustración de la invención y no constituyen de ninguna forma una limitación de ésta.

#### **EJEMPLO 1: PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-HEPCIDINA AN-LP1:**

5 Las propiedades de unión a hepcidina de AN-LP1 producido por el hibridoma CNCM I-3794 se ensayaron por ELISA. Hepcidina-25 humana sintética se recubrió en cajas de 96 pocillos, con una concentración de 1-10 microgramos/ml en tampón carbonato 100 mM, pH 9,5. Una parte de los pocillos se recubre con un péptido irrelevante (PELAPVSSNLKYTLDC, SEQ ID NO: 10) para poder determinar el componente específico de la señal medida. Después de una noche de contacto, los pocillos se lavan 3 veces con una disolución de PBS/0,05%/tween  
10 20 y se saturan con una disolución de 0,1 M Tris 20%, sacarosa pH 7,8. Los sueros de ratón se añaden en duplicados, con diluciones seriadas de 10 veces. Después de una incubación de 6 h, los pocillos se lavaron tres veces con una disolución de PBS 0,05%, tween 20 y se añadió anticuerpo anti-ratón acoplado con peroxidasa (Biosource) diluido a 1/5.000 en PBS, 0,1% BSA, 0,01% Tween 20 durante 1h30-2h adicionales. La unión del anticuerpo se reveló usando ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] como sustrato, y la lectura se realizó a 405 nm.

Los resultados se ilustran por la Figura 1. Muestran que AN-LP1 se une específicamente a hepcidina-25 humana recubierta en los pocillos y que no se une al péptido control.

Las células del hibridoma CNCM I-3794, que producen el anticuerpo, se usaron para la producción de ascitis del anticuerpo AN-LP1. Los ratones se trataron con una inyección I.P. de 0,5 ml de pristano, 8 días antes de la inyección de  $10^7$  células de hibridoma. Dos semanas después, se extrajo el fluido de ascitis y el anticuerpo se purificó por la técnica de precipitación secuencial con ácido caprílico. El ácido caprílico precipita las proteínas con un peso molecular menor de 100-120 kDa. El precipitado se sedimentó por centrifugación, y las inmunoglobulinas presentes en el sobrenadante se precipitaron usando sulfato de amonio a una concentración final del 45% (p/v). Estas dos precipitaciones sucesivas hacen posible obtener, empezando a partir de 2 ratones, 30 miligramos de anticuerpo purificado.

La inmunoglobulina AN-LP1 secretada es una IgG1 Kappa. Los resultados del análisis por SDS-PAGE se presentan en la Figura 2. Estos resultados muestran que AN-LP1 presenta las características convencionales de IgG (cadena pesada 50 kDa, cadena ligera 25 kDa).

Se realizaron experimentos adicionales con el fin de caracterizar mejor el anticuerpo.

#### **30 1- Análisis de transferencia en mancha:**

Se usaron muestras de hepcidina humana sintética (100 a 500 ng) o hepcidina de ratón sintética (500 ng) (Peptide International, Louisville, KY, EEUU) o de 10 a 40  $\mu$ l de suero de un paciente con una enfermedad inflamatoria, o de un voluntario sano. En un experimento, una muestra de hepcidina humana sintética (500 ng) se trató con tampón Laemmli. Las muestras se pusieron en gotas directamente en la membrana de nitrocelulosa y se dejó que se secase toda la noche. Los sitios no específicos se bloquearon empapando la membrana en leche desnatada al 5% en TBS-T (1 h, a temperatura ambiente).

Los anticuerpos primarios (anticuerpo AN-LP1, o anticuerpo irrelevante HPC4 dirigido frente al epítipo EDQVDPRLIDGK (SEQ ID NO: 11) de la proteína C humana) se añadieron a una dilución de 1:200 de una disolución de 6 mg/ml. La incubación se realizó durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a +4°C.

40 Después de 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (1:5.000) durante 1 h a temperatura ambiente.

Las señales se visualizaron por quimioluminiscencia usando un reactivo ECL, seguido de autorradiografía.

Los resultados se presentan en la Figura 3. Estos resultados muestran:

- que el revelado de hepcidina con el anticuerpo AN-LP1 es específico (sin señal con el anticuerpo irrelevante HPC4)
- 45 - que el revelado de hepcidina con el anticuerpo AN-LP1 requiere la estructura nativa del péptido (sin señal cuando la muestra se trata con Laemmli)
- que el anticuerpo AN-LP1 no reacciona de manera cruzada con la hepcidina-25 murina;
- que la hepcidina de suero de las muestras humanas se reconoce bien por el anticuerpo AN-LP1.

#### **2- Análisis por transferencia Western**



Las muestras de hepcidina humana o de ratón sintética (Peptide International) se separaron en un gel Tricina Novex® al 16% en condiciones no reductoras y la transferencia se realizó en membrana PVDF durante 1 h a temperatura ambiente. Los sitios no específicos se bloquearon empapando la membrana en leche desnatada al 5% en TBS-T (2 h, temperatura ambiente).

- 5 La incubación con el anticuerpo primario (anticuerpo AN-LP1, 6 mg/ml, diluido a 1:100) se realizó toda la noche a +4°C.

Después de 3 lavados con TBS-T, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (1:5.000) durante 1 h a temperatura ambiente.

La señal se visualizó por quimioluminiscencia usando un reactivo ECL, seguido de autorradiografía.

- 10 Los resultados se presentan en la Figura 4. Estos resultados muestran que el anticuerpo AN-LP1 es eficaz para detectar la hepcidina humana en análisis de Transferencia Western revelando un producto del tamaño correcto (aproximadamente 3 kDa para el péptido de 25 AA) y una banda adicional que corresponde lo más probablemente a dímeros de hepcidina. Por el contrario, no se observó ninguna señal para la hepcidina de ratón, lo que confirma los resultados de los análisis de transferencia en mancha.

### 15 **3- Inmunohistoquímica:**

La inmunohistoquímica se realizó en hígado humano incluido en parafina. El anticuerpo AN-LP1 se usó a una dilución 1:50 toda la noche a +4°C. Después de incubar con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, las secciones se revelaron con diaminobencidina.

- 20 Los resultados se presentan en la Figura 5. Estos resultados muestran que el anticuerpo AN-LP1 es eficaz para revelar hepcidina en biopsias de hígado humanas.

### **EJEMPLO 2: PROPIEDADES FUNCIONALES DEL ANTICUERPO AN-LP1:**

- 25 Se desarrolló un ensayo de cribado para la actividad biológica de la hepcidina. Este ensayo se basa en la capacidad de la hepcidina de degradar el exportador de hierro, ferroportina. Consiste en incubar macrófagos (línea celular murina J774), que expresan ferroportina, en presencia de hepcidina durante unas pocas horas. Si la hepcidina es biológicamente activa, se unirá a ferroportina e inducirá su degradación.

Más específicamente:

Las células J774 se trataron toda la noche con 200 µM de hierro-NTA para inducir la producción de ferroportina. Se añadieron al cultivo celular hepcidina-25 sintética (100 nM) sola o unida a KLH (200 nM) o un péptido irrelevante unido a KLH (100 nM). Un cultivo sin péptido añadido se usó como control.

- 30 Después de incubar durante 5 h a 37°C, las células se lavaron y se lisaron. Se prepararon extractos de membrana y se analizaron por transferencia Western con anticuerpos anti-ferroportina. Los resultados se presentan en la Figura 6 A (Carril 1: control).

Estos resultados muestran que la hepcidina sola o unida a KLH induce la degradación de la ferroportina, mientras que el péptido irrelevante no tiene efecto.

- 35 El mismo experimento se repitió con hepcidina-25 sintética (100 nM) preincubada durante 1 hora a 37°C con 3 ó 30 µg de AN-LP1 o el anticuerpo irrelevante HPC4, antes de la adición al cultivo celular.

Los resultados se ilustran por las Figuras 6B (hepcidina preincubada con el anticuerpo irrelevante HPC4) y 6C (hepcidina preincubada con el anticuerpo AN-LP1) y 6D (efecto de concentraciones crecientes de AN-LP1).

- 40 Estos resultados muestran que mientras la hepcidina induce normalmente la degradación de la ferroportina en presencia del anticuerpo irrelevante, la unión del anticuerpo AN-LP1 a hepcidina neutraliza su acción, evitando así la internalización y la degradación de la ferroportina.

### **EJEMPLO 3: AFINIDAD DE LA INTERACCIÓN HEPCIDINA/AN-LP1**

#### **Inmovilización de los ligandos en las superficies de sensores**

- 45 Para estimar la constante de afinidad de AN-LP1 y las interacciones anticuerpo-antígeno, se realizaron medidas de resonancia de plasmón superficial (SPR) con un instrumento BIAcore 2000 usando chips CM5 de dextrano carboximetilado (BIAcore, Piscataway, NJ). El mAb AN-LP1, diluido a 2 µg/ml en tampón maleato 5 mM (pH 5,75), se inmovilizó en los chips CM5 por acoplamiento amina.

#### **Ensayos de unión y análisis de los datos**

5 La hepcidina se diluyó en tampón de corrida HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4; 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA y 0,005% polisorbato 20). El analito se inyectó en 3 min, inyecciones de 60  $\mu$ L/min, y la disociación se monitorizó durante 10 min. Se generaron Ab de superficie por una inyección de 30 s a 1 min de glicina-HCl 10 mM pH 2. Las constantes de la velocidad cinética se determinaron con anticuerpos purificados. Se inyectó hepcidina concentrada (0,39 nM a 12,5 nM) sobre la superficie del chip a una velocidad de 60  $\mu$ L/min para recoger datos de unión. Los análisis de los datos se realizaron con el software BIAevaluation 3.0.

Los resultados se muestran en la Figura 7. La concentración de hepcidina se indica para cada curva (Blk=blanco).

La constante de afinidad (Kd) de AN-LP1 es de  $9,9 \times 10^{-11}$  M.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) VAULONT, Sophie GASCAN, Hugues FROGER, Josy	
	<120> PROTEÍNAS DE UNIÓN A ANTÍGENO-QUE TIENEN ESPECIFICIDAD PARA HEPCIDINA HUMANA	
10	<130> MJP/mad-F598/101-WO	
	<150> EP 07 291 196.9	
	<151> 2007-10-02	
15	<160> 11	
	<170> PatentIn versión 3.3	
20	<210> 1	
	<211> 383	
	<212> DNA	
	<213> Mus musculus	
	<400> 1	
	gaggtacagc tggaggagtc tgggggaggt ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc	60
	tctctgtcag cctctggatt cactttcagt agatatagca tgtcttgggt tcgccagact	120
	ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatac attagtgatg gtggtggtag cacctactct	180
	ccagacactg taaagggccg attcagcatt tccagagaca atgcccagaa caccctttac	240
	ctacaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acggccatat tttactgtgt aagacatgcg	300
	cgattagagg gatacttcga tgtctggggc gcagggacct cggtcaccgt ctctcagcc	360
25	aaaacgacac cccatctgtc tat	383
	<210> 2	
	<211> 24	
30	<212> DNA	
	<213> ""	
	<400> 2	
	ggattcactt tcagtagata tagc	24
35	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Mus musculus	
40	<400> 3	
	attagtgatg gtggtggtag cacc	24
	<210> 4	
45	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> Mus musculus	
	<400> 4	
50	gtaagacatg cgcgattaga gggatacttc gatgtc	36
	<210> 5	

ES 2 385 772 T3

<211> 651  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

5 <400> 5  
 gacgtgttga cgcagtetcc agcttctgtg gctgtgtctc tagggcagag ggccaccata 60  
 tcctgcagag ccagtgaaag tgttgataat tatggcaata gttttatgaa ctggtaccag 120  
 cagaaaccag gacagccacc caaactcctc atctatcgtg catccaacct agaatctggg 180  
 atccctgccca ggttcagtgg cagtgggtct aggacagact tcaccctcac cattaatcct 240  
 gtggaggctg atgatgttgc aacctattac tgtcagcaaa gtaatgagga tccgacgttc 300  
 ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 360  
 ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tcgtgtgctt cttgaacaac 420  
 ttctacccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc 480  
 gtcctgaaca gttggactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gagcagcacc 540  
 ctcacgttga cccaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac 600  
 aagacatcaa cctcaccat tgtcaagagc ctcaacaggg gaaagtgtta g 651 ,

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

10 <400> 6  
 gaaagtgtg ataattatgg caatagtttt 30

15 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

20 <400> 7  
 cgtgcatcc 9

25 <210> 8  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

30 <400> 8  
 cagcaaagta atgaggatcc gacg 24

35 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 385 772 T3

<400> 9

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg  
1                    5                    10                    15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr  
                  20                    25

<210> 10

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

10

Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asn Leu Lys Tyr Thr Leu Asp Cys  
1                    5                    10                    15

<210> 11

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys  
1                    5                    10

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína de unión a antígeno caracterizada porque es capaz de unir hepcidina-25 humana, y porque comprende la VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 de la cadena pesada y la VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo AN-LP1 producidas por el hibridoma CNCM I-3794 y codificadas por las SEQ ID NOs 2-4 y 6-8, respectivamente.
2. Una proteína de unión a antígeno según la reivindicación 1, caracterizada porque se selecciona entre:
- a) el anticuerpo monoclonal AN-LP1 producido por el hibridoma CNCM I-3794;
  - b) los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo AN-LP1;
  - c) los anticuerpos quiméricos o humanizados obtenidos de AN-LP1;
  - 10 d) los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos c) anteriores.
3. Una proteína de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque es capaz de inhibir la unión de hepcidina a ferroportina.
4. Un polinucleótido que codifica una proteína de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la reivindicación 4.
- 15 6. Una célula que expresa una proteína de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Una célula de la reivindicación 6, que es el hibridoma CNCM I-3794.
8. Una célula de la reivindicación 6, que es una célula huésped transformada con un vector de expresión de la reivindicación 5.
- 20 9. Un método para preparar una proteína de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende cultivar al menos una célula según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 y recuperar dicha proteína de dicho cultivo.
10. El uso de una proteína de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para detectar hepcidina en una muestra biológica.
- 25 11. El uso de una proteína de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el diagnóstico in vitro de una enfermedad asociada con niveles anormales de hepcidina.
12. Una proteína de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como un medicamento.

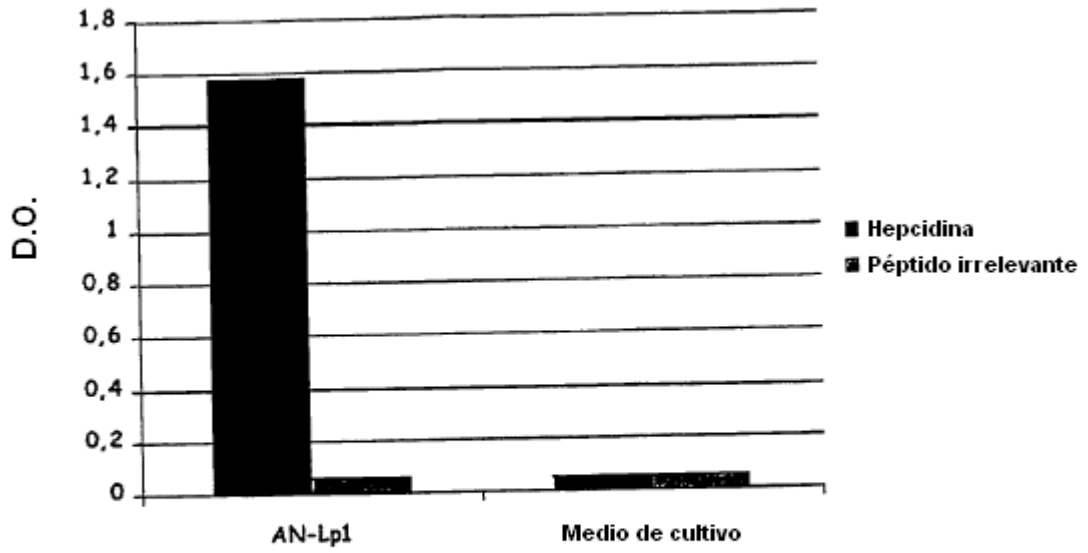


Figura 1

Gel de acrilamida  
Tinción con Azul de Coomassie

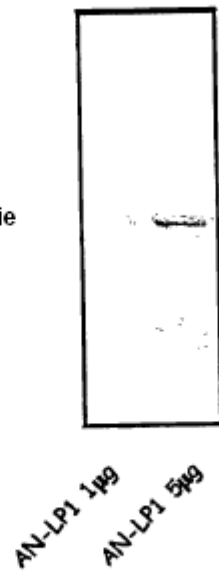


Figura 2

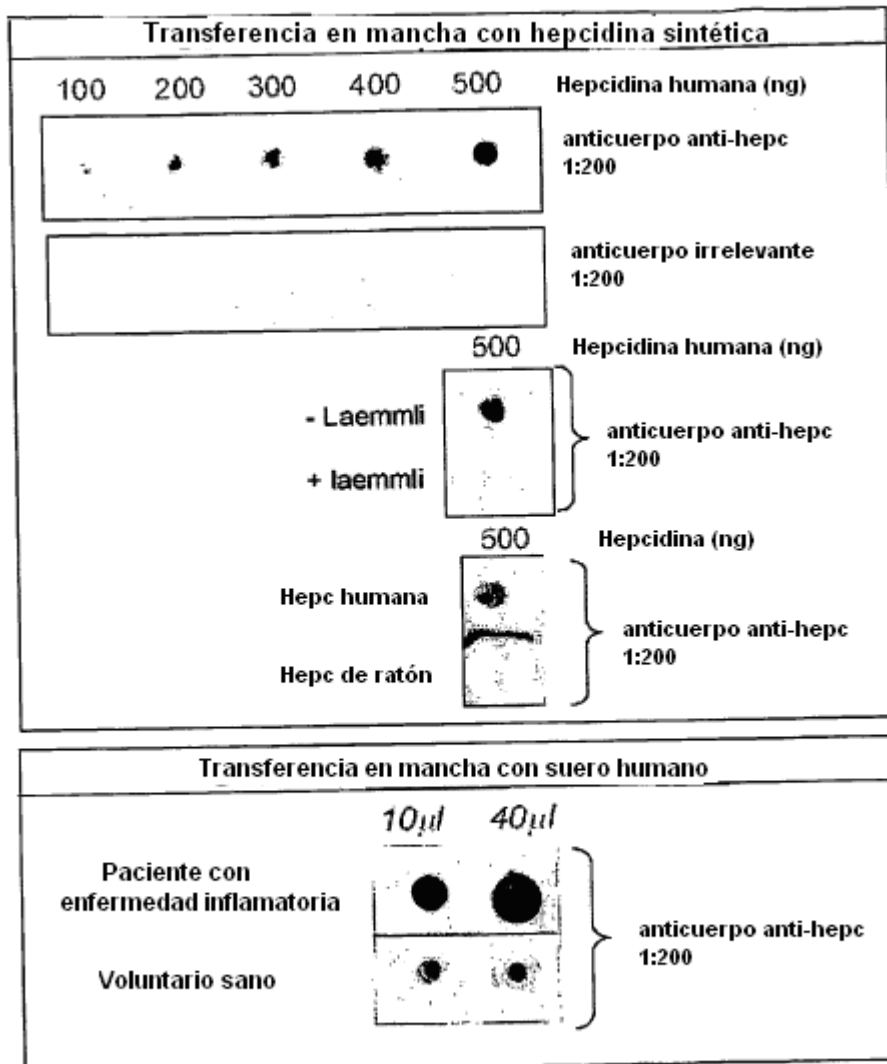


Figura 3



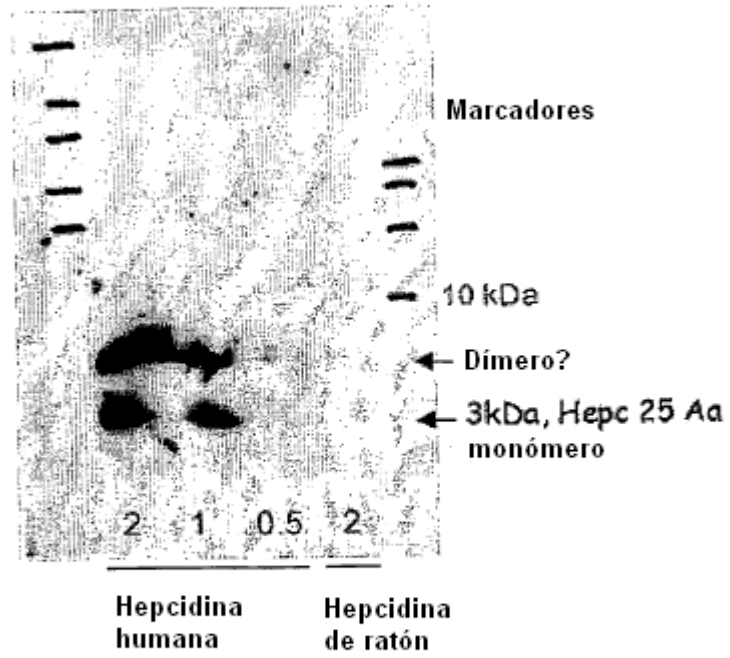
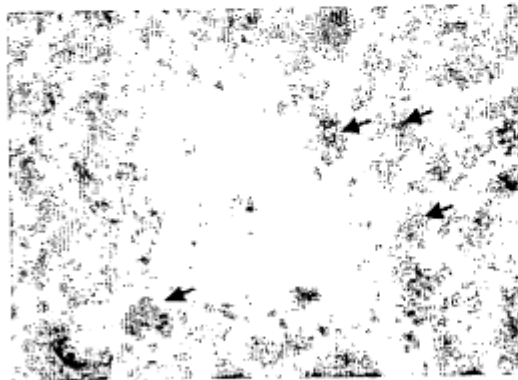


Figura 4



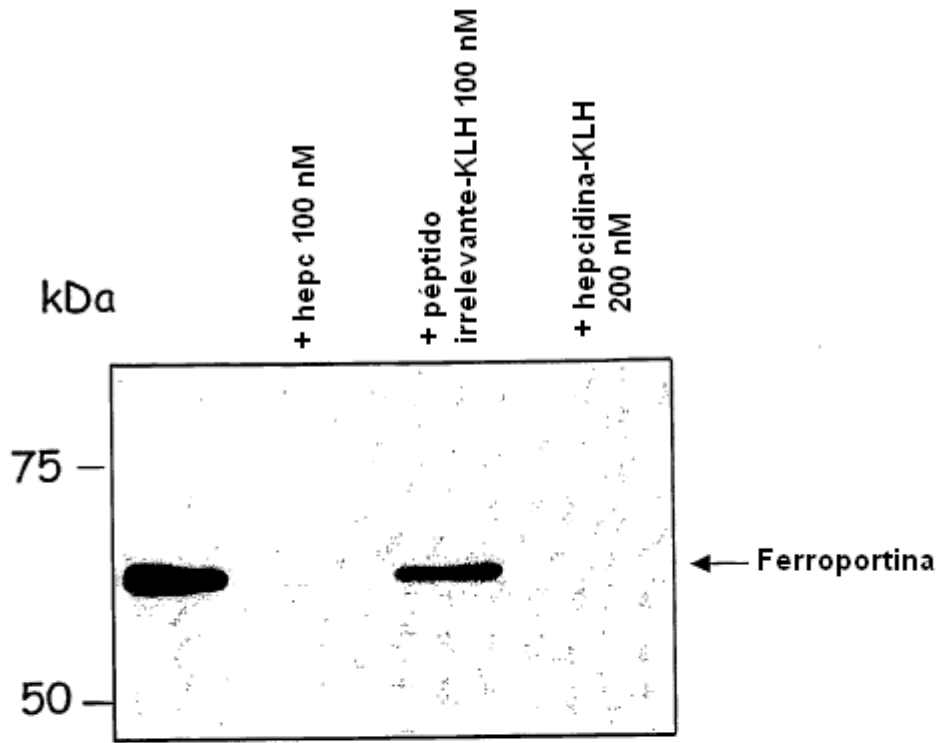
**Control:**

**Sin anticuerpo  
primario  
antihepcidina**



**Detección  
de hepcidina  
en hepatocitos**

**Figura 5**



A

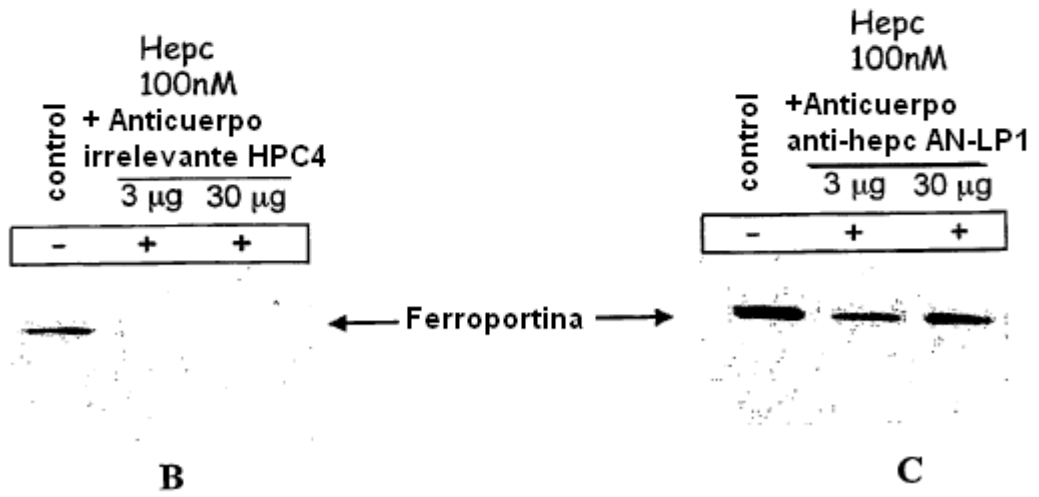
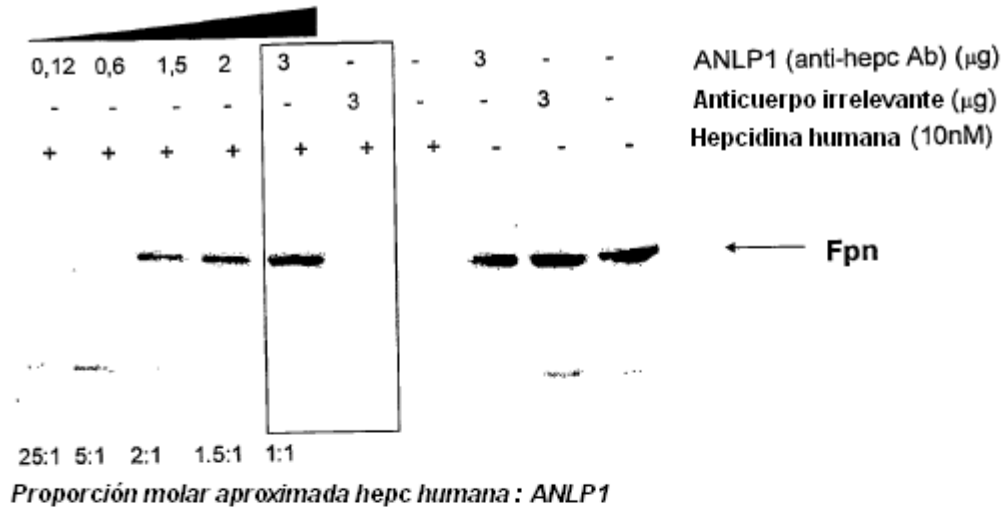


Figura 6



**D**

Figura 6 (continuación)

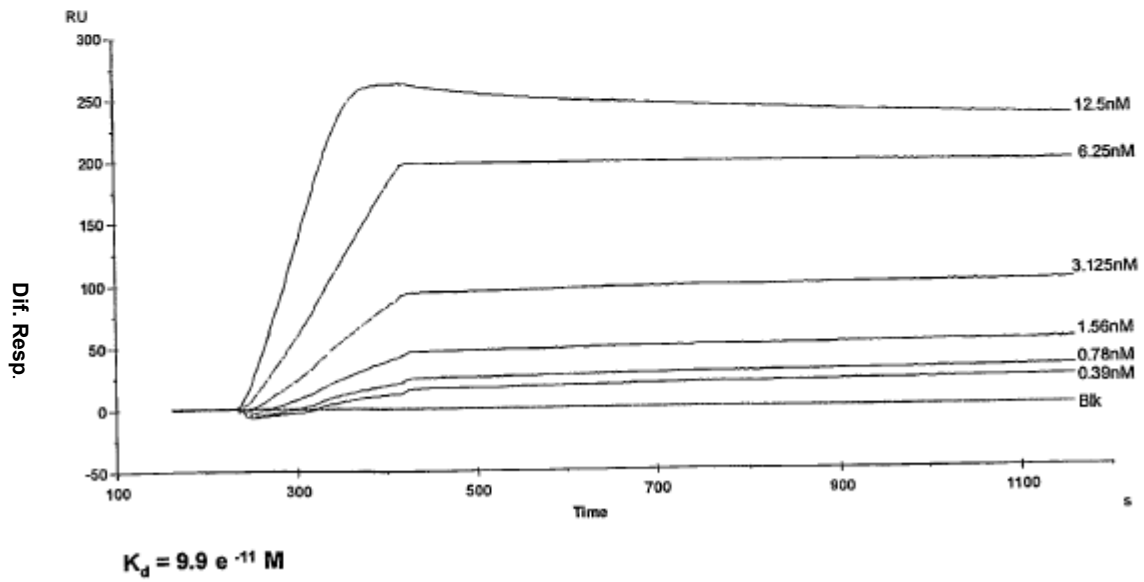


Figura 7