

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 018**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/26** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2009 E 09790908 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2328931**

54 Título: **Anticuerpos selectivos anti-hepcidina-25 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**06.08.2008 US 86557 P**

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

**29.11.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEUNG, DONMIENNE DOEN MUN;  
LUAN, PENG;  
TANG, YING;  
WITCHER, DERRICK RYAN y  
YACHI, PIA PAULIINA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 432 018 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 selectivos anti-hepcidina-25 y usos de los mismos

5 La presente invención se encuentra en el campo de la medicina, particularmente en el sector de los anticuerpos contra hepcidina-25 humana. Más específicamente, la presente invención se refiere al tratamiento de determinadas enfermedades, tales como anemia, mediante la administración de anticuerpos selectivos anti-hepcidina-25 a pacientes con necesidad de ello. La presente divulgación se refiere además a procedimientos y a kits para detectar hepcidina-25 y/o diagnosticar una afección patológica caracterizada por niveles elevados de hepcidina-25.

10 Se cree que la hepcidina humana, un polipéptido expresado predominantemente por hepatocitos, es una proteína reguladora de hierro importante que regula negativamente la absorción de hierro en el intestino, el reciclaje de hierro por macrófagos y la movilización de hierro a partir de reservas de hierro hepáticos. Parece que la sobreproducción de hepcidina tiene un papel principal en la patofisiología de anemia y/o de anemia de enfermedad crónica.

15 Actualmente, las terapias adecuadas y eficaces contra la anemia y/o contra la anemia por enfermedad crónica son limitadas. Específicamente, la administración de eritropoyetina es eficaz en solo aproximadamente el 50 % de todos los pacientes y está asociada con efectos secundarios no deseados. Además, las transfusiones no son deseables debido a la contaminación, infección y sobrecarga de hierro.

20 La hepcidina humana está codificada como un prepro péptido de 84 aminoácidos que contiene una secuencia señal dirigida al retículo endoplasmático N-terminal de 24 aminoácidos típica y una proregión de 35 aminoácidos con un sitio de escisión de furina consenso seguido inmediatamente por una hormona reguladora de hierro bioactiva C-terminal de 25 aminoácidos (hepcidina-25, SEC ID N°: 1). También se sabe que diversas formas truncadas N-terminales de hepcidina, tales como hepcidina-20 (por ejemplo, para seres humanos, aminoácidos 6-25 de la SEC ID N°: 1) y hepcidina-22 (por ejemplo, para seres humanos, aminoácidos 4-25 de la SEC ID N°: 1) se forman *in vivo*. No obstante, se piensa que la hepcidina-25 es la forma más relevante fisiológicamente de hepcidina en seres humanos, si no la única. Las terapias que regulan selectivamente la concentración de hepcidina-25, a diferencia de las formas de precursor o truncadas, son particularmente deseables. En particular, los anticuerpos que se unen selectivamente a la hepcidina-25, a diferencia de las formas de precursor y truncadas, proporcionarían numerosas ventajas en el tratamiento o diagnóstico de trastornos asociados con niveles elevados de hepcidina-25. Por ejemplo, en comparación con anticuerpos de hepcidina no selectivos, los anticuerpos selectivos de hepcidina-25 con afinidad elevada reducirían el riesgo de efectos secundarios y la dosis clínica requerida para el tratamiento eficaz sería inferior debido a que los anticuerpos terapéuticos no se unirían a formas fisiológicamente irrelevantes de hepcidina. Aunque se ha informado previamente de anticuerpos policlonales y monoclonales no humanos de hepcidina (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos 2006/0019339, 2007/0224186 y 2008/0213277), existe todavía en la técnica una gran necesidad de anticuerpos monoclonales que se unan selectivamente a hepcidina-25. Por la tanto, un aspecto de la invención es proporcionar anticuerpos que se unan selectivamente a hepcidina-25 dentro de los aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepcidina-25. Dichos anticuerpos son útiles para aumentar niveles de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito en un ser humano para el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno tal como anemia.

40 Adicionalmente, los inmunoensayos existentes para determinar hepcidina no diferencian la hepcidina-25 fisiológicamente relevante, activa, de las especies de hepcidina fisiológicamente no relevantes, inactivas, (véanse, por ejemplo, Kemna, E.H. y col., Haematologica, 93(1):90-7 (2008); Roe M.A. y col., Br J Nutr., 97:544-9 (2007); y Luukkonen S. y Punnonen K., Clin Chem Lab Med., 44:1361-2 (2006)). Actualmente, el único procedimiento disponible actualmente para el ensayo selectivo de hepcidina-25 implica una CL/EM (cromatografía líquida/espectroscopia de masas) o procedimientos engorrosos similares que requieren la separación de las diversas formas de hepcidina (véanse, por ejemplo, Gutierrez, J.A. y col., BioTechniques, 38:S13-S17 (2005), Murphy y col., Blood, 110:1048-54 (2007), y Kemna, E.H. y col., Clin. Chem., 53:620-8 (2007)). Aunque estos ensayos pueden ser precisos y exactos, su complejidad, coste y el alto nivel de experiencia exigido al operador impiden su realización rutinaria. En consecuencia, existe también una gran necesidad de anticuerpos que se unan selectivamente con alta afinidad a hepcidina-25 humana para su aplicación en inmunoensayos para la detección o medición de hepcidina-25. Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona procedimientos de uso de anticuerpos selectivos de hepcidina-25 en inmunoensayos selectivos, sólidos, relativamente sencillos, pero muy sensibles, para la detección y medición de hepcidina-25 en tejidos y fluidos biológicos de mamíferos.

50 El documento US 2006/0019339 pretende divulgar anticuerpos que se unen a hepcidina y procedimientos de uso de esos anticuerpos.

El documento US 2007/0224186 pretende divulgar anticuerpos que se unen al extremo C-terminal de hepcidina humana y procedimientos de uso de esos anticuerpos.

55 La presente invención proporciona anticuerpos que se unen selectivamente a hepcidina-25 humana dentro de los aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepcidina-25. En una realización, un anticuerpo de la invención se une selectivamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 1, a diferencia de los precursores y polipéptidos truncados relacionados, y comprende seis CDR seleccionadas del grupo

que consiste en: (i) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 9, 10, 11, 32, 33 y 34, respectivamente; (ii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 12, 13, 14, 35, 36 y 37, respectivamente; (iii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 45, 13, 14, 35, 36 y 37, respectivamente; (iv) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 12, 13, 14, 38, 36 y 37, respectivamente; (v) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 15, 10, 16, 39, 40 y 41, respectivamente; (vi) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 22, 42, 43 y 44, respectivamente; (vii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 23, 42, 43 y 44, respectivamente; (viii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 24, 25, 23, 42, 43 y 44, respectivamente; (ix) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 27, 42, 43 y 44, respectivamente; (x) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 28, 42, 43 y 44, respectivamente; (xi) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 6, 7, 8, 29, 30 y 31 respectivamente; (xii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 17, 18, 19, 42, 43 y 44, respectivamente.

En otra realización, un anticuerpo de la invención se une a un epítipo contenido dentro de los aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepcidina-25 humana, es decir, DTHFPIC de SEC ID N°: 1 o DTNFPIC de hepcidina-25 de roedor (SEC ID N°: 2 o 3). Preferentemente, el anticuerpo de la invención comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera ("LCVR") y un polipéptido de región variable de cadena pesada ("HCVR") en los que (i) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N°: 48 y 49, respectivamente; (ii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 50 y 51, respectivamente; (iii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 52 y 51, respectivamente; (iv) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 53 y 54, respectivamente; (v) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 55 y 56, respectivamente; (vi) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 59 y 58, respectivamente; (vii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 60 y 58, respectivamente; (viii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 61 y 58, respectivamente; (ix) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 62 y 58, respectivamente; (x) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 63 y 58, respectivamente.

En otra realización, la divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican anticuerpos de la invención; vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención, opcionalmente, unidos operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; células huésped que comprenden vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención; un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención que comprende cultivar células huésped que comprenden vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención de modo que se exprese el ácido nucleico y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo a partir del medio de cultivo de la célula huésped.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende una población homogénea o sustancialmente homogénea de un anticuerpo monoclonal de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para usar en terapia.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para usar en el tratamiento o la prevención de anemia.

La invención también abarca un anticuerpo de la invención para usar en el aumento de niveles de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito en un animal, preferentemente una especie de mamífero, más preferentemente un sujeto humano.

Otra realización de la divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno en un sujeto humano que produce el beneficio de un aumento de niveles de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito, incluidos, pero sin limitación, anemia, por ejemplo anemia consecuencia de una infección, inflamación, enfermedad crónica y/o cáncer.

La divulgación también proporciona un procedimiento para medir la cantidad de hepcidina-25 en una muestra de

tejido o fluido biológico obtenido de un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de; (i) obtener una muestra de tejido o de fluido biológico de dicho mamífero; (ii) poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo selectivo de hepcidina-25 o fragmento del mismo y (iii) detectar la cantidad de hepcidina-25 en dicha muestra directa o indirectamente por medios cuantitativos, semicuantitativos o cualitativos.

5 En otra realización, la invención proporciona un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 14.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 representa un espectro de masas MALDI-TOF de las formas de hepcidina humana inmunoprecipitada a partir de sueros humanos con el Mab 3.23 selectivo anti-hepcidina-25. La señal 1 tiene una masa que es coherente con la masa esperada de hepcidina-25 humana intacta (peso molecular (PM) aproximado de 2790 daltons (Da)). La señal 2 tiene una masa que es coherente con la masa esperada de hepcidina-20 humana intacta (PM de 2192 Da). Tal como muestra el cromatograma, el Mab 3.23 anti-hepcidina-25 se une a cantidades detectables de hepcidina-25, y en mucha menor medida a cantidades de hepcidina-20. No parecía que el Mab 3.23 se uniera a niveles detectables de hepcidina-22 (PM: 2436 Da), hepcidina-24 (PM: 2674 Da) o prohepcidina (PM: 6929 Da). El espectro de masas se generó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF usando un procedimiento de modo lineal, de ión positivo con ácido  $\alpha$ -ciano4-hidroxicinámico (matriz peptídica) como matriz de muestra, esencialmente tal como se describe en el ejemplo 6 más adelante.

La figura 2 representa una vista aumentada del espectro de masas mostrado en la figura 1 en una región relevante (PM: 2000-3000 Da). Tal como muestra el cromatograma, el Mab 3.23 está unido a hepcidina-25 (señal 1) y en mucha menor medida a hepcidina-20 (señal 2). El Mab 3.23 selectivo anti-hepcidina no parecía que estuviera unido a niveles detectable de hepcidina-22 (PM: 2436 Da) o hepcidina-24 (PM: 2674 Da).

La figura 3 representa un espectro de masas MALDI-TOF de las formas de hepcidina humana inmunoprecipitada de sueros humanos con el Mab 5E8 selectivo anti-hepcidina-25. La señal 1 tiene una masa que es coherente con la masa esperada de hepcidina-25 humana intacta (2790 Da). Tal como muestra el cromatograma, el Mab 5E8 anti-hepcidina-25 está unido solo a cantidades detectables de hepcidina-25. El espectro de masas se generó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF usando un procedimiento de modo lineal, de ión positivo con ácido  $\alpha$ -ciano4-hidroxicinámico (matriz peptídica) como matriz de muestra, esencialmente tal como se describe en el ejemplo 6 más adelante.

La figura 4 representa una vista agrandada del espectro de masas mostrado en la figura 1 en una región relevante (PM: 2000-3000 Da). Tal como muestra el cromatograma, el Mab 5E8 está unido a cantidades detectables de hepcidina-25 (Señal 1). El Mab 5E8 no se ha unido a niveles detectables de hepcidina-20 (PM de 2192 Da), hepcidina-22 (PM: 2436 Da), hepcidina-24 (PM: 2674 Da) o pro-hepcidina (PM: 6929 Da).

La figura 5 muestra un gráfico de una curva de calibración para hepcidina-25 generada por hepcidina-25 sintetizada por dilución seriada (círculos negros) partiendo de una concentración de 10  $\mu\text{g/l}$  (10  $\text{ng/ml}$ ) y conduciendo el inmunoensayo MSD tal como se describe en el ejemplo 8. El inmunoensayo MSD era específico para hepcidina-25 y no reconoció la hepcidina-20 (triángulos negros) o hepcidina-22 (círculos blancos).

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas: ACN: acetonitrilo, BSA: albúmina de suero bovino, DTT: ditiotreitól, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima, IMAC: cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, IPTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido, Mab: anticuerpo monoclonal, MALDI-TOF: ionización/desorción por láser asociada a matriz y tiempo de vuelo, PBS: solución salina tamponada con fosfato, SPR: resonancia de plasmón superficial, TFA: ácido trifluoroacético. Todas las abreviaturas de aminoácidos usadas en la presente divulgación son las aceptadas por la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos tal como se exponen en 37 C.F.R. párrafo 1.R22 (B)(2).

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen selectivamente a hepcidina-25 dirigiéndose a un epítipo contenido dentro de los aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepcidina-25. Dichos anticuerpos son útiles para aumentar niveles de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito en un ser humano para el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno tal como anemia. Además, la presente invención proporciona procedimientos de uso de dichos anticuerpos en inmunoensayos relativamente sencillos pero muy sensibles y selectivos para la detección y/o la medición de hepcidina-25 en tejidos y fluidos biológicos de mamíferos.

Cuando se usa el presente documento, el término hepcidina se refiere a cualquier forma de la proteína hepcidina que se sabe que está presente en mamíferos. Cuando se usa el presente documento, la expresión "hepcidina madura" se refiere a cualquier forma madura bioactiva de la proteína hepcidina expresada en mamíferos. Cuando se usa el presente documento, la expresión "hepcidina humana" se refiere a cualquier forma de la proteína hepcidina presente en seres humanos. Cuando se usa en el presente documento, la frase "hepcidina-25 humana" se refiere a la forma madura de hepcidina humana que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 1.

La estructura general de un anticuerpo es muy bien conocida en la técnica. Para un anticuerpo del tipo IgG, existen cuatro cadenas de aminoácidos (dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras") que están entrecruzadas mediante

enlaces disulfuro intracatenarios e intercatenarios. Cuando se expresan en determinados sistemas biológicos, los anticuerpos que tienen secuencias de Fc humanas no modificadas se glicosilan en la región Fc. Los anticuerpos también pueden glicosilarse en otras posiciones. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de los anticuerpos son bien conocidas en la técnica. Cada cadena pesada está constituida por una región variable de cadena pesada ("HCVR") N-terminal y una región constante de cadena pesada ("HCCR"). La región constante de cadena pesada está constituida por tres dominios (CH1, CH2 y CH3) para IgG, IgD e IgA; y de 4 dominios (CH1, CH2, CH3 y CH4) para IgM e IgE. Cada cadena ligera está constituida por una región variable de cadena ligera (en el presente documento "LCVR") y una región constante de cadena ligera ("LCCR").

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forma un sitio de unión del anticuerpo. Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas entre regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada HCVR y cada LCVR está constituida por tres CDR y cuatro FR, dispuestas partiendo del extremo amino terminal hacia el extremo carboxi terminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En el presente documento, las tres CDR de la cadena pesada se denominan "CDRH1, CDRH2 y CDRH3" y las tres CDR de la cadena ligera se denominan "CDRL1, CDRL2 y CDRL3". Las CDR contienen la mayor parte de los restos que forman interacciones específicas con el antígeno. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con convenciones bien conocidas (por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Los anticuerpos de la presente invención pueden tener una región constante de cadena pesada seleccionada de cualquiera de las clases de inmunoglobulina (IgA, IgD, IgG, IgM e IgE). Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención contienen una región constante que está derivada de la región Fc de IgG humana o de ratón.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de una única copia o clon, lo que incluye, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o fágico, y no al procedimiento con el que se produce. Preferentemente, un anticuerpo monoclonal de la invención está presente en una población homogénea o sustancialmente homogénea.

Un anticuerpo de la presente invención puede estar intacto, es decir, comprende las regiones constantes de longitud total o completa, incluida la región Fc, o una porción o fragmento de dicho anticuerpo siempre que cualquier forma acortada comprenda la porción de unión a antígeno y mantenga su capacidad de unión a antígeno. Dichas formas acortadas incluyen, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que incluye las CDR o las regiones variables de los anticuerpos selectivos de anti-hepcidina-25 divulgados. Además, dichas formas de anticuerpos acortadas pueden ser un fragmento monocatenario de Fv que puede producirse mediante unión del ADN que codifica la LCVR y la HCVR con una secuencia enlazadora. (Véase, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore ed., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315, 1994). Independientemente de si se especifican fragmentos o porciones, el término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, incluye dichos fragmentos o porciones, así como formas monocatenarias, a menos que se indique lo contrario. Siempre que la porción de proteína o fragmento de proteína mantenga la capacidad para unirse selectivamente a hepcidina-25 y neutralice uno o más bioactividades características de la hepcidina-25 de mamífero *in vivo* o *in vitro*, está incluida dentro del término "anticuerpo".

Los anticuerpos de la invención pueden producirse usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación en fagos, tecnologías de síntesis o combinaciones de dichas tecnologías u otras tecnologías conocidas ya en la técnica (véanse, por ejemplo, Jayasena, S.D., *Clin. Chem.*, 45:1628-50 (1999) y Fellouse, F.A., y col., *J. Mol. Biol.*, 373(4):924-40 (2007)).

Las tablas 1 y 2 siguientes representan CDR para los anticuerpos de la presente invención.

Tabla 1

Fab	LCDR1	LCDR2	LCDR3
<b>Consenso 1</b>	SASSSX <sub>1</sub> SX <sub>2</sub> MY (SEC ID N°: 6)	LTSX <sub>3</sub> LAS (SEC ID N°: 7)	QQWSSX <sub>4</sub> PPT (SEC ID N°: 8)
<b>4C11</b>	SASSSVSYMY (SEC ID N°: 9)	LTSNLAS (SEC ID N°: 10)	QQWSSNPPT (SEC ID N°: 11)
<b>1G8</b>	SASSSASYMY (SEC ID N°: 12)	LTSHLAS (SEC ID N°: 13)	QQWSSGPPT (SEC ID N°: 14)
<b>1B4</b>	SASPSVSYMY (SEC ID N°: 45)	LTSHLAS (SEC ID N°: 13)	QQWSSGPPT (SEC ID N°: 14)
<b>1E3</b>	SASSSASYMY (SEC ID N°: 12)	LTSHLAS (SEC ID N°: 13)	QQWSSGPPT (SEC ID N°: 14)
<b>3A9</b>	SASSSVSSMY (SEC ID N°: 15)	LTSNLAS (SEC ID N°: 10)	QQWSSYPPT (SEC ID N°: 16)
<b>Consenso 2</b>	KSSQSLLYX <sub>5</sub> NGKTYLT (SEC ID N°: 17)	LVSXLDX <sub>6</sub> (SEC ID N°: 18)	X <sub>7</sub> QGSHPWX <sub>8</sub> (SEC ID N°: 19)
<b>5E8</b>	KSSQSLLYSNGKTYLT (SEC ID N°: 20)	LVSXLDS (SEC ID N°: 21)	VQGSHPWWT (SEC ID N°: 22)
<b>OB3</b>	KSSQSLLYSNGKTYLT (SEC ID N°: 20)	LVSXLDS (SEC ID N°: 21)	HQGSHPWWT (SEC ID N°: 23)
<b>OB1</b>	KSSQSLLYRNGKTYLT (SEC ID N°: 24)	LVSXLDP (SEC ID N°: 25)	HQGSHPWWT (SEC ID N°: 23)
<b>OH4</b>	KSSQSLLYPNGKTYLT (SEC ID N°: 26)	LVSXLDP (SEC ID N°: 25)	IQGSHPWWT (SEC ID N°: 27)
<b>OE1</b>	KSSQSLLYPNGKTYLT (SEC ID N°: 26)	LVSXLDP (SEC ID N°: 25)	FQGSHPWVW (SEC ID N°: 28)
*X <sub>1</sub> es V o A X <sub>2</sub> es Y o S; X <sub>3</sub> es N o H, X <sub>4</sub> es N, G o Y; X <sub>5</sub> es S, R o P; X <sub>6</sub> es S o P; X <sub>7</sub> es V, H, I o F; X <sub>8</sub> es T o V			

Tabla 2

Fab	HCDR1	HCDR2	HCDR3
<b>Consenso</b>	<b>GX<sub>9</sub>SLX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>G X<sub>13</sub>GX<sub>14</sub>G</b> (SEC ID N°: 29)	<b>HIWWN X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>K X<sub>17</sub>YNT X<sub>18</sub>LKS</b> (SEC ID N°: 30)	<b>I X<sub>19</sub>YYG X<sub>20</sub>X<sub>21</sub> X<sub>22</sub> GFAY</b> (SEC ID N°: 31)
<b>4C11</b>	GFSLSTYGIGVG (SEC ID N°: 32)	HIWWNDNKSYNTALKS (SEC ID N°: 33)	IGYYGSTSGFAY (SEC ID N°: 34)
<b>1G8</b>	GYSLSTPGIGVG (SEC ID N°: 35)	HIWWNDAKSYNTALKS (SEC ID N°: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEC ID N°: 37)
<b>1B4</b>	GYSLSTPGIGVG (SEC ID N°: 35)	HIWWNDAKSYNTALKS (SEC ID N°: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEC ID N°: 37)
<b>1E3</b>	GLSLSTPGIGVG (SEC ID N°: 38)	HIWWNDAKSYNTALKS (SEC ID N°: 36)	IGYYGSTAGFAY (SEC ID N°: 37)
<b>3A9</b>	GFSLNSYGFVGIG (SEC ID N°: 39)	HIWWNGNKYYNTTLKS (SEC ID N°: 40)	IHYYGNSYGFAY (SEC ID N°: 41)
<b>Consenso 2</b>	GFAFSSYDMS (SEC ID N°: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEC ID N°: 43)	DGYIH (SEC ID N°: 44)
<b>5E8</b>	GFAFSSYDMS (SEC ID N°: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEC ID N°: 43)	DGYIH (SEC ID N°: 44)
<b>OB3</b>	GFAFSSYDMS (SEC ID N°: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEC ID N°: 43)	DGYIH (SEC ID N°: 44)
<b>OB1</b>	GFAFSSYDMS (SEC ID N°: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEC ID N°: 43)	DGYIH (SEC ID N°: 44)
<b>OH4</b>	GFAFSSYDMS (SEC ID N°: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEC ID N°: 43)	DGYIH (SEC ID N°: 44)
<b>OE1</b>	GFAFSSYDMS (SEC ID N°: 42)	TIISGGTYTYYPDSVKG (SEC ID N°: 43)	DGYIH (SEC ID N°: 44)
* X <sub>9</sub> es F, Y o L; X <sub>10</sub> es S o N, X <sub>11</sub> es T o S; X <sub>12</sub> es Y o P, X <sub>13</sub> es I o F; X <sub>14</sub> es V, o I; X <sub>15</sub> es D o G; X <sub>16</sub> es A o N; X <sub>17</sub> es S o Y; X <sub>18</sub> es A o T; X <sub>19</sub> es G o H; X <sub>20</sub> es S o N; X <sub>21</sub> es T o S; X <sub>22</sub> es S, A o Y			

La presente divulgación incluye, pero sin limitación, un anticuerpo que comprende:

a) una región variable de cadena ligera que comprende:

- 5 i) una LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 6, 9, 12, 45, 15, 17, 20, 24 y 26;
- ii) una LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 7, 10, 13, 18, 21 y 25; y
- iii) una LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 8, 11, 14, 16, 19, 22, 23, 17 y 28; y

10 b) una región variable de cadena pesada que comprende:

- i) una HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 29, 32, 35, 38, 39 y 42;
- ii) una HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 30, 33, 36, 40 y 43; y
- 15 iii) una HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 31, 24, 27, 41 y 44.

Alternativamente, un anticuerpo preferente de la divulgación comprende:

a) una LCVR que comprende;

- 20 i) una LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 9, 12, 20 y 26;
- ii) una LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 10, 13, 21 y 25; y
- iii) una LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 11, 14, 23 y 27; y

25 b) una HCVR que comprende;

- i) una HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 32, 35 y 42;
- i) una HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 33, 36 y 43; y
- 30 iii) una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEC ID N°: 34, 37 y 44.

Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 22, 42, 43 y 44, respectivamente.

Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 28, 42, 43 y 44, respectivamente.

35 Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 24, 25, 23, 42, 43 y 44, respectivamente.

Otro anticuerpo más preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 27, 42, 43 y 44, respectivamente.

40 Otro anticuerpo incluso más preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 9, 10, 11, 32, 33 y 34, respectivamente.

45 Otro anticuerpo incluso más preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 12, 13, 14, 35, 36 y 37, respectivamente.

Otro anticuerpo incluso más preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 45, 13, 14, 35, 36 y 37, respectivamente.

5 El anticuerpo más preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 23, 42, 43 y 44, respectivamente.

El anticuerpo más preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 12, 13, 14, 38, 36 y 37, respectivamente.

10 El anticuerpo más preferente de la invención comprende una LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 15, 10, 16, 39, 40 y 41, respectivamente.

Un anticuerpo monoclonal preferente de la invención comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 46, 48, 50, 52, 53, 55, 57, 59, 60, 61, 62 y 63.

15 Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 47, 49, 51, 54, 56 y 58. Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una LCVR de SEC ID N°: 59 y una HCVR de SEC ID N°: 58. Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una LCVR de SEC ID N°: 60 y una HCVR de SEC ID N°: 58. Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una LCVR de SEC ID N°: 61 y una HCVR de SEC ID N°: 58. Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una LCVR de SEC ID N°: 62 y una HCVR de SEC ID N°: 58. Otro anticuerpo preferente de la invención comprende una LCVR de SEC ID N°: 63 y una HCVR de SEC ID N°: 58. El anticuerpo más preferente de la invención comprende una LCVR de SEC ID N°: 48 y una HCVR de SEC ID N°: 49. Otro anticuerpo más preferente de la invención comprende una LCVR de SEC ID N°: 55 y una HCVR de SEC ID N°: 56. Dichas LCVR están preferentemene unidas a una región constante de cadena ligera o de cadena pesada.

25 Los anticuerpos monoclonales preferentes de la invención se denominan en el presente documento 4C11, 1G8, 1B4, 1E3, 3A9, 2, 5E8, OB3, OB1, OH4 y OE1. Las SEC ID N° de los Mabs 4C11, 1G8, 1B4, 1E3, 3A9, 5E8, OB3, OB1, OH4, OE1, 3.12, 3.23 que codifican las secuencias de aminoácidos y/o diversos fragmentos de los mismos se proporcionan en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

Mab	LC	HC	LC VR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HC VR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3
<b>Consenso 1</b>	64	65	46	6	7	8	47	29	30	31
<b>4C11</b>	66	67	48	9	10	11	49	32	33	34
<b>1G8</b>	68	69	50	12	13	14	51	35	36	37
<b>1B4</b>	70	69	52	45	13	14	51	35	36	37
<b>1E3</b>	71	72	53	12	13	14	54	38	36	37
<b>3A9</b>	73	74	55	15	10	16	56	39	40	41
<b>Consenso 2</b>	75	76	57	17	18	19	58	42	43	44
<b>5E8</b>	77	76	59	20	21	22	58	42	43	44
<b>OB3</b>	78	76	60	20	21	23	58	42	43	44
<b>OB1</b>	79	76	61	24	25	23	58	42	43	44
<b>OH4</b>	80	76	62	26	25	27	58	42	43	44

<b>OE1</b>	81	76	63	26	25	28	58	42	43	44
<b>3.23</b>	82	83								
<b>3.12</b>	84	85								

El término "epítoto" se refiere a esa porción de una molécula capaz de ser reconocida por, y unirse a, un anticuerpo en una o más regiones de unión a antígeno del anticuerpo. Los epítotos consisten a menudo en una agrupación de moléculas superficiales químicamente activas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcar y tienen generalmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen a un epítoto en el extremo N-terminal de hepcidina madura. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen a un epítoto contenido dentro de los aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepcidina-25. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen al extremo N-terminal de hepcidina-25 humana. De modo incluso más preferente, los anticuerpos de la invención se unen a un epítoto contenido dentro de los aminoácidos 1 a 7, inclusive, de hepcidina-25 humana. Del modo más preferente, los anticuerpos de la invención se unen a un epítoto contenido dentro de los aminoácidos DTHFPIC de la SEC ID N°: 1.

La expresión "afinidad de unión ( $K_D$ )", tal como se usa en el presente documento, se pretende que se refiere a la tasa de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. La  $K_D$  es la relación de la tasa de disociación ( $k_{off}$ ) con respecto a la tasa de asociación ( $k_{on}$ ). Por lo tanto,  $K_D$  es igual a  $k_{off}/k_{on}$  y se expresa como concentración molar (M). Se deduce que cuanto menor sea la  $K_D$ , mayor será la afinidad de unión. Por lo tanto, una  $K_D$  de 1  $\mu$ M indica una afinidad de unión débil en comparación con una  $K_D$  de 1 nM. Los valores de  $K_D$  pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

El término "selectivo", tal como se usa en el presente documento con referencia a un anticuerpo antihepcidina-25 de la invención, se refiere a un anticuerpo que se une a hepcidina-25 con una  $K_D$  de aproximadamente 1000, 500, 200, 100, 50, 10 o aproximadamente 5 veces inferior al anticuerpo que se une al menos a una forma precursora de la hepcidina-25 y/o al menos una forma truncada N-terminalmente de hepcidina madura presente en la misma especie de mamífero, según se mide por SPR a 25 °C. Además, o alternativamente, un anticuerpo selectivo de hepcidina-25 de la invención se une a hepcidina-25 pero no se une, o se une solo mínimamente, a al menos una forma precursora de hepcidina-25 y/o al menos una forma truncada de modo N-terminal de hepcidina-25 presente en una especie de mamífero según se determina por procedimientos de inmunoensayo y/o de espectrometría de masas MALDI-TOF descritos en los ejemplos 4-8 del presente documento. Preferentemente, la forma precursora de hepcidina-25 es una prohepcidina, más preferentemente prohepcidina humana y del modo más preferente prohepcidina humana que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 90. Preferentemente, la forma truncada N-terminalmente de hepcidina-25 es hepcidina-20 humana (es decir, los aminoácidos 6-25 de la SEC ID N°: 1) o hepcidina-22 humana (los aminoácidos 4-25 de la SEC ID N°: 1).

El término "detectar" o "detección" se usa en el sentido más amplio para incluir medidas cuantitativas, semicuantitativas o cualitativas de una molécula objetivo. En un aspecto, los procedimientos descritos en el presente documento solamente pueden determinar la presencia o ausencia de un polipéptido de hepcidina particular en una muestra biológica y, por lo tanto, el polipéptido hepcidina es detectable o, alternativamente, indetectable en la muestra cuando se determina por el procedimiento.

El término "bioactividad", en referencia a un anticuerpo de la invención, incluye, pero sin limitación, afinidad de unión de antígeno o de epítoto, estabilidad del anticuerpo *in vivo* y/o *in vitro*, propiedades inmunógenas del anticuerpo, por ejemplo, cuando se administra a un sujeto humano y/o la capacidad de neutralizar o antagonizar una bioactividad de hepcidina-25, *in vivo* o *in vitro*, incluida, pero sin limitación, la inhibición de la desregulación de nivel de hierro en suero en una inflamación en un modelo animal, por ejemplo, ensayo de provocación de inflamación inducida por IL-6. Las propiedades o características mencionadas anteriormente pueden observarse o medirse usando técnicas reconocidas en la técnica, incluidas, pero sin limitación, ensayos de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), desactivación de fluorescencia, ELISA de fluorescencia, ELISA competitivo, análisis por SPR incluido, pero sin limitación, el análisis por SPR usando un biosensor BIAcore, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* sin límite (véase, por ejemplo, la publicación internacional de patente N°: WO 2006/062685).

El término "bioactividad" con referencia a hepcidina incluye, pero sin limitación, unión específica de hepcidina a otra proteína, incluidas, pero sin limitación, su receptor ferroportina, una o más funciones de hepcidina mediadas por ferroportina, tales como internalización inducida por hepcidina y/o degradación de ferroportina (véase, por ejemplo, Nemeth, E. y col., Hepcidina Regulates Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization, Science 306, 2090-2093, (2004)), regulación por hepcidina del flujo de salida de hierro mediado por ferroportina, disminución inducida por hepcidina de los niveles de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito en un ser humano, estabilidad proteica, es decir, la hepcidina que afecta a los niveles de actividad de otra proteína *in vivo* o *in vitro* y niveles de expresión de hepcidina y/o distribución histórica de

hepcidina. El término "inhibir" o "neutralizar", tal como se usa en el presente documento con respecto a la bioactividad de un anticuerpo de la invención significa la capacidad del anticuerpo para hepcidina-25 antagonizar, prohibir, impedir, restringir, ralentizar, alterar, eliminar, detener, reducir o revertir sustancialmente una bioactividad de hepcidina, incluida, pero sin limitación, una bioactividad de hepcidina-25 humana, de rata o de ratón.

5 Los términos "sujeto" y "paciente", que se usan de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a un mamífero, preferentemente a un ser humano. En determinadas realizaciones, el paciente tiene una enfermedad, un trastorno o una afección que podría beneficiarse de un nivel disminuido de hepcidina, una disminución de la actividad de hepcidina y/o un aumento del nivel de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito.

10 La expresión "se une específicamente", tal como se usa en el presente documento con referencia a la unión entre un anticuerpo y un polipéptido de hepcidina, significa que el anticuerpo se une al polipéptido de hepcidina con una  $K_D$  inferior a aproximadamente 500 nM tal como se determina por SPR a 25 °C.

En una realización, un anticuerpo de la invención tiene una  $K_D$  para hepcidina-25 humana (SEC ID N°: 1) inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 50 nM, inferior a aproximadamente 25 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, o inferior a aproximadamente 800 pM tal como se determina por SPR a 25 °C. Preferentemente, un anticuerpo de la invención también se une específicamente a al menos un polipéptido de hepcidina madura de una especie de mamífero no humana, tal como se determina por SPR a 25 °C. Más preferentemente, el anticuerpo también se une específicamente a al menos un polipéptido de hepcidina-25 seleccionado del grupo que consiste en hepcidina-25 de ratón, rata y mono cinomolgus (SEC ID N°: 3, 2 y 4, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C. De forma incluso más preferente, el anticuerpo también se une específicamente a una hepcidina-25 de mono cinomolgus (SEC ID N°: 4), tal como se determina por SPR a 25 °C. De forma incluso más preferente, el anticuerpo también se une específicamente a una hepcidina-25 de ratón y/o de rata (SEC ID N°: 3 y 2, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C.

En una realización, un anticuerpo de la invención tiene una  $K_D$  para hepcidina-25 humana (SEC ID N°: 1) inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 50 nM, inferior a aproximadamente 25 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 800 pM tal como se determina por SPR a 25 °C, y i) el anticuerpo tiene una  $K_D$  para pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEC ID N°: 88) o hepcidina-22 humana (SEC ID N°: 89) que es al menos aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50, aproximadamente 10, o aproximadamente 5 veces superior, tal como se determina por SPR a 25 °C o ii) la unión del anticuerpo a pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEC ID N°: 88) o hepcidina-22 humana (SEC ID N°: 89) no es detectable o es mínimamente detectable mediante procedimientos de inmunoensayo y/o de espectroscopia de masa MALDI-TOF descritos en los ejemplos 4-7. Preferentemente, el anticuerpo también se une específicamente a al menos un polipéptido de hepcidina madura de una especie de mamífero no humano, tal como se determina por SPR a 25 °C. Más preferentemente, el anticuerpo también se une específicamente a al menos un polipéptido de hepcidina-25 seleccionado del grupo que consiste en hepcidina-25 de ratón, rata y mono cinomolgus (SEC ID N°: 3, 2 y 4, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C. De forma incluso más preferente, el anticuerpo también se une específicamente a una hepcidina-25 de mono cinomolgus (SEC ID N°: 4), tal como se determina por SPR a 25 °C. De forma incluso más preferente, el anticuerpo también se une específicamente a una hepcidina-25 de ratón y/o de rata (SEC ID N°: 3 y 2, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C.

En otra realización, un anticuerpo de la invención tiene una  $K_D$  para hepcidina-25 humana (SEC ID N°: 1) de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM a 1 nM tal como se determina por SPR a 25 °C, y i) el anticuerpo tiene una  $K_D$  para pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEC ID N°: 88) o hepcidina-22 humana (SEC ID N°: 89) que es al menos aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces superior, tal como se determina por SPR a 25 °C o ii) la unión del anticuerpo a pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEC ID N°: 88) o hepcidina-22 humana (SEC ID N°: 89) no es detectable o es mínimamente detectable mediante procedimientos de inmunoensayo y/o de espectroscopia de masa MALDI-TOF descritos en los ejemplos 4-7. Preferentemente, el anticuerpo también se une específicamente a al menos un polipéptido de hepcidina madura de una especie de mamífero no humano, tal como se determina por SPR a 25 °C. Más preferentemente, el anticuerpo también se une específicamente a al menos un polipéptido de hepcidina-25 seleccionado del grupo que consiste en hepcidina-25 de ratón, rata y mono cinomolgus (SEC ID N°: 3, 2 y 4, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C. De forma incluso más preferente, el anticuerpo también se une específicamente a una hepcidina 25 de mono cinomolgus (SEC ID N°: 4), tal como se determina por SPR a 25 °C. De forma incluso más preferente, el anticuerpo también se une específicamente a una hepcidina-25 de ratón y/o de rata (SEC ID N°: 3 y 2, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C.

En una realización, un anticuerpo de la invención tiene una  $K_D$  para hepcidina-25 humana (SEC ID N°: 1) inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 50 nM, inferior a aproximadamente 25 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, o inferior a aproximadamente 800 pM tal como se determina por SPR a 25 °C. Preferentemente, un anticuerpo de la invención también tiene una

K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM a 1 nM para al menos un polipéptido de hepcidina madura de una especie de mamífero no humano, tal como se determina por SPR a 25 °C. Más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM a 1 nM para al menos un polipéptido de hepcidina-25 de un grupo que consiste en ratón, rata y mono cinomolgus, tal como se determina por SPR a 25 °C (SEC ID N°: 3, 2 y 4, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C. Incluso más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM y aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para una hepcidina-25 de mono cinomolgus (SEC ID N°: 4), tal como se determina por SPR a 25 °C. Incluso más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM y aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para una hepcidina-25 de ratón y/o de rata (SEC ID N°: 3 y 2, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C.

En otra realización, un anticuerpo de la invención tiene una K<sub>D</sub> para hepcidina-25 humana (SEC ID N°: 1) de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM a 1 nM, tal como se determina por SPR a 25 °C. Preferentemente, un anticuerpo de la invención también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM a 1 nM para al menos un polipéptido de hepcidina madura de una especie de mamífero no humano, tal como se determina por SPR a 25 °C. Más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM a 1 nM para al menos un polipéptido de hepcidina-25 de un grupo que consiste en ratón, rata y mono cinomolgus, tal como se determina por SPR a 25 °C (SEC ID N°: 3, 2 y 4, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C. Incluso más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM y aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para una hepcidina-25 de mono cinomolgus (SEC ID N°: 4), tal como se determina por SPR a 25 °C. Incluso más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM y aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM y 1 nM para una hepcidina-25 de ratón y/o de rata (SEC ID N°: 3 y 2, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C.

En una realización, un anticuerpo de la invención tiene una K<sub>D</sub> para hepcidina-25 humana (SEC ID N°: 1) inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 50 nM, inferior a aproximadamente 25 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 800 pM tal como se determina por SPR a 25 °C, y i) el anticuerpo tiene una K<sub>D</sub> para pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEC ID N°: 88) o hepcidina-22 humana (SEC ID N°: 89) que es al menos aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50, aproximadamente 10, o aproximadamente 5 veces superior, tal como se determina por SPR a 25 °C o ii) la unión del anticuerpo a pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEC ID N°: 88) o hepcidina-22 humana (SEC ID N°: 89) no es detectable o es mínimamente detectable mediante procedimientos de inmunoensayo y/o de espectroscopia de masa MALDI-TOF descritos en los ejemplos 4-7. Preferentemente, un anticuerpo de la invención también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para al menos un polipéptido de hepcidina madura de una especie de mamífero no humano, tal como se determina por SPR a 25 °C. Más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM a 1 nM para al menos un polipéptido de hepcidina-25 de un grupo que consiste en ratón, rata y mono cinomolgus, tal como se determina por SPR a 25 °C (SEC ID N°: 3, 2 y 4, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C. Incluso más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para una hepcidina-25 de mono cinomolgus (SEC ID N°: 4), tal como se determina por SPR a 25 °C. Incluso más preferentemente, el anticuerpo también tiene una K<sub>D</sub> de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para una hepcidina-25 de ratón y/o de rata (SEC ID N°: 3 y 2, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C.

En otra realización, un anticuerpo de la invención tiene una K<sub>D</sub> para hepcidina-25 humana (SEC ID N°: 1) de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 35 nM a 1 nM tal como se determina por SPR a 25 °C, y i) el anticuerpo tiene una K<sub>D</sub> para pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEC ID N°: 88) o hepcidina-22 humana (SEC ID N°: 89) que es al menos aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces superior, tal como se determina por SPR a

25 °C o ii) la unión del anticuerpo a pro-hepcidina humana, hepcidina-20 humana (SEC ID N°: 88) o hepcidina-22 humana (SEC ID N°: 89) no es detectable o es mínimamente detectable mediante procedimientos de inmunoensayo y/o de espectroscopia de masa MALDI-TOF descritos en los ejemplos 4-7. Preferentemente, el anticuerpo tiene una  $K_D$  de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para al menos un polipéptido de hepcidina madura de una especie de mamífero no humano, tal como se determina por SPR a 25 °C. Más preferentemente, el anticuerpo también tiene una  $K_D$  de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para al menos un polipéptido de hepcidina-25 de un grupo que consiste en ratón, rata y mono cinomolgus, tal como se determina por SPR a 25 °C (SEC ID N°: 3, 2 y 4, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C. Incluso más preferentemente, el anticuerpo también tiene una  $K_D$  de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM y aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para una hepcidina-25 de mono cinomolgus (SEC ID N°: 4), tal como se determina por SPR a 25 °C. Incluso más preferentemente, el anticuerpo también tiene una  $K_D$  de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 800 pM, de aproximadamente 50 nM y aproximadamente 1 nM, o entre aproximadamente 35 nM y 1 nM para una hepcidina-25 de ratón y/o de rata (SEC ID N°: 3 y 2, respectivamente), tal como se determina por SPR a 25 °C.

#### Expresión de anticuerpos

Se usan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, aislar líneas de células huésped que producen un anticuerpo de la invención, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo a partir del medio de cultivo.

La presente divulgación también se dirige a células huésped que expresan un anticuerpo anti-hepcidina de la invención. Puede usarse una amplia diversidad de sistemas de expresión huéspedes conocidos en la técnica para expresar un anticuerpo de la presente invención, incluidos sistemas de expresión procarióticos (bacterianos) y eucarióticos (tales como levaduras, baculovirus, células vegetales, de mamíferos y otras células animales, animales transgénicos y células de hibridoma), así como sistemas de expresión de presentación en fagos.

Un anticuerpo de la invención puede prepararse mediante expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo recombinantemente, una célula huésped se transforma, se transduce y se infecta o similar con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y/o pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligera y/o pesada se expresen en la célula huésped. La cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse independientemente de promotores diferentes a los que están unidas operativamente en un vector o, alternativamente, la cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse independientemente de diferentes promotores a los que están unidas operativamente en dos vectores: uno que expresa la cadena pesada y uno que expresa la cadena ligera. Opcionalmente, la cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse en células huésped diferentes.

También pueden usarse células huésped para producir porciones, o fragmentos, de anticuerpos intactos, por ejemplo, fragmentos Fab o moléculas scFv, mediante técnicas que son convencionales. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifique bien la cadena ligera o bien la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención. También puede usarse tecnología de ADN recombinante para eliminar parte o todo el ADN que codifica bien ambas o bien una de las cadenas ligera y pesada que no es necesaria para la unión a hepcidina-25 humana. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los anticuerpos de la invención.

La invención proporciona una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación. Preferentemente, una célula huésped de la divulgación comprende uno o varios vectores o constructos que comprenden una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación. Por ejemplo, una célula huésped de la divulgación es una célula en la que se ha introducido un vector de la divulgación, comprendiendo dicho vector un polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo de la invención y/o un polinucleótido que codifica una HCVR de la invención. La divulgación también proporciona una célula huésped en la que se han introducido dos vectores de la divulgación; uno que comprende un polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo de la invención y uno que comprende un polinucleótido que codifica una HCVR presente en un anticuerpo de la invención y cada uno unido operativamente a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tal como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador SV40 / promotor de AdMLP) para conducir niveles altos de transcripción de los genes.

Una vez expresados, los anticuerpos intactos, cadenas ligera y pesada individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden purificarse según procedimientos estándar de la técnica, incluidos precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico, afinidad (por ejemplo, proteína A), fase inversa, cromatografía en columna de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel y similares. Son preferentes las inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad de al menos aproximadamente

el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 % o aproximadamente el 96 % y las más preferentes con una homogeneidad de aproximadamente el 98 a aproximadamente el 99 % o más, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los anticuerpos estériles pueden usarse después terapéuticamente, tal como se refiere en el presente documento.

##### 5 Anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética

Preferentemente, un anticuerpo de la invención puede usarse para fines terapéuticos, tiene la secuencia de la región estructural y constante (en la medida en que exista en el anticuerpo) derivada de seres humanos para reducir la posibilidad de que el anticuerpo facilite una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética son de particular interés debido a que son valiosos para la aplicación terapéutica y disminuyen la probabilidad de una respuesta de anticuerpo antirratón humano observada frecuentemente con anticuerpos de origen murino o anticuerpos que comprenden porciones que son de origen murino cuando se administran a un sujeto humano. Preferentemente, los anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética inyectados pueden tener una semivida más parecida a la de los anticuerpos humanos de origen natural que, por ejemplo, anticuerpos murinos, permitiendo de este modo la administración de dosis pequeñas y menos frecuentes al sujeto.

La expresión "anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo en el que al menos una porción es de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humano obtenido por ingeniería genética puede comprender porciones derivadas de un anticuerpo de origen no humano, tal como un ratón, y porciones derivadas de un anticuerpo de origen humano, unidos conjuntamente, por ejemplo químicamente mediante técnicas convencionales (por ejemplo, sintéticas) o preparadas en forma de un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética.

Preferentemente, un "anticuerpo humano obtenido por ingeniería genética" tiene CDR que están originadas o están derivadas de un anticuerpo parental, es decir, un anticuerpo no humano, preferentemente un Mab de ratón o un fragmento del mismo tal como el Fab de ratón 4C11, mientras que el marco estructural y la región constante, en la medida en que esté presente, (o una porción significativa o sustancial de la misma, es decir, al menos aproximadamente el 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), están codificados por la información de secuencias de ácidos nucleicos que tiene lugar en la región de inmunoglobulina de línea germinal humana (véase, por ejemplo, la base de datos internacional InternationalMunoGeneTicsDatabase) o en formas recombinadas o mutadas de los mismos tanto si se producen dichos anticuerpos en células humanas o como si no. Preferentemente, al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR de un anticuerpo humano obtenido por ingeniería genética están optimizadas a partir de las CDR de un anticuerpo parental no humano a partir del que se ha derivado el anticuerpo humano obtenido por ingeniería genética, para generar una propiedad deseada, por ejemplo, especificidad, afinidad y neutralización mejoradas, que pueden identificarse mediante un ensayo de cribado, por ejemplo, un ensayo de ELISA. Una CDR en un anticuerpo de la invención comprende al menos una sustitución aminoacídica en comparación con la presente en un Fab de ratón parental 4C11, 3A9 o 5E8. Determinadas sustituciones aminoacídicas en las CDR de anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética de la invención en comparación con las del Fab de ratón parental 4C11, 3A9 o 5E8 reducen la posibilidad de inestabilidad del anticuerpo (por ejemplo, eliminando uno o más restos de Asn de la CDR) o reduce la probabilidad de inmunogenicidad del anticuerpo cuando se administra a un sujeto humano (por ejemplo, tal como se predice por IMMUNOFILTER™ Technology (Xencor, Inc., Monrovia, CA).

Los anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética contienen preferentemente secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o del marco estructural importadas del anticuerpo parental. Los anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética pueden someterse a mutagénesis *in vitro* usando procedimientos de uso rutinario en la técnica y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos estructurales de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes humanos obtenidos por ingeniería genética son secuencias que, aunque derivadas de las relacionadas con secuencias de HCVR y LCVR de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de líneas germinales de anticuerpos humanos *in vivo*. Se contempla que dichas secuencias de aminoácidos de las regiones estructurales HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes humanos obtenidos por ingeniería genética son al menos aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 98 % o, más preferentemente, al menos aproximadamente el 99 % o, del modo más preferente, el 100 % idénticas a una secuencia de línea germinal humana.

En realizaciones preferentes, un anticuerpo humano obtenido por ingeniería genética de la presente invención comprende secuencias estructurales de cadena ligera de línea germinal humana y secuencias estructurales de cadena pesada de línea germinal humana (véase, por ejemplo, el documento PCT WO 2005/005604).

Existen múltiples procedimientos disponibles en la técnica para generar anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética (véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional PCT WO2006/06046935; Queen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869 (1991); Jones y col., Nature, 321:522 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-327 (1988); y Verhoeyen, y col., Science, 239:1534 (1988)). Por ejemplo, pueden

producirse anticuerpos humanos obtenidos por ingeniería genética obteniendo secuencias de ácidos nucleicos que codifican la HCVR y la LCVR de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo murino o un anticuerpo fabricado mediante un hibridoma) que se une a hepcidina-25, que identifica las CDR en dichas HCVR y LCVR (no humanas) e injerta dichas secuencias de ácidos nucleicos que codifican CDR en secuencias de ácidos nucleicos que codifican el marco estructural humano seleccionadas. Opcionalmente, una región CDR puede optimizarse mutagenizando aleatoriamente o en ubicaciones particulares con el fin de sustituir uno o varios aminoácidos de la CDR por un aminoácido diferente antes de injertar la región CDR en la región estructural. Alternativamente, una región CDR puede optimizarse después de la inserción en la región estructural humana usando procedimientos disponibles para un experto en la técnica.

Después de injertar las secuencias codificantes de CDR en las secuencias codificantes del marco estructural humano, las secuencias de ADN resultantes que codifican las secuencias pesada variable y ligera variable obtenidas por ingeniería genética humanas se expresan después para producir un anticuerpo humano obtenido por ingeniería genética que se une a hepcidina-25. Las HCVR y LCVR obtenidas por ingeniería genética humanas pueden expresarse como parte de una molécula de anticuerpo de anti-hepcidina completo, es decir, como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humano. No obstante, las secuencias de HCVR y LCVR también pueden expresarse en ausencia de secuencias constantes para producir un Fv o un Fab anti-hepcidina-25 humano obtenido por ingeniería genética, por ejemplo (véase, por ejemplo, Watkins, J. y col., Anal. Biochem. 253:37-45 (1997) y Watkins, J. y col., Anal. Biochem. 256:169-177, (1998)).

#### Usos diagnósticos

Los anticuerpos de la presente invención proporcionan el medio para detectar o determinar con precisión las cantidades de hepcidina-25 en un tejido o fluido biológico para la evaluación de predisposición a enfermedades y afecciones promovidas por la hepcidina-25, y para detectar y diagnosticar dichas enfermedades y afecciones en pacientes que las padecen. Por ejemplo, los anticuerpos selectivos de hepcidina-25 de la invención pueden incorporarse en inmunoensayos sensibles y fiables tales como ELISA, RIA, ensayos de inmunodifusión o ensayos de inmunodetección, tales como ensayos SPR. De forma similar, los anticuerpos selectivos de hepcidina-25 de la presente invención son también útiles para ensayos inmunohistoquímicos (IHC) y de inmunofluorescencia (IF) de muestras de tejidos o de fluidos biológicos. Dichos análisis pueden usarse para detectar niveles aberrantes de hepcidina-25 y, por lo tanto, para diagnosticar enfermedades y afecciones promovidas por la hepcidina-25. Más específicamente, la presente divulgación proporciona procedimientos de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a hepcidina-25 en un paciente determinando el nivel de hepcidina-25 en una muestra de tejido o de fluido biológico de un paciente y comparando el nivel de hepcidina-25 en la muestra con el nivel de hepcidina-25 en una muestra correspondiente de uno o más individuos de control o con un patrón de referencia, detectando, de este modo, un estado patológico asociado con niveles anómalos de hepcidina-25. El estado patológico puede comprender uno o más de una enfermedad genética o no genética asociada con la disminución de niveles de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito. Preferentemente, el estado patológico puede comprender uno o más de una enfermedad genética o no genética asociada con anemia.

También se proporciona un procedimiento para realizar un seguimiento de una enfermedad o afección asociada a hepcidina-25 en un paciente. El procedimiento incluye determinar el nivel de hepcidina-25 en una muestra de un tejido o fluido biológico de un paciente que padece, o está en riesgo de padecer, una enfermedad o afección asociada con hepcidina-25 en un primer punto temporal; determinar el nivel de hepcidina-25 en una o más muestras de tejido o fluido biológico del paciente en uno o más puntos temporales diferentes; comparar los niveles de hepcidina-25 determinados en diferentes puntos temporales y, por lo tanto, realizar un seguimiento de la enfermedad o afección promovida por la hepcidina-25.

Los anticuerpos selectivos de hepcidina-25 de la presente invención son particularmente útiles cuando se aplican a procedimientos de alto rendimiento. Dichos procedimientos incluyen procedimientos de microchips y micromatrices, de modo que muchas muestras pueden analizarse en una microplaca o portaobjetos, u otro sustrato de ensayo conocido en la técnica.

La presencia de hepcidina-25 o niveles de la misma en una muestra biológica puede establecerse combinando la muestra biológica con, por ejemplo, un anticuerpo de la invención en condiciones adecuadas para formar un complejo antígeno-anticuerpo. El anticuerpo se marca directa o, más preferentemente, indirectamente con un resto detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Se conocen bien en la técnica una amplia diversidad de procedimientos de detección de la formación de inmunocomplejos, por ejemplo, ELISA, RIA, análisis de inmunotransferencia (por ejemplo, inmunotransferencia por puntos, inmunotransferencia en ranuras, inmunotransferencia Western, etc.), técnicas indirectas de inmunofluorescencia y procedimientos que dependen de la detección de cambios en parámetros físicos, tales como, por ejemplo, SPR, y similares. Dichas aplicaciones incluyen procedimientos que usan un anticuerpo selectivo de hepcidina-25 de la invención conjugado con un resto detectable para detectar la hepcidina en una muestra biológica, por ejemplo en un fluido biológico humano o en una célula o extracto de tejido. Pueden usarse anticuerpos de la invención en dichos ensayos con o sin modificación con un resto detectable. Si se modifican con un resto detectable, los anticuerpos de la invención pueden modificarse por unión covalente o no covalente del resto detectable. Tal como se usa en el presente documento, el término "detectable" describe una característica de una sustancia (un conjugado, compuesto o resto) que permite identificar

o rastrear la sustancia mediante un detector, usando técnicas analíticas conocidas. Los ejemplos representativos de restos detectables incluyen, sin limitación, cromóforos, restos fluorescentes, restos fosforescentes, restos luminiscentes, restos radioactivos, diversos enzimas (tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante), restos magnéticos (por ejemplo, materiales diamagnéticos, paramagnéticos y ferromagnéticos) y agrupamientos de metales pesados, así como cualquier otro resto conocido detectable. La cantidad de un complejo estándar antígeno-anticuerpo formado puede cuantificarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, medios fotométricos y colorimétricos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se usan sin modificación, es decir, marcados indirectamente, según procedimientos bien conocidos en la técnica.

La invención abarca un procedimiento para detectar proteína de hepcidina-25 en una muestra biológica, que comprende la incubación de un antídoto de la invención con una muestra biológica en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo se una a proteína de hepcidina-25 y detectar dicha unión. Preferentemente, el anticuerpo es 5E8, OH4 y/o OB3. Un procedimiento preferente para detectar proteína de hepcidina-25 en una muestra biológica es un ELISA de tipo emparejado, que comprende incubar un primer anticuerpo de la invención con la muestra biológica en condiciones y durante el tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo se una a la proteína de hepcidina-25, retirar la muestra no unida, aplicar un segundo anticuerpo que se une selectivamente a un epítoto contenido dentro de los aminoácidos 1 a 7 de SEC ID N°: 1, retirar el segundo anticuerpo no unido y detectar la unión a dicho segundo anticuerpo. Preferentemente, el primer anticuerpo es 3.23 o 3.12 y el segundo anticuerpo es OH4 o OB3. El Mab 3.23 anti-hepcidina comprende dos polipéptidos de cadena ligera y dos polipéptidos de cadena pesada en los que cada uno de los polipéptidos de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 82 y cada uno de los polipéptidos de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 83 y se unen a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 1. El Mab 3.12 anti-hepcidina comprende dos polipéptidos de cadena ligera y dos polipéptidos de cadena pesada en los que cada uno de los polipéptidos de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 84 y cada uno de los polipéptidos de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 85 y se unen a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 1. Un procedimiento más preferente para detectar proteína de hepcidina-25 en una muestra biológica es un ELISA de tipo emparejado, que comprende incubar un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítoto que contiene los aminoácidos 5-25 de hepcidina con la muestra biológica en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo se una a proteína(s) de hepcidina, retirar la muestra no unida, aplicar un segundo anticuerpo que se une a un epítoto que contiene dentro de los aminoácidos 1 a 7 de hepcidina-25, retirar el segundo anticuerpo no unido, y detectar la presencia o ausencia de unión de dicho segundo anticuerpo. Preferentemente, el primer anticuerpo es 3.23 o 3.12 y el segundo anticuerpo es OH4 o OB3. Más preferentemente, el segundo anticuerpo no está marcado y la unión se detecta indirectamente según procedimientos conocidos en la técnica.

La presente invención también proporciona composiciones, procedimientos y kits para el cribado de muestras sospechosas de contener hepcidina-25. Dicho cribado puede realizarse sobre muestras de pacientes o muestras de laboratorio sospechosas de contener o producir dicho polipéptido. Un kit puede contener un anticuerpo selectivo de hepcidina-25 de la presente invención. El kit puede contener un tampón y reactivos adecuados para detectar una interacción entre una muestra y un anticuerpo selectivo de hepcidina-25 de la presente invención. El reactivo proporcionado puede ser un agente radiomarcado, marcado fluorescentemente o marcado enzimáticamente de unión o interacción con un anticuerpo de la presente invención tal como un anticuerpo IgG anti-ratón.

El reactivo del kit puede proporcionarse como una solución líquida, unida a un soporte sólido o como polvo seco. Cuando el reactivo se proporciona en una solución química, preferentemente la solución líquida es una solución acuosa. Preferentemente, cuando el reactivo proporcionado está unido a un soporte sólido, el soporte sólido puede ser un medio cromatográfico, una placa de ensayo que tenga una pluralidad de pocillos, o un portaobjetos de microscopio. Cuando es reactivo proporcionado es un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado, puede proporcionarse también en el kit.

El kit de la invención se proporciona en un envase que generalmente incluye un vial en el que puede disponerse el anticuerpo, antígeno o reactivo de detección, y preferentemente dividido de forma adecuada en partes alícuotas. Los kits de la presente invención también incluirá normalmente un medio para contener los recipientes de anticuerpo, antígeno y reactivos para la venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico en los que se mantienen los viales deseados y uno o más productos químicos necesarios, tales como material de cromatografía, disolventes y eluyentes, tubos de ensayo, detergentes, anticuerpos y productos químicos para la reacción de detección.

#### 55 Usos terapéuticos

Pueden prevenirse o tratarse enfermedades o afecciones promovidas por hepcidina-25 administrando a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo selectivo de hepcidina-25, un segundo anticuerpo que se une a un epítoto contenido dentro de los aminoácidos 1 a 7, inclusive, de (1) hepcidina-25 humana, es decir, DTHFPIC (SEC ID N°: 5), y/o (2) hepcidina-25 de ratón, es decir, DTNFPIC (SEC ID N°: 86).

60 Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención puede usarse para aumentar lo niveles

de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito en un ser humano cuando se administra una cantidad eficaz a un sujeto humano con necesidad de ello. Además, un anticuerpo de la invención puede ser útil para el tratamiento de afecciones, enfermedades o trastornos en los que la presencia de hepcidina-25 causa, o contribuye a provocar, efectos patológicos no deseados o a una disminución de niveles de hepcidina-25 o la actividad de hepcidina tiene un beneficio terapéutico en sujetos humanos. Dichas afecciones, enfermedades o trastornos incluyen anemia, incluidas, pero sin limitación, anemia resultante de infección, inflamación, enfermedad crónica y cáncer. Los sujetos pueden ser hombres o mujeres. Preferentemente, un sujeto humano tiene o están en riesgo de tener de forma no deseable un nivel de hierro en suero bajo, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito bajos. Más preferentemente, un sujeto humano está en riesgo de padecer, o padece, anemia, incluidas, pero sin limitación, anemia consecuencia de infección, inflamación, enfermedad crónica y/o cáncer.

Adicionalmente, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de anemia, incluidas, pero sin limitación, anemia consecuencia de una infección, inflamación, enfermedad crónica y cáncer.

Los anticuerpos selectivos de hepcidina-25 de la presente invención también son útiles para la prevención y el tratamiento de enfermedades y afecciones promovidas por hepcidina-25. Los Mab selectivos de anti-hepcidina-25 de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas para la inmunización pasiva de hepcidina-25. También pueden incorporarse a las composiciones farmacéuticas y aplicarse en el tratamiento fragmentos funcionales de los MAb de la presente invención, tales como, por ejemplo, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> y cualquier fragmento que retenga la capacidad de unirse selectivamente a hepcidina-25.

Además, los Mab selectivos de hepcidina-25 de la presente invención pueden aplicarse en inmunoensayos para realizar un seguimiento de la progresión de enfermedades y afecciones promovidas por hepcidina-25 en las que el nivel o cantidad de hepcidina-25 proporciona una indicación del suceso de tratamiento o terapia, o de la progresión de la enfermedad o afección.

Además, los Mab de la presente invención son útiles en procedimientos de evaluación de un tratamiento de bloqueo de hepcidina-25 de un paciente que padece una enfermedad o afección promovida por hepcidina-25. El procedimiento incluye las etapas de:

a) obtener una primera muestra de fluido biológico del paciente antes, o en las primeras etapas, de un tratamiento;

b) determinar el nivel de hepcidina-25 en la primera muestra mediante un procedimiento de inmunoensayo;

c) obtener una segunda muestra de un fluido biológico de un paciente después de un tiempo adecuado dentro del cual el tratamiento tendría efecto;

d) determinar el nivel de hepcidina-25 en la segunda muestra mediante un procedimiento de inmunoensayo;

e) comparar las cantidades determinadas de hepcidina-25 en la primera muestra con la cantidad de hepcidina-25 en la segunda muestra para determinar la eficacia del tratamiento de unión o bloqueo de hepcidina-25.

El procedimiento descrito anteriormente aplicado para evaluar un tratamiento de unión a, o un tratamiento de bloqueo de, hepcidina-25 en un paciente es particularmente valioso en la práctica clínica, en la que la toma de decisiones para proceder con un régimen terapéutico u otro puede ser crítica para el resultado para el paciente. El procedimiento de la presente invención proporciona información sobre la que basarse para estas decisiones críticas. El procedimiento proporciona una medición de la cantidad de hepcidina-25 antes, o en las primeras etapas, del tratamiento y proporciona una o más mediciones de hepcidina-25 en uno o más periodos después del inicio del tratamiento, particularmente cuando se espera que el tratamiento que se ha comenzado sea eficaz.

El tratamiento de bloqueo de hepcidina-25 puede ser la administración pasiva de anticuerpo selectivo anti-hepcidina-25 a un paciente. El anticuerpo selectivo anti-hepcidina-25 puede ser un anticuerpo quimérico humano/no humano, un anticuerpo selectivo anti-hepcidina-25 monoclonal totalmente humano o humanizado, o cualquier fragmento de anticuerpo selectivo de hepcidina-25 que sea funcional en la unión a hepcidina-25.

Se conocen bien en la técnica una amplia diversidad de procedimientos de detección de la formación de inmunocomplejos, por ejemplo, ELISA, RIA, análisis de inmunotransferencia (por ejemplo, inmunotransferencia por puntos, inmunotransferencia en ranuras, inmunotransferencia Western, etc.), técnicas indirectas de inmunofluorescencia y procedimientos que dependen de la detección de cambios en parámetros físicos, tales como SPR. En un procedimiento usado ampliamente se detecta la formación de inmunocomplejos mediante el uso de un marcador, tal como un radiomarcador o una etiqueta enzimática (tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante). Pueden agregarse ventajas adicionales mediante el uso de un ligando de unión secundario tal como un segundo anticuerpo o una molécula acoplada a avidina para la unión a un ligando biotinilado, según procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los términos "tratamiento" y "tratar", tal como se usan en el presente documento, se refieren a administrar una

sustancia a un paciente que tiene una enfermedad, afección o trastorno descrito en el presente documento, un síntoma de dicha enfermedad, afección o trastorno, o una predisposición a dicha enfermedad, afección o trastorno, para conferir un efecto terapéutico, por ejemplo, para curar, aliviar, alterar, controlar, detener, mejorar o prevenir la enfermedad, afección o trastorno, un síntoma de la misma o una predisposición a la misma. Preferentemente, el paciente tratado es un mamífero y, más preferentemente, un ser humano. Los regímenes de dosificación puede ajustarse para proporcionar una respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una única inyección intravenosa rápida, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

#### 10 Composición farmacéutica

Un anticuerpo de la invención puede incorporarse a una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto humano. Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto humano solo o en combinación con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, tanto en dosis individuales como múltiples. Dichas composiciones farmacéuticas se diseñan para que sean apropiadas para el modo de administración seleccionado y se usan según sea apropiado, diluyentes, vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares. Dichas composiciones pueden diseñarse según técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Los vehículos adecuados para composiciones farmacéuticas incluyen cualquier material que, cuando se combina con un Mab de la invención, conserva la actividad de la molécula y es no reactivo con el sistema inmunitario del sujeto.

Una composición farmacéutica que comprende un Mab anti-hepcidina-25 de la presente invención puede administrarse a un sujeto con riesgo de padecer, o que presenta, patologías tales como las descritas en el presente documento, por ejemplo, trastornos de anemia, usando técnicas de administración estándar.

La frase "cantidad eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad necesaria (en dosis y durante periodos de tiempo y para los medios de administración) para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede variar según factores tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una cantidad eficaz es al menos la cantidad mínima, pero inferior a la cantidad tóxica, de un agente activo que es necesario para impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Dicho de otro modo, una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención es una cantidad que, en mamíferos, preferentemente en seres humanos, (i) aumenta los niveles de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito o (ii), trata una afección, trastorno o enfermedad en la que la presencia de hepcidina-25 causa o contribuye a un efecto patológico no deseable o (iii) un aumento en los niveles de hepcidina-25 o la bioactividad de hepcidina tiene como consecuencia un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, preferentemente un ser humano, incluida, pero sin limitación, la anemia, incluida, pero sin limitación, la anemia de enfermedad crónica, incluida, pero sin limitación, la anemia consecuencia de infección, inflamación, enfermedad crónica y/o cáncer. Una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención puede administrarse en una dosis individual o en dosis múltiples. Además, una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención puede administrarse en dosis múltiples de cantidades que serían inferiores a una cantidad eficaz si no se administran más de una vez.

Como es bien sabido en las técnicas médicas, las dosificaciones para un sujeto cualquiera dependen de muchos factores, incluidos la frecuencia y la vía de administración, el estado de salud general y de otros fármacos que se están administrando de forma concurrente. La dosis puede variar dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente: 1 a aproximadamente 100 mg; preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg; más preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg; no obstante, se contemplan dosis inferiores o superiores a estos intervalos ejemplares, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente. Un régimen de dosificación por vía parenteral diario puede ser de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Puede realizarse un seguimiento del progreso mediante evaluación periódica y ajustarse las dosis consecuentemente.

Estas cantidades de anticuerpo sugeridas están sujetas a una gran discreción terapéutica. El factor clave para seleccionar una dosis y un esquema apropiados es el resultado obtenido. Los factores que se consideran en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del anticuerpo, el tipo particular de anticuerpo, el procedimiento de administración, la agenda de administración y otros factores conocidos por el especialista médico.

La vía de administración de un anticuerpo de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. Preferentemente, los anticuerpos de la invención pueden incorporarse a una composición farmacéutica adecuada para administración por vía parenteral. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. La administración por vía parenteral mediante inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea es preferente. La inyección subcutánea es la más preferente. Los vehículos adecuados para dichas inyecciones son bien conocidos en la técnica.

La composición farmacéutica debe ser normalmente estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento en un recipiente proporcionado, incluyendo, por ejemplo, un vial sellado, una jeringa u otro dispositivo de administración, por ejemplo, una pluma. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas pueden filtrarse de forma estéril después de preparar la formulación, o se hacen microbiológicamente aceptables de otro modo.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ningún modo.

## EJEMPLOS

### 15 Ejemplo 1: Producción de hepcidina-25 humana

La hepcidina-25 puede obtenerse de fuentes comerciales (por ejemplo, Peptide International (Louisville, Kentucky) ) o puede producirse por diversas técnicas de síntesis o recombinantes conocidas en la técnica. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende los veinticinco aminoácidos de la hepcidina-25 humana y que tiene la secuencia que se muestra en SEC ID N°: 95 se expresa en *E. coli*. Los cuerpos de inclusión se aíslan a partir de 3 litros de *E. coli* que expresan la proteína de fusión de hepcidina-25 humana después de 3-6 horas con IPTG 1 mM a 37 °C. Los cuerpos de inclusión se solubilizan en tampón A (Tris 50 mM y urea 8 M (pH 8, 0) ) . El sobrenadante se hace pasar sobre una columna de cromatografía de afinidad metal-ion inmovilizada (IMAC) (20 ml de resina). La columna se lava con tampón A hasta que la absorbancia vuelve a la línea base y los polipéptidos unidos se eluyen por lotes de la columna mediante imidazol 0, 5 M en tampón A. La proteína de fusión hepcidina-25 humana se reúne y se reduce con DTT 50 mM. Esta proteína de fusión se vuelve a plegar después diluyendo material almacenado en urea 2 M, cisteína 3 mM, Tris 50 mM (pH 8, 0) hasta una concentración final de proteína de menos de 50 µg/ml. Este material se agita a temperatura ambiente y se oxida al aire durante 48 horas. Los polipéptidos oxidados se hacen pasar sobre una columna IMAC (20 ml) con un caudal de 5 ml/min y la proteína de fusión de hepcidina-25 humana se eluye por lotes a partir de la columna mediante imidazol 0, 5 M en tampón A. Las fracciones reunidas que contienen la proteína de fusión de hepcidina-25 se concentran y se hacen pasar por una columna de cribado por tamaño (por ejemplo, Superdex® 75, GE Healthcare, XK26/60) equilibrada con Tris 50 mM, urea 4 M, pH 8, 0, a un caudal de 3 ml/min. La proteína de fusión monomérica se agrupa y después se diluye con Tris 50 mM, urea 2M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 8, 0 y después se escinde con enterocinasa produciendo hepcidina-25 humana de SEC ID N°: 1. La proteína de fusión de hepcidina-25 humana no escindida se elimina por cromatografía IMAC pasiva (tal como se indicó anteriormente) . El flujo a través de la columna IMAC se carga después sobre una columna en fase inversa C-18 con un caudal de 4, 0 ml/minuto. La columna se lava con TFA al 0, 1 % en agua hasta que la absorbancia vuelve a la línea base y los polipéptidos unidos se eluyen de la columna con un gradiente lineal de ACN del 20 % al 40 % con TFA al 0,1 % a una velocidad del 0, 5 %/minuto. Las fracciones que contienen el polipéptido hepcidina-25 humano se almacenan y se analizan por secuenciación de aminoácidos N-terminales y por espectrometría de masas con ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-EM) . Los polipéptidos que codifican hepcidina-25 de rata, ratón y monogomolgus y diversas formas truncadas de modo N-terminal de hepcidina-25 humana que incluyen hepcidina-22 y hepcidina-20 se fabricaron también esencialmente tal como se ha descrito para la hepcidina-25 humana.

### Ejemplo 2: Producción de anticuerpos de hepcidina-25 N-terminales

Los ratones se inmunizan con un péptido hepcidina N-terminal (aminoácidos 1-7 de SEC ID N°: 1) conjugado con un enlazador peptídico de cinco aminoácidos (es decir, GPGPG) a una secuencia peptídica OVA (aminoácidos 323-336), es decir, DTHFPICGPGPGISQAVHAAHAEINE (SEC ID N°: 87) inmunógena de longitud completa y se recogen los bazos de estos ratones el día 27. Los linfocitos B se ajustan a 1 célula por pocillo para células de memoria de Ag<sup>+</sup> y IgG<sup>+</sup> y de centro germinal y se cultivan conjuntamente con células EL4B durante 2 semanas. La IgG resultante que contiene sobrenadantes se diluye después 1,4 veces y se somete a cribado en los tres formatos de ELISA siguientes: 1) placas de 96 pocillos recubiertas con proteína de unión NEUTRAVIDIN™, una forma desglucosilada y isoeléctricamente neutra de avidina (Pierce Biotechnology, Rockville, IL), a una concentración de 2 µg/ml en tampón de carbonato durante toda la noche. Los sitios de unión no específica se bloquean con caseína durante 1 hora. Después la placa se lava 3 veces con PBS con el 0,05 % de Tween-20 y se incuba hepcidina biotinilada 100 nM en la placa durante 1 hora. La placa se lava de nuevo tal como se ha descrito. Los sobrenadantes de IgG del cultivo se incuban después durante 1 hora y la placa se lava. Se detecta la unión específica del anticuerpo de hepcidina-25 mediante 0,5 µg/ml de Fc- $\gamma$ -fosfatasa alcalina de IgG de cabra anti-ratón. La actividad de fosfatasa alcalina se mide añadiendo una cantidad apropiada de sustrato PMP/AMP (6 mg/ml de monofosfato

fenolfaleína (PMP) en Tris 0,5 M, pH 10,2, 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) al 2 %, NaN<sub>3</sub> al 0,1 %) y se mide la cantidad de absorbancia a 560 nm ; 2) se recubren placas de 96 pocillos con kappa IgG de cabra anti-ratón a una concentración de 2 µg/ml en tampón de carbonato durante toda la noche. Los sitios de unión no específica se bloquean después con caseína durante 1 hora. La placa se lava 3 veces con PBS con el 0,05 % de Tween-20 y los sobrenadantes de IgG del cultivo se incuban durante 1 hora. Después se incuban hepcidina-25 biotinilada (100 nM) en la placa durante 1 hora y la placa se lava tal como se ha descrito previamente. Después se detecta la unión específica de hepcidina-25 al anticuerpo capturado añadiendo 1 µg/ml de NEUTRAVIDIN-AP™, un conjugado de NEUTRAVIDIN™-fosfatasa alcalina (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y se detecta la actividad de fosfatasa alcalina añadiendo sustrato PMP/AMP y se mide la absorbancia a 560 nm; y 3) se recubren placas de 96 pocillos con hepcidina-25 100 nM en agua durante toda la noche a 37 °C. Los sitios de unión no específica se bloquean después con caseína durante 1 hora y la placa se lava 3 veces con PBS con el 0,05 % de Tween-20. Los sobrenadantes de IgG del cultivo se incuban después durante 1 hora y la placa se lava de nuevo tal como se ha descrito. Se detecta la unión específica del anticuerpo de hepcidina-25 N-terminal mediante 0,5 µg/ml de Fc- fosfatasa alcalina de IgG de cabra anti-ratón. Se mide la actividad de fosfatasa alcalina con sustrato PMP/AMP y la cantidad de absorbancia se mide a 560 nm.

Se usan después linfocitos B que expresan anticuerpos de ratón específicos para el extremo N-terminal de hepcidina-25 tales como 3A9, 4C11 y 5E8 para aislar ARN y las regiones variables se amplificaron mediante RT-PCR y subsiguientemente se clonaron en vectores de IgG1 de ratón disponibles comercialmente o la cadena pesada y ligera respectivamente. Los anticuerpos de ratón expresados de forma transitoria se confirmaron como anticuerpos específicos de hepcidina-25 N-terminales usando SPR.

### Ejemplo 3: Medidas de unión de afinidad de Fab y Mab anti-hepcidina-25 usando SPR

Para medir las cinéticas y afinidad de unión de anticuerpos tales como los anticuerpos divulgados en el presente documento puede usarse un biosensor de SPR tal como el BIAcore® T100. El sistema BIAcore® usa las propiedades ópticas de SPR para detectar la alteración en concentración de proteínas de moléculas que interactúan con una matriz de biosensor de dextrano. Excepto lo indicado, todos los reactivos y materiales se adquieren de BIAcore® AB (Upsala, Suecia). Todas las mediciones se llevan a cabo a 25 °C. Las muestras se disuelven en tampón HBS-EP (cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P-20 al 0,05 % (p/v) y HEPES 10 mM, pH 7,4). Para capturar Fab con kappa humana, se inmoviliza kappa anti-humano de cabra en células de flujo 1 a 4 de un chip sensor CM5 a un nivel de 5000-10000 unidades de respuesta (Rus) usando un kit de acoplamiento de amina. Para capturar Mab con IgG1 de ratón, se inmoviliza Fc gamma de anti-ratón de cabra en las células de flujo 1 a 4 de un chip sensor CM5 a un nivel de 5000-10000 Rus usando un kit de acoplamiento de amina. Para capturar anticuerpos con IgG4 humana se inmoviliza proteína A en las células de flujo 1 a 4 de un chip sensor CM4 a un nivel de 400-700 Rus usando un kit de acoplamiento de amina. Se evalúan Fab preparados a partir de periplasma de E. coli y Mabs preparados a partir de cultivos de células de mamífero usando múltiples ciclos analíticos. Cada ciclo consiste en las etapas siguientes: inyección de 0, 3-2 minutos de un Fab o un Mab a <10 µl/minuto dirigida a una captura de 200-1000 Rus, inyección de 2 minutos a 50 µl/minuto de diversas concentraciones de hepcidina-25 humana (desde 600 nM a 0, 1 nM) obtenidas tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior seguido por 2-10 minutos para disociación y regeneración usando 30 µl de clorhidrato de glicina 10 mM, pH 1, 5. Las mediciones se obtuvieron a 25 °C y las velocidades de asociación y disociación para cada ciclo se evaluaron usando un modelo de unión "1:1 con transferencia de masas" en el programa informático BIAevaluation.

Los anticuerpos monoclonales de ratón 3A9, 4C11, 5E8, OB3, OH4, OB1 y OE1 muestran una unión a hepcidina-25 con una afinidad ( $K_D$ ) de aproximadamente 36 nM a aproximadamente 1 nM. El anticuerpo monoclonal de ratón OH4 se une a hepcidina-25 humana con una  $K_D$  de aproximadamente 1,2 nM pero no se une de forma detectable a hepcidina-20 humana o hepcidina-22 humana. El anticuerpo monoclonal de ratón 5E8 se une a hepcidina-25 humano pero no es una de forma detectable a hepcidina-25 de ratón o de rata. El anticuerpo monoclonal de ratón 4C11 se une a hepcidina-25 humana, de rata o de ratón y en una medida muy inferior a hepcidina-22 humana (aproximadamente 209 nM) pero no a hepcidina-20 humana.

### Ejemplo 4: Identificación de un par de Mab que se une a hepcidina-25 humana simultáneamente

Los anticuerpos monoclonales generados contra los aminoácidos 1-7, inclusive, de hepcidina-25 humana que mostraron una unión de afinidad alta a hepcidina-25 humana por análisis SPR se analizaron para determinar su capacidad para unirse simultáneamente a hepcidina-25 humana con Mab 3.23.

Brevemente, sobre un Biacore® T100, se inmovilizó anticuerpo policlonal IgG1 Fc de cabra anti-ratón 1 en una célula de flujo 1 a 4 de chip CM5 a 5000 - 15000 unidades de respuesta (Ru). El Mab 5E8 se capturó en la célula de flujo 2, el Mab 4C11 se capturó en la célula de flujo 3 y el Mab 3A9 se capturó en la célula de flujo 4. La célula de flujo 1 se usó como célula de flujo de referencia. Se inyectaron después a todas las células de flujo hepcidina-25 humana. Las células de flujo con Mab 5E8, 4C11 y 3A9 inmovilizados en las mismas mostraron todas un aumento de Ru, indicando la unión de esos Mab a hepcidina-25 humana. Después, se inyectó a todas las células de flujo Mab 3.23. Solo la célula de flujo 2, con Mab 5E8 inmovilizado en la misma mostró una unión simultánea de hepcidina-25 humana mediante los Mab 5E8 y 3.23.

Adicionalmente, los Mab Hu22, 3.23, 3.12, y un anticuerpo de IgG4 humano de control negativo se inmovilizaron en células de flujo separadas de un chip Sensor Chip\_CM4 (Biacore) a 1000 - 4000 Ru. Después, se inyectó en las células de flujo hepcidina-25 humana. Después, se inyectó a las células de flujo Mab 5E8. Las células de flujo que tenían Mab Hu22, 3.23 y 3.12 inmovilizados en las mismas mostraron la unión de hepcidina-25 humana y después simultáneamente la unión de Mab 5E8. La célula de flujo que tenía la IgG4 inmovilizada en la misma no mostró unión ni a hepcidina-25 humana ni a Mab 5E8. Además, el Mab 5E8 no se une a hepcidina-25 simultáneamente con antisuero policlonal de conejo obtenido para péptidos conjugados a KLH que consisten en los aminoácidos 1-7 de hepcidina-25 humana o de ratón (Alpha Diagnostic International, San Antonio TX; N° de cat. Hepc13-S) no con preparación purificada de IgG del mismo (Alpha Diagnostic International; N° de cat. Hepc13-A)).

#### 10 **Ejemplo 5: Ensayo de ELISA de tipo emparedado para medir hepcidina-25 humana**

Los pocillos de una placa de varios pocillos se recubrieron durante 1 hora a temperatura ambiente con Mab 3.23 a una concentración de 2 mg/l en tampón de recubrimiento carbonato-bicarbonato, pH 9,40 (Pierce Biotechnology, Rockville, IL). Después, los pocillos se aspiraron y se lavaron 3 veces con TBST (solución salina tamponada de TRIS que contenía 10 mmol/l de Tris, pH 7,4, 150 mmol/l de NaCl con 1 ml de Tween-20/l). Después los pocillos se bloquearon durante 1 hora con tampón de bloqueo TBS-caseína (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, caseína al 1 %, pH 7,4, con Kathon antimicrobiano (Pierce Biotechnology; N° de cat. 37532). Después, se añaden 100 µl de un patron de hepcidina-25 (concentraciones variadas de hepcidina-25 humana sintetizada en tampón de ensayo que consiste en 50 mmol/l de HEPES, pH 7,40, 150 mmol/l de NaCl, 10 ml/l de tensioactivo no iónico Triton® X-100 (Union Carbide Corp., Danbury, CT), 5 mmol/l de EDTA y 5 mmol/l de ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) a un conjunto de los pocillos para generar una curva de calibración. Después, las muestras de suero se diluyen 1:20 en tampón de ensayo y se añaden a sus respectivos pocillos y la placa de ELISA se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la aspiración, los pocillos se lavan 3 veces con TBST y se añaden 100 µl de una dilución 1:1000 de Mab 5E8 anti-hepcidina-25 biotinilado con una concentración de 1 mg/ml a los pocillos durante una incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Después de la aspiración, los pocillos se lavan 3 veces con TBST y se añaden 100 µl de una solución de poli-estreptavidina-HRP (Pierce Biotechnology, Rockville, IL) a los pocillos durante una incubación de 30 min a temperatura ambiente. Después, los pocillos se lavan 3 veces con TBST. Después de la última aspiración de TBST, se añaden 100 µl de sustrato de desarrollo 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Pierce Biotechnology, Rockville, IL) a los pocillos y se dejan incubar durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con un volumen igual de ácido fosfórico 2 N y las placas se leen a 450 nm.

Las concentraciones en suero de hepcidina-25 de 40 pacientes normales y con cáncer medidas mediante un ensayo ELISA de tipo emparedado descrito anteriormente variaron de 5 a 656 µg/l y se correlacionaron directamente con concentraciones en suero de hepcidina-25 medidas usando un ensayo de CL/EM estándar ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,0001$ ) (véase, Murphy y col., (2007)) Además, se determinó que 100 muestras de suero humanas de donantes sanos (50 hombres y 50 mujeres; con una edad que variaba de 18 a 66 años, 37 años de media) obtenidas de Bioreclamation, Inc. (East Meadow, NJ) tenían concentraciones de hepcidina-25 que variaban de <1-79 µg/ml. Adicionalmente, el ensayo de ELISA de tipo emparedado detectó el peptide de control de hepcidina-25 humana de un modo dependiente de la dosis en una medida inferior a al menos 1 ng/ml. Por otra parte, ni el péptido de control de hepcidina-25 humana (hasta 2 ng/ml) ni la hepcidina-25 endógena en un control positivo de muestra de suero humano, es decir, determinado previamente por ensayo de CL/EM que contenía hepcidina-25, es detectable en el mismo ensayo cuando se sustituye Mab 5E8 por i) antisuero policlona de conejo generado para péptidos conjugados de KLH que consisten en los aminoácidos 1-7 de hepcidina-25 humana y de ratón (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; N° de cat. Hepc13-S) o ii) una preparación purificada de IgG del mismo (Alpha Diagnostic International; N° de cat. Hepc13-A)). Además, ni el patrón de hepcidina-25 ni el control positivo de muestra de suero humano fueron detectables cuando el antisuero HEPC-13-S o la preparación purificada de IgG del mismo i) se recubrieron en pocillos separados de la placa de ensayo, es decir, como los anticuerpos de captura, ii) se añadieron al ensayo como anticuerpo de detección conjugados con biotina o iii) se añadieron al ensayo como anticuerpos de detección no conjugados, es decir, con su unión analizada subsiguientemente mediante el uso de un anticuerpo secundario de IgG anticonejo.

El peptide de control de hepcidina-25 humana y la hepcidina-25 endógena no se detectaron en la muestra de control positivo de suero humano cuando se realizó el ensayo de ELISA de tipo emparedado usando Mab 5E8 como el anticuerpo de captura y se emparejaron con una IgG policlona de conejo disponible comercialmente obtenida contra un conjugado de KLH, péptido C-terminal de hepcidina humana madura de 13 aminoácidos (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; N° de cat. HEPC12-A).

#### **Ejemplo 6: Determinación de selectividad de anticuerpos anti-hepcidina usando MALDI-TOF**

El diagnóstico clínico de rutina de biomarcadores se basa mayoritariamente en técnicas inmunológicas cuantitativas por ejemplo, ELISA. Estos procedimientos son a menudo no aplicables para antígenos pequeños o para isoformas de antígenos (Sparbier, K., International Meeting of the Association of Biomolecular Resource Facilities, Salt Lake City, Cartel V28-S, (2008), y Gutiérrez, J.A., y col., (2005)). Los Mab o Fab pueden evaluarse para determinar su capacidad de inmunoprecipitar selectivamente hepcidina-25 endógena, mejor que precursores o formas truncadas de la misma, a partir de suero humano mediante espectrometría de masas MALDI-TOF sobre polipéptidos de hepcidina unidos a anticuerpos realizada después de la reducción de la muestra.

Los Mab o Fab de hepcidina anti-humana se recubren en pocillos separados de una placa estándar de ELISA de 96 pocillos en tampón de carbonato-bicarbonato (pH 9,4) durante 1 hora a temperatura ambiente a una concentración de 2 mg/l. Después, los pocillos se aspiran y se lavan 3 veces con TBST. Las muestras de suero humano que contenían una cantidad conocida de hepcidina-25 (diluida en tampón de ensayo) se añaden a 100 µl/pocillo durante una hora a temperatura ambiente. Después, los pocillos se aspiran y se lavan 3 veces con TBST. Los polipéptidos de hepcidina capturados se eluyen añadiendo 40 µl/pocillo de ácido fórmico al 0,1 % durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras eluidas se recogen y se concentran con C4 ZipTip™ (Millipore, Billerica, MA), una punta de pipeta de 10 µl con un lecho de medio de cromatografía para la purificación y la concentración de femtomoles a picomoles de proteína o péptidos, que varían de forma ideal de un PM de 25.000 a un PM de 100.000. Una mitad de un microlitro de muestra se dispone sobre una diana MALDI y se añade un volumen igual de solución de matriz (50 % de acetonitrilo, 0,1 % de TFA saturado con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico) a la muestra. La muestra se seca y se analiza con un espectrómetro de masas 4700 TOF-TOF (Applied Biosystems) operado en el modo lineal.

Los experimentos realizados usando espectrometría MALDI-TOF esencialmente tal como se ha descrito justo anteriormente mostraban que el Mab 3.23 se une a hepcidina-25 y, en mucha menor medida, a hepcidina-20 (Figuras 1 y 2). El Mab 3.23 no parece que se una a niveles detectables de hepcidina-22 (PM: 2436 Da), hepcidina-24 (PM: 2674 Da) o pro-hepcidina (PM: 6929 Da), asumiendo, por supuesto, que las muestras de sueros analizadas también contenían cantidades esperadas de estas formas de hepcidina humana.

Se realizaron experimentos similares usando espectrometría MALDI-TOF para determinar que especies de hepcidina en suero humano se unen mediante Mab 5E8. Estos experimentos determinaron que el Mab 5E8 se une solo a hepcidina-25 en suero humano (Figuras 3 y 4). De forma importante, ni hepcidina-20, ni hepcidina-22, ni pro-hepcidina ni otras especies de hepcidina se unieron a Mab 5E8, asumiendo, de nuevo, que estas especies de hepcidina humana estaban presentes en las muestras de suero tal como se esperaba.

Por lo tanto, los inmunoensayos usando el Mab 5E8, o anticuerpos derivados del mismo o relacionados con el mismo, incluido, pero sin limitación, Mab OH4, son muy específicos y selectivos de hepcidina-25 humana, la forma fisiológicamente relevante activa de hepcidina en suero humano. Otras mejoras en la especificidad y la selectividad se pueden esperar en inmunoensayos de hepcidina-25 humana que combinan el uso de Mab 5E8, o anticuerpos derivados del mismo o relacionados con el mismo, incluido, pero sin limitación, Mab OH4, y Mab 3.23, Mab 3.12, o anticuerpos derivados de los mismos o relacionados con los mismos.

#### **Ejemplo 7: Ensayo ELISA de tipo emparedado para medir hepcidina-25 humana (sin marcado directo de anticuerpos)**

Se realiza un ELISA de tipo emparedado como en el ejemplo 5, excepto en que i) el anticuerpo conjugado etiquetado está sustituido por OH4 no etiquetado ii) la unión del OH4 se detecta indirectamente usando una peroxidada de rábano picante conjugada con anticuerpo de cabra anti-ratón.

Usando Mab 3.23 y Mab OH4 no etiquetado en un ensayo ELISA de tipo emparedado, tal como se ha descrito anteriormente, se detectó selectivamente hepcidina-25 en suero humano con una sensibilidad de aproximadamente 0,2 ng/ml.

#### **Ejemplo 8: Inmunoensayo de tipo emparedado de descubrimiento a mesoescala para la medición de hepcidina-25 humana**

Se construyó un inmunoensayo de descubrimiento a mesoescala de hepcidina-25 humana (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) (MSD) usando los reactivos descritos anteriormente. Brevemente, se biotiniló 1 mg de Mab OH4 usando un kit disponible comercialmente (Pierce Biotechnology, Rockville, IL) se diluyó en glicerina al 50 % y se almacenó a -20 °C hasta que se necesitó. Se incubaron pocillos recubiertos con estreptavidina y bloqueados de una placa de ELISA durante 1 hora con Mab OH4 biotinilado a una concentración de 2 mg/l. Después, los pocillos se aspiraron y se lavaron tres veces con TBST (solución salina tamponada con Tris que contenía 10 mmol/l de Tris, pH 7,40, 150 mmol/l de NaCl con 1 ml de Tween 20/l). A continuación, se añadieron 100 µl de patrones de hepcidina (concentraciones variadas de proteína de hepcidina-25 en tampón de ensayo que consiste en 50 mmol/l de HEPES, pH 7,40, 150 mmol/l de NaCl, 10 ml/l de Triton X-100, 5 mmol/l de EDTA y 5 mmol/l de EGTA) a los pocillos para generar una curva de calibración. Al mismo tiempo, las muestras de suero se diluyeron 1:20 en tampón de ensayo y se añadieron a sus respectivos pocillos y la placa de ELISA se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la aspiración, los pocillos se lavaron 3 veces con TBST y se añadieron 100 µl de una dilución 1:1000 de Mab 3.23 marcado con rutenio con una concentración de 1 mg/ml a los pocillos durante una incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Después de la aspiración, los pocillos se lavaron tres veces con TBST, y la placa de ELISA se desarrolló usando un lector de MSD, que pasó un voltaje a través de los pocillos y se registró la electroquimioluminiscencia de rutenio de cada pocillo. El programa informático de MSD y el SigmaPlot versión 8.0 se usaron para ajustar las curvas de calibración para el ELISA.

El emparejamiento óptimo de anticuerpos en el inmunoensayo de MSD de tipo emparedado se determinó de modo que se emparejara Mab OH4 como el anticuerpo de captura y el Mab 3.23 como el anticuerpo conjugado. La proteína de hepcidina-25 sintetizada se preparó a una concentración de 10 µg/l y se diluyó serialmente para crear

una curva patrón. Tal como indica la figura 5, se encontró que el ELISA tenía un intervalo dinámico, un valor de fondo y sensibilidad aceptables. Basándose en tres evaluaciones de la desviación típica a partir del calibrador de cero, se determinó que la sensibilidad del inmunoensayo era superior a 0,01 µg/l, lo que indica que el inmunoensayo debe tener una sensibilidad más que adecuada para medir niveles de hepcidina-25 en suero humano, basada en estimaciones previas de niveles de hepcidina-25 en suero humano medidos mediante ensayos de tipo CL/EM (Murphy y col., (2007)). Los datos representados en la figura 2 también indican que el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado es selectivo para hepcidina-25 ya que no se detectó hepcidina-20 o hepcidina-22. Además, se determinó que las curvas de dilución del inmunoensayo para el patrón recombinante y las muestras de suero humano reales eran paralelas, y el inmunoensayo demostró una linealidad de dilución excelente para muestras de suero humano (datos no mostrados).

La selectividad y sensibilidad del inmunoensayo de tipo emparejado MSD se comparó con un ensayo de CL/EM estándar oro descrito previamente (Murphy y col., (2007)). Más específicamente, cincuenta y dos (52) muestras de suero humano de una mezcla de sujetos normales y pacientes de cáncer se analizaron usando el inmunoensayo de ELISA de tipo emparejado, rasí como el ensayo de CL/EM descrito previamente mostraron ser específicos para hepcidina-25 (Murphy y col., (2007)). Los resultados de esta comparación mostraron que los valores de hepcidina-25 determinados usando el inmunoensayo de MSD se correlacionaron de forma muy elevada con los valores de los ensayos con CL/EM de hepcidina-25 ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,00001$ ), confirmando que el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado mide específica y selectivamente hepcidina-25 en muestras de suero humano (data not shown).

Se evaluaron diversos parámetros del inmunoensayo de MSD de tipo emparejado usando muestras de suero humano. Más específicamente, se evaluó la estabilidad congelación-descongelación analizando cuatro muestras de suero diferentes. Estos resultados mostraron que el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado posee una estabilidad congelación-descongelación con una consistencia del 80-120 % de recuperación de hepcidina-25 incluso después de 5 ciclos de congelación-descongelación. Los resultados individuales para los ciclos de congelación-descongelación fueron los siguientes: muestra A - 0,16, 0,16, 0,17, 0,17, 0,17 y 0,17 µg/l respectivamente; muestra B - 4,5, 4,4, 4,6, 4,6, 4,6 y 4,4 µg/l respectivamente; muestra C - 8,9, 9,6, 9,7, 9,7, 9,9 y 9,6 µg/l, respectivamente y muestra D - 15,1, 15,1, 15,4, 15,7, 15,4 y 15,4 µg/l respectivamente. La precisión del inmunoensayo de MSD de tipo emparejado se evaluó usando muestras de suero humano que contenían 0,16, 4,5 y 15,1 µg/l de hepcidina-25 endógena. Los resultados de precisión intraensayo ( $n = 20$ ) (CV) fueron del 3,4 %, 4,5 % y 3,5 %, respectivamente en los niveles anteriores, indicando una precisión aceptable en todas las concentraciones de hepcidina-25 analizadas.

Para evaluar la recuperación de proteína de hepcidina-25 añadida a suero humano, se añadió proteína de hepcidina-25 sintetizada a cuatro muestras de suero humano diferentes (que contenía cada una concentraciones muy bajas de hepcidina-25 endógena), a concentraciones de 250, 25, 2,5 y 0,25 µg/l respectivamente. Estas muestras se analizaron usando el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado. Los resultados medios (SD) fueron 287 (6) µg/l, 24,2 (0,2) µg/l, 2,0 (0,1) µg/l y 0,23 (0,01) µg/l, respectivamente, indicando una recuperación del 80-120 % en todos los niveles de hepcidina-25 analizados.

El intervalo normal del inmunoensayo de MSD de tipo emparejado se estableció analizando 100 muestras de suero de voluntarios sanos normales (50 hombres y 50 mujeres). Los valores de hepcidina-25 en estas muestras varían de  $< 0,02$  µg/l a 25 µg/l, con un valor medio de  $3,0 \pm 0,5$  µg/l, coherente con los niveles de hepcidina-25 comunicados previamente en seres humanos normales usando ensayos de CL/EM (véase, Murphy y col., Blood, 110:1048-54 (2007)).

De forma interesante, se encontró que los niveles de hepcidina-25 en seres humanos normales eran significativamente inferiores ( $p < 0,01$ ) en mujeres ( $1,8 \pm 0,4$  µg/l) en comparación con hombres ( $4,2 \pm 0,8$  µg/l). Los niveles de hepcidina-25 en estos sujetos normales también se compararon con concentraciones de ferritina en suero y se encontró que estaban directamente correlacionados con niveles de ferritina en suero ( $r = 0,71$ ,  $p < 0,001$ ) (datos no mostrados).

Finalmente, se compararon niveles de hepcidina-25 en el suero de pacientes con cáncer ( $n = 34$ ) con niveles de hepcidina-25 en el suero de voluntarios sanos normales ( $n = 100$ ), determinados cada uno por el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado. Los resultados de esta comparación demostraron que los niveles de hepcidina-25 son significativamente ( $p < 0,001$ ) elevados en pacientes con cáncer ( $70,9 \pm 10,4$  µg/l) en comparación con controles normales ( $3,0 \pm 0,5$  µg/l) (datos no mostrados). De forma interesante, cohortes de pacientes con tumores malignos hematológicos ( $83,3 \pm 11,9$  µg/l) y no hematológicos ( $58,4 \pm 17$  µg/l) mostraron cada uno niveles de hepcidina-25 aumentados en comparación con controles normales ( $p < 0,001$  para ambos), lo que sugiere que niveles de hepcidina-25 elevados pueden tener un papel importante en anemia asociada con cáncer (datos no mostrados).

En comparación con los procedimientos de ELISA existentes, que son no específicos para hepcidina-25 y pueden reaccionar de forma cruzada con prohepcidina y otras especies de hepcidina no relevantes, el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado descrito en el presente documento mide específica y selectivamente niveles de hepcidina-25 en suero humano y se correlaciona bien con un ensayo de CL/EM de un procedimiento de patrón oro descrito previamente para hepcidina-25. Una ventaja del inmunoensayo de MSD de tipo emparejado sobre un procedimiento de tipo CL/EM para medir niveles de hepcidina en suero es que el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado

5 puede implementarse en la mayor parte de laboratorios clínicos, que generalmente no tienen ni equipos complejos ni un operador muy especializado con la experiencia requerida para realizar rutinariamente ensayos de tipo CL/EM. Además, el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado debería tener el potencial de un rendimiento mucho más elevado que el ensayo de CL/EM. Por lo tanto, el inmunoensayo de MSD de tipo emparejado proporciona un procedimiento que puede usarse de forma rutinaria clínicamente para medir selectivamente niveles de hepcidina-25 en sujetos humanos.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Eli Lilly y colaboradores

10 <120> ANTICUERPOS SELECTIVOS ANTI-HEPCIDINA-25 Y USO DE LOS MISMOS

<130> X18122

<150> 61/086557

15 <151> 2008-08-06

<160> 90

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

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> 2

<211> 25

ES 2 432 018 T3

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 2

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Leu Phe Cys Cys Lys Cys Cys Lys Asn  
1 5 10 15

5 Ser Ser Cys Gly Leu Cys Cys Ile Thr  
20 25

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 3

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn Asn  
1 5 10 15

Ser Gln Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr  
20 25

<210> 4

<211> 25

15 <212> PRT

<213> macaca sp.

<400> 4

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 Arg Thr  
20 25

20 <210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 5

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys  
1 5

10 <210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

20 <223> Xaa en la posición 6 es Val o Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

25 <223> Xaa en la posición 8 es Tyr o Ser

<400> 6

Ser Ala Ser Ser Ser Xaa Ser Xaa Met Tyr  
1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa en la posición 4 es Asn o His

15 <400> 7

Leu Thr Ser Xaa Leu Ala Ser  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Asn, Gly o Tyr

<400> 8

Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Pro Pro Thr  
1 5

5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 9

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
1 5 10

15

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 10

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

25

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 11

10           Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr  
              1                               5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 12

20           Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met Tyr  
              1                               5                               10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 13

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser  
1 5

<210> 14

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético

<400> 14

Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr  
1 5

<210> 15

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Constructo sintético

<400> 15

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Met Tyr  
1 5 10

<210> 16

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
1 5

<210> 17

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

20 <223> Xaa en la posición 9 es Ser, Arg o Pro

<400> 17

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

<210> 18

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

5 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa en la posición 7 es Ser o Pro

10 <400> 18

Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Xaa
1				5		

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

20 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa en la posición 1 es Val, His, Ile o Phe

25 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa en la posición 9 es Thr o Val

<400> 19

Xaa Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Xaa  
1 5

5 <210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr  
1 5 10 15

15 <210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 21

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser  
1 5

25 <210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

5

<400> 22

Val Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr  
1 5

<210> 23

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15

<400> 23

His Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr  
1 5

<210> 24

<211> 16

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25

<400> 24

ES 2 432 018 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr  
1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 25

Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro  
1 5

10

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 26

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

20

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 27

Ile Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Thr  
1 5

5 <210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 28

Phe Gln Gly Ser His Phe Pro Trp Val  
1 5

15 <210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Phe, Tyr o Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

5 <223> Xaa en la posición 5 es Ser o Asn

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

10 <223> Xaa en la posición 6 es Thr o Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

15 <223> Xaa en la posición 7 es Tyr o Pro

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

20 <223> Xaa en la posición 9 es Ile o Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

25 <223> Xaa en la posición 11 es Val o Ile

<400> 29



# ES 2 432 018 T3

<223> Xaa en la posición 13 es Ala o Thr

<400> 30

His	Ile	Trp	Trp	Asn	Xaa	Xaa	Lys	Xaa	Tyr	Asn	Thr	Xaa	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

5 <210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly o His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Ser o Asn

<220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (7)..(7)

<223> Xaa en la posición 7 es Thr o Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa en la posición 8 es Ser, Ala o Tyr

5 <400> 31

Ile Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Gly Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15 <400> 32

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Ile Gly Val Gly  
1 5 10

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 33

His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 34

Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Gly Phe Ala Tyr  
1 5 10

10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 35

Gly Tyr Ser Leu Ser Thr Pro Gly Ile Gly Val Gly  
1 5 10

20

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Constructo sintético

ES 2 432 018 T3

<400> 36

His Ile Trp Trp Asn Asp Ala Lys Ser Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 37

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10

<400> 37

Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 38

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

20 <400> 38

Gly Leu Ser Leu Ser Thr Pro Gly Ile Gly Val Gly  
1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

ES 2 432 018 T3

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 39

5 Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr Gly Phe Gly Ile Gly  
1 5 10

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 40

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

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 41

25 Ile His Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 42

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser  
1 5 10

10 <210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 43

Thr Ile Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

20 Gly

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 44

Asp Gly Tyr Ile His  
1 5

<210> 45

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético

<400> 45

Ser Ala Ser Pro Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
1 5 10

<210> 46

15 <211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

25 <223> Xaa en la posición 1 es Asp o Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa en la posición 3 es Leu o Gln

5 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa en la posición 4 es Leu o Met

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Thr o Asn

15 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Ser o Pro

20 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Val o Ala

25 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Tyr o Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (52)..(52)

5 <223> Xaa en la posición 52 es Asn o His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (59)..(59)

10 <223> Xaa en la posición 59 es Ala o Pro

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (76)..(76)

15 <223> Xaa en la posición 76 es Ser o Asn

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (93)..(93)

20 <223> Xaa en la posición 93 es Asn, Tyr o Gly

<400> 46

ES 2 432 018 T3

Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Xaa Ser Xaa Ser Xaa Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Leu Thr Ser Xaa Leu Ala Ser Gly Val Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Xaa Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 47

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa en la posición 1 es Glu o Gln

15 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa en la posición 3 es Lys o Gln

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Lys o Val

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Gln o Glu

<220>

15 <221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Phe, Tyr o Leu

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Ser o Asn

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Thr o Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa en la posición 32 es Tyr o Pro

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa en la posición 34 es Ile o Phe

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa en la posición 36 es Val o Ile

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (43) ..(43)

<223> Xaa en la posición 43 es Ala o Ser

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (51)..(51)

<223> Xaa en la posición 51 es Ala o Thr

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (57)..(57)

<223> Xaa en la posición 57 es Asp o Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (58)..(58)

<223> Xaa en la posición 58 es Asn o Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (60)..(60)

<223> Xaa en la posición 60 es Ser o Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (64)..(64)

<223> Xaa en la posición 64 es Ala o Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (87)..(87)

<223> Xaa en la posición 87 es Val o Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (89)..(89)

<223> Xaa en la posición 89 es Thr o Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (90)..(90)

<223> Xaa en la posición 90 es His o Asp

5 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (97)..(97)

<223> Xaa en la posición 97 es Val o Ala

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (98)..(98)

<223> Xaa en la posición 98 es Leu o Val

15 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (100)..(100)

<223> Xaa en la posición 100 es Gly o His

20 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (104)..(104)

<223> Xaa en la posición 104 es Ser o Asn

25 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (105)..(105)

<223> Xaa en la posición 105 es Thr o Ser

ES 2 432 018 T3

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (106)..(106)

5 <223> Xaa en la posición 106 es Ser, Ala o Tyr

<400> 47

Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Xaa Ser Leu Xaa Xaa Xaa  
20 25 30

Gly Xaa Gly Xaa Gly Trp Ile Arg Gln Pro Xaa Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Xaa His Ile Trp Trp Asn Xaa Xaa Lys Xaa Tyr Asn Thr Xaa  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Xaa Asp Xaa Xaa Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Xaa Xaa Ile Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Gly Phe Ala Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 48

10 <211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 432 018 T3

<223> Constructo sintético

<400> 48

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

5 <210> 49

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 49



ES 2 432 018 T3

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 51

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 51

ES 2 432 018 T3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Tyr Ser Leu Ser Thr Pro  
 20 25 30

Gly Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Ala Lys Ser Tyr Asn Thr Ala  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 52

ES 2 432 018 T3

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Pro Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 53

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10

<400> 53

ES 2 432 018 T3

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 54

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10

<400> 54



ES 2 432 018 T3

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1                   5                   10                   15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Met  
          20                   25                   30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
          35                   40                   45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser  
          50                   55                   60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Met Glu Ala Glu  
65                   70                   75                   80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
          85                   90                   95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
          100                   105

<210> 56

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 56

ES 2 432 018 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Phe Gly Ile Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Thr His Ile Trp Trp Asn Gly Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Thr  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Leu Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Leu Ile His Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 57

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa en la posición 32 es Ser, Arg o Pro

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (61)..(61)

<223> Xaa en la posición 61 es Ser o Pro

5 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (94)..(94)

<223> Xaa en la posición 94 es Val, His, Ile o Phe

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> Xaa en la posición 102 es Thr o Val

15 <400> 57

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Xaa  
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Xaa Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Xaa Gln Gly  
85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

ES 2 432 018 T3

<210> 58

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 58

10

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Asn  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Asp Asp Gly Tyr Ile His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ala

<210> 59

<211> 112

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

ES 2 432 018 T3

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 59

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

5

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Val Gln Gly  
85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

<210> 60

<211> 112

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15

<400> 60

ES 2 432 018 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys His Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 61

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg  
 20 25 30

ES 2 432 018 T3

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys His Gln Gly  
85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

<210> 62

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 62

ES 2 432 018 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro  
          20                   25                   30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
          35                   40                   45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro  
          50                   55                   60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65                   70                   75                   80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Gln Gly  
          85                   90                   95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
          100                   105                   110

<210> 63

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 63

ES 2 432 018 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro  
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

<210> 64

<211> 213

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa en la posición 1 es Asp o Gln

15

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa en la posición 3 es Leu o Gln

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa en la posición 4 es Leu o Met

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Thr o Asn

<220>

15 <221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Ser o Pro

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Val o Ala

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Tyr o Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (52)..(52)

<223> Xaa en la posición 52 es Asn o His

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (59)..(59)

<223> Xaa en la posición 59 es Ala o Pro

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (76)..(76)

<223> Xaa en la posición 76 es Ser o Asn

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (93)..(93)

<223> Xaa en la posición 93 es Asn, Tyr o Gly

20

<400> 64

ES 2 432 018 T3

Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Xaa Ser Xaa Ser Xaa Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Leu Thr Ser Xaa Leu Ala Ser Gly Val Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Xaa Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn  
 130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn  
 145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr  
 180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys  
 210

<210> 65

<211> 445

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

10 <223> Xaa en la posición 1 es Glu o Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

15 <223> Xaa en la posición 3 es Lys o Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

20 <223> Xaa en la posición 5 es Lys o Val

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

25 <223> Xaa en la posición 6 es Gln o Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Phe, Tyr o Leu

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Ser o Asn

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Thr o Ser

<220>

15 <221> MISC\_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa en la posición 32 es Tyr o Pro

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa en la posición 34 es Ile o Phe

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa en la posición 36 es Val o Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Xaa en la posición 43 es Ala o Ser

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (51)..(51)

<223> Xaa en la posición 51 es Ala o Thr

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (57)..(57)

<223> Xaa en la posición 57 es Asp o Gly

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa en la posición 58 es Asn o Ala

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (60)..(60)

<223> Xaa en la posición 60 es Ser o Tyr

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (64)..(64)

<223> Xaa en la posición 64 es Ala o Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (87)..(87)

5 <223> Xaa en la posición 87 es Val o Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (89) .. (89)

10 <223> Xaa en la posición 89 es Thr o Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (90)..(90)

15 <223> Xaa en la posición 90 es His o Asp

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (97)..(97)

20 <223> Xaa en la posición 97 es Val o Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (98)..(98)

25 <223> Xaa en la posición 98 es Leu o Val

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (100)..(100)

<223> Xaa en la posición 100 es Gly o His

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (104)..(104)

<223> Xaa en la posición 104 es Ser o Asn

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (105)..(105)

<223> Xaa en la posición 105 es Thr o Ser

<220>

15 <221> MISC\_FEATURE

<222> (106) .. (106)

<223> Xaa en la posición 106 es Ser, Ala o Tyr

<400> 65

Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Xaa Ser Leu Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Gly Xaa Gly Xaa Gly Trp Ile Arg Gln Pro Xaa Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

20

ES 2 432 018 T3

Trp Leu Xaa His Ile Trp Trp Asn Xaa Xaa Lys Xaa Tyr Asn Thr Xaa  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Xaa Asp Xaa Xaa Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Xaa Xaa Ile Xaa Tyr Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Gly Phe Ala Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser  
115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val  
130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro  
195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly  
210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile  
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys  
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln  
260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln  
275 280 285

ES 2 432 018 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu  
 290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg  
 305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro  
 340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr  
 355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu  
 405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn  
 420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 66

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 66

ES 2 432 018 T3

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn  
 130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn  
 145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr  
 180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys  
 210

<210> 67

<211> 446

ES 2 432 018 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 67

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
1                   5                   10                   15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr  
          20                   25                   30

ES 2 432 018 T3

Gly Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Ser Tyr Asn Thr Ala  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Gly Phe Ala Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
 130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
 180 185 190

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
 195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys  
 210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro  
 245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

ES 2 432 018 T3

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
 275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu  
 290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys  
 305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro  
 340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile  
 355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly  
 370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp  
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp  
 405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
 420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 68

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

ES 2 432 018 T3

<400> 68

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn  
 130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn  
 145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr  
 180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys  
 210

5 <210> 69



ES 2 432 018 T3

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
 130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
 180 185 190

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
 195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys  
 210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro  
 245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
 275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu  
 290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys  
 305 310 315 320

ES 2 432 018 T3

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro  
340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile  
355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp  
405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 70

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 70

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly



<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 71

ES 2 432 018 T3

Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Leu Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Gly Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn  
 130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn  
 145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr  
 180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys  
 210

<210> 72

ES 2 432 018 T3

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 72

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Leu Ser Leu Ser Thr Pro  
20 25 30

Gly Ile Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Ala Lys Ser Tyr Asn Thr Ala  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Thr His Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Val Val Ile Gly Tyr Tyr Gly Ser Thr Ala Gly Phe Ala Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

ES 2 432 018 T3

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
180 185 190

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys  
210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe  
225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro  
245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu  
290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys  
305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro  
340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile  
355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp  
405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

ES 2 432 018 T3

<210> 73

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 73

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly  
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn  
130 135 140

10

ES 2 432 018 T3

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn  
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser  
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr  
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe  
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys  
210

<210> 74

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10

<400> 74

ES 2 432 018 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Phe Gly Ile Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Thr His Ile Trp Trp Asn Gly Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Thr  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Leu Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

<210> 75

Cys Ala Leu Ile His Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met  
 130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
 180 185 190

ES 2 432 018 T3

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
 195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys  
 210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro  
 245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
 275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu  
 290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys  
 305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

ES 2 432 018 T3

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro  
340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile  
355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp  
405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa en la posición 32 es Ser, Arg o Pro

15 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (61)..(61)

ES 2 432 018 T3

<223> Xaa en la posición 61 es Ser o Pro

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (94)..(94)

<223> Xaa en la posición 94 es Val, His, Ile o Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (102)..(102)

<223> Xaa en la posición 102 es Thr o Val

<400> 75

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Xaa  
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Xaa Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Xaa Gln Gly  
85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

ES 2 432 018 T3

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210 215

<210> 76

5 <211> 438

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético

<400> 76

ES 2 432 018 T3

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ile Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Asn  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys



ES 2 432 018 T3

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp  
340 345 350

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile  
355 360 365

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn  
370 375 380

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys  
385 390 395 400

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys  
405 410 415

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu  
420 425 430

Ser His Ser Pro Gly Lys  
435

<210> 77

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 77

ES 2 432 018 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Val Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

<210> 78

ES 2 432 018 T3

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 78

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

ES 2 432 018 T3

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys His Gln Gly  
85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210 215

<210> 79

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 79

ES 2 432 018 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg  
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys His Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

ES 2 432 018 T3

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1                   5                   10                   15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Pro  
                  20                   25                   30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Thr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
          35                   40                   45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Val Pro  
  50                   55                   60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65                   70                   75                   80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Gln Gly  
          85                   90                   95

Ser His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
          100                   105                   110

10

ES 2 432 018 T3

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210 215

<210> 81

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 81

Asp Ile Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly



<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 82

ES 2 432 018 T3

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 Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Ser Thr  
 20 25 30

Tyr Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Arg Thr Ser Pro Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro  
 85 90 95

Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 83

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Constructo sintético

<400> 83

ES 2 432 018 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Leu Ile Tyr  
 20 25 30

Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Asn Phe His Pro Tyr Leu Gly Val Thr Asn Tyr Val Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn  
 195 200 205

ES 2 432 018 T3

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 435 440

<210> 84

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 84

ES 2 432 018 T3

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 Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Ser Thr  
 20 25 30

Tyr Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Arg Thr Ser Thr Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro  
 85 90 95

Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 85

ES 2 432 018 T3

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 85

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Leu Ile Tyr  
20 25 30

Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Asn Phe His Pro Tyr Leu Gly Val Thr Asn Tyr Leu Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
115 120 125

10

ES 2 432 018 T3

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn  
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
355 360 365

ES 2 432 018 T3

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440

<210> 86

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10

<400> 86

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys  
1 5

<210> 87

<211> 26

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

ES 2 432 018 T3

<400> 87

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Gly Pro Gly Pro Gly Ile Ser Gln Ala  
1 5 10 15

Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu  
20 25

<210> 88

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met  
1 5 10 15

10 Cys Cys Lys Thr  
20

<210> 89

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 89

Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys  
1 5 10 15

Gly Met Cys Cys Lys Thr  
20

<210> 90

20 <211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 432 018 T3

<400> 90

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

Gln Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser Trp Met Pro Met Phe Gln Arg  
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly  
35 40 45

Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr  
50 55 60

5

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a hepcidina-25 humana que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: en donde el anticuerpo comprende seis CDR seleccionadas del grupo que consiste en:
- (i) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 9, 10, 11, 32, 33 y 34, respectivamente.
- (ii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 12, 13, 14, 35, 36 y 37, respectivamente.
- 10 (iii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 45, 13, 14, 35, 36 y 37, respectivamente.
- (iv) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 12, 13, 14, 38, 36 y 37, respectivamente.
- 15 (v) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 15, 10, 16, 39, 40 y 41, respectivamente.
- (vi) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 22, 42, 43 y 44, respectivamente.
- (vii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 23, 42, 43 y 44, respectivamente.
- 20 (viii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 24, 25, 23, 42, 43 y 44, respectivamente.
- (ix) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 27, 42, 43 y 44, respectivamente.
- 25 (x) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 28, 42, 43 y 44, respectivamente.
- (xi) LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>MY (SEC ID N°: 6) LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos LTSX<sub>3</sub>LAS (SEC ID N°: 7) LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos QQWSSX<sub>4</sub>PPT (SEC ID N°: 8) HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos GX<sub>9</sub>SLX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>GX<sub>13</sub>GX<sub>14</sub>G (SEC ID N°: 29) HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos HIWWN X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>KX<sub>17</sub>YNTX<sub>18</sub>LKS (SEC ID N°: 30) y HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos IX<sub>19</sub>YYG X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>GFAY (SEC ID N°: 31), en la que X<sub>1</sub> es V o A, X<sub>2</sub> es Y o S, X<sub>3</sub> es N o H, X<sub>4</sub> es N, G o Y, X<sub>9</sub> es F, Y o L, X<sub>10</sub> es S o N, X<sub>11</sub> es T o S, X<sub>12</sub> es Y o P, X<sub>13</sub> es I o F, X<sub>14</sub> es V o I, X<sub>15</sub> es D o G, X<sub>16</sub> es A o N; X<sub>17</sub> es S o Y, X<sub>18</sub> es A o T, X<sub>19</sub> es G o H, X<sub>20</sub> es S o N, X<sub>21</sub> es T o S, y X<sub>22</sub> es S, A o Y; y
- 30 (xii) LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos KSSQSLLYX<sub>5</sub>NGKTYLT (SEC ID N°: 17) LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos LVSKLDX<sub>6</sub> (SEC ID N°: 18) LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos X<sub>7</sub>QGSHFPWX<sub>8</sub> (SEC ID N°: 19) HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos GFAFSSYDMS (SEC ID N°: 42), HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos TIISGGTYTYPPDSVKG (SEC ID N°: 43) y HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos DGYIH (SEC ID N°: 44), en la que X<sub>5</sub> es S, R o P, X<sub>6</sub> es S o P, X<sub>7</sub> es V, H, I o F y X<sub>8</sub> es T o V.
- 35
- 40 **2.** El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une selectivamente a hepcidina-25 humana que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: con una K<sub>D</sub> entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 800 pM tal como se determina por resonancia de plasmón superficial (SPR) a 25 °C.
- 3.** El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el anticuerpo se une a prohepcidina y a hepcidina-20 humana con una K<sub>D</sub> que es al menos aproximadamente 10 veces superior a la del anticuerpo que se une a hepcidina-25 humana según se determina por SPR a 25 °C.
- 45 **4.** El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo se une a hepcidina-22 humana con una K<sub>D</sub> superior a aproximadamente 200 nM según se determina por SPR a 25 °C.
- 5.** El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que además se une a las SEC ID N°: 3 y 2 de hepcidina-25 de ratón y/o de rata, respectivamente, con una K<sub>D</sub> inferior a aproximadamente 500 nM tal como se determina por SPR a 25 °C.
- 50 **6.** El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, siendo el anticuerpo un fragmento de anticuerpo que comprende la porción de unión a antígeno y conserva su capacidad de unión a antígeno.

7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende un polipéptido de región variable de cadena ligera (LCVR) y un polipéptido de región variable de cadena pesada (HCVR) en el que:
- (i) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 48 y 49, respectivamente;
  - 5 (ii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 50 y 51, respectivamente;
  - (iii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 52 y 51, respectivamente;
  - 10 (iv) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 53 y 54, respectivamente;
  - (v) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 55 y 56, respectivamente;
  - (vi) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 59 y 58, respectivamente;
  - 15 (vii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 60 y 58, respectivamente;
  - (viii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 61 y 58, respectivamente;
  - 20 (ix) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 62 y 58, respectivamente;
  - (x) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 63 y 58, respectivamente;
  - (xi) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 46 y 47, respectivamente; o
  - 25 (xii) los polipéptidos de LCVR y de HCVR tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 57 y 58, respectivamente.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que tienen (i) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 67 y 66, respectivamente; (ii) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 69 y 68, respectivamente; (iii) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 69 y 70, respectivamente; (iv) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 72 y 71, respectivamente; (v) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 74 y 73, respectivamente; (vi) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 76 y 77, respectivamente; (vii) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 76 y 78, respectivamente; (viii) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 76 y 79, respectivamente; (ix) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 76 y 80, respectivamente; (x) las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 76 y 81, respectivamente.
- 30
- 35
9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
10. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en terapia.
- 40
11. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento o la prevención de anemia.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un procedimiento para aumentar niveles de hierro en suero, recuento de reticulocitos, recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y/o hematocrito en un sujeto humano.
- 45
13. Un procedimiento para detectar proteína hepcidina-25 en una muestra biológica que comprende incubar un anticuerpo que se une selectivamente a hepcidina-25 humana con una muestra biológica en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que dicho anticuerpo se una a proteína hepcidina-25 y detectar dicha unión, en el que el anticuerpo comprende seis DCR, seleccionadas del grupo que consiste en:
- 50 (i) LCDR11, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 22, 42, 43 y 44, respectivamente;

(ii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 27, 42, 43 y 44, respectivamente; y

(iii) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 23, 42, 43 y 44, respectivamente.

5 **14.** Un procedimiento para cuantificar una cantidad de proteína hepcidina-25 en una muestra de tejido o fluido biológico que comprende;

(i) recubrir un soporte sólido con (a) un primer anticuerpo que comprende seis DCR seleccionadas del grupo que consiste en:

10 (1) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 22, 42, 43 y 44, respectivamente;

(2) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 23, 42, 43 y 44, respectivamente;

(3) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 24, 25, 23, 42, 43 y 44, respectivamente;

15 (4) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 27, 42, 43 y 44, respectivamente;

(5) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 28, 42, 43 y 44, respectivamente,

20 o (b) un primer anticuerpo que se une a un epítoto contenido dentro de los aminoácidos 5 a 25, inclusive, de la SEC ID N°: 1;

(ii) aplicar la muestra a dicho soporte sólido recubierto con el anticuerpo;

(iii) retirar la muestra no unida;

25 (iv) si el primer anticuerpo de la etapa (i) es (a), aplicar al soporte sólido un segundo anticuerpo que se una a un epítoto contenido dentro de los aminoácidos 5 a 25, inclusive, de la SEC ID N°: 1, o, si el primer anticuerpo de la etapa (i) es (b), aplicar al soporte sólido un segundo anticuerpo que comprenda seis CDR seleccionadas del grupo que consiste en:

(1) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 22, 42, 43 y 44, respectivamente;

30 (2) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 20, 21, 23, 42, 43 y 44, respectivamente;

(3) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 24, 25, 23, 42, 43 y 44, respectivamente;

(4) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 27, 42, 43 y 44, respectivamente;

35 (5) LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 26, 25, 28, 42, 43 y 44, respectivamente;

(v) retirar el segundo anticuerpo no unido; y

(vi) detectar cuantitativa, semicuantitativa o cualitativamente la cantidad de hepcidina-25 unida al segundo anticuerpo en dicha muestra.

40 **15.** El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el anticuerpo que se une a un epítoto contenido dentro de los anticuerpos 5 a 25, inclusive, de la SEC ID N°: 1 que comprende una LCVR y una HCVR que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se muestran en las SEC ID N°: 84 y 85.

**16.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14-15, en el que solo el primer o el segundo anticuerpo está marcado dentro de un resto detectable.

45 **17.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16 en el que dicha detección es indirecta.

**18.** El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14-17, en el que dicha muestra es sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (CSF), líquido amniótico, saliva, sudor, líquido ascítico, linfa, líquido

quístico, leche materna, fluido de heridas o derivados de los mismos, y en el que dicha muestra se pone en contacto con dicho anticuerpo en un inmunoensayo enzimático (EIA), ELISA, ensayo de ELISA de tipo emparejado, radioinmunoensayo, una reacción de precipitación o un inmunoensayo fluorescente.

- 5 **19.** Un kit para detectar o cuantificar hepcidina-25 que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

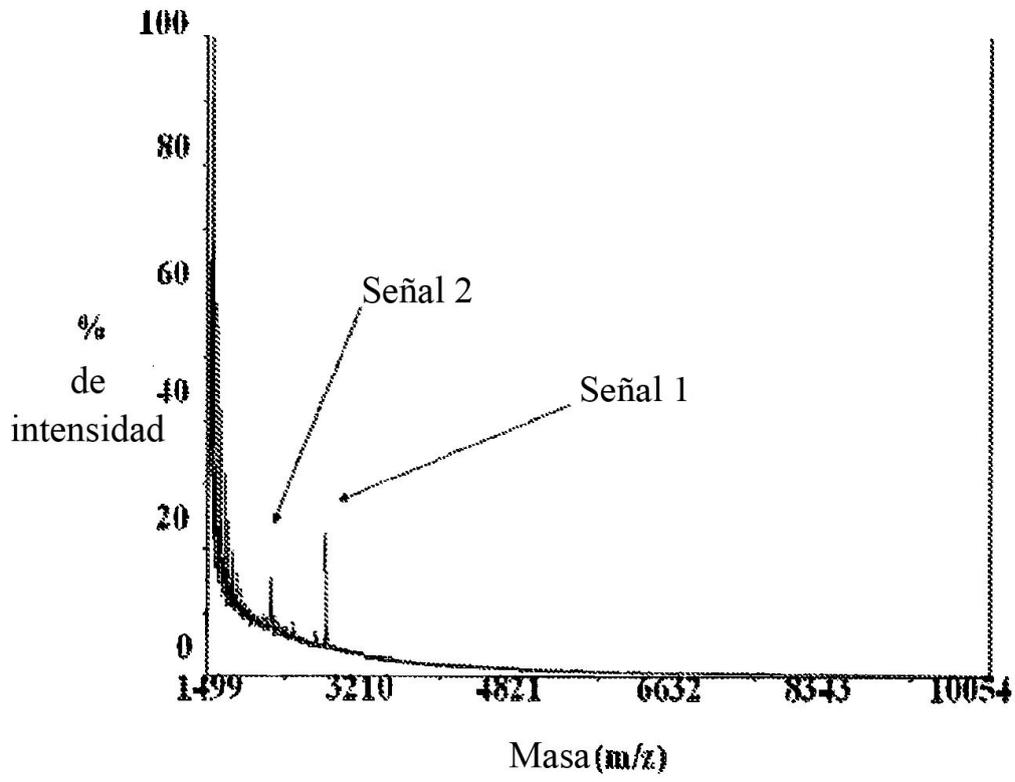


Figura 1

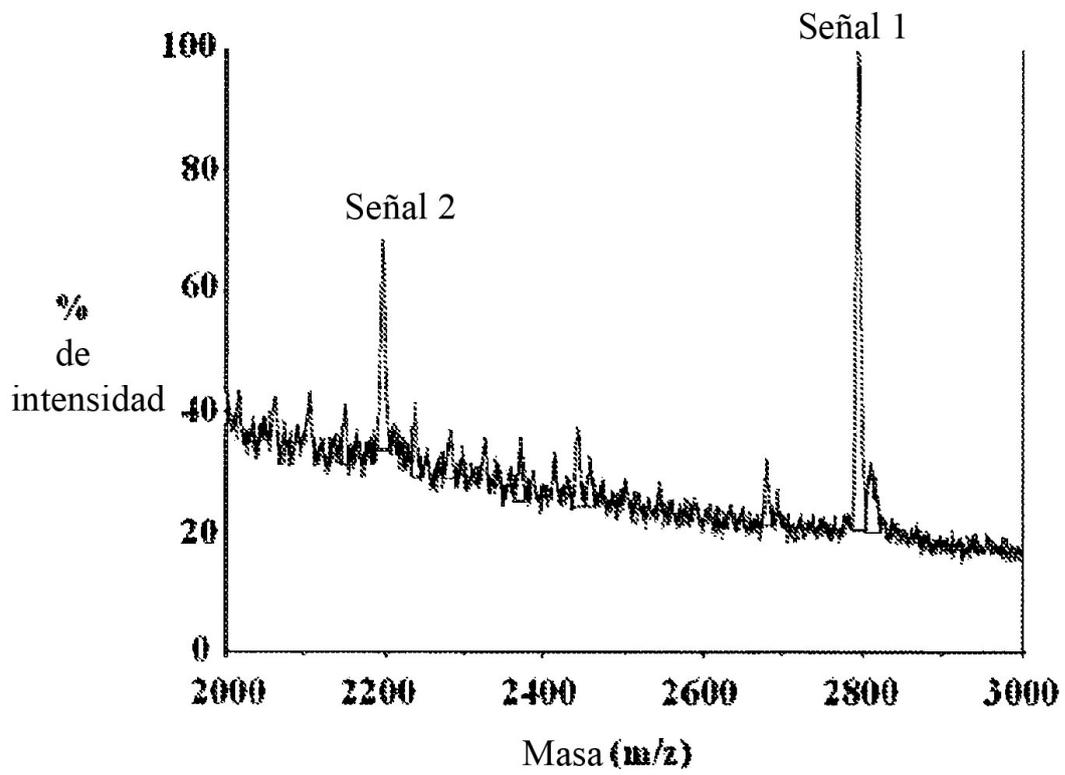


Figura 2

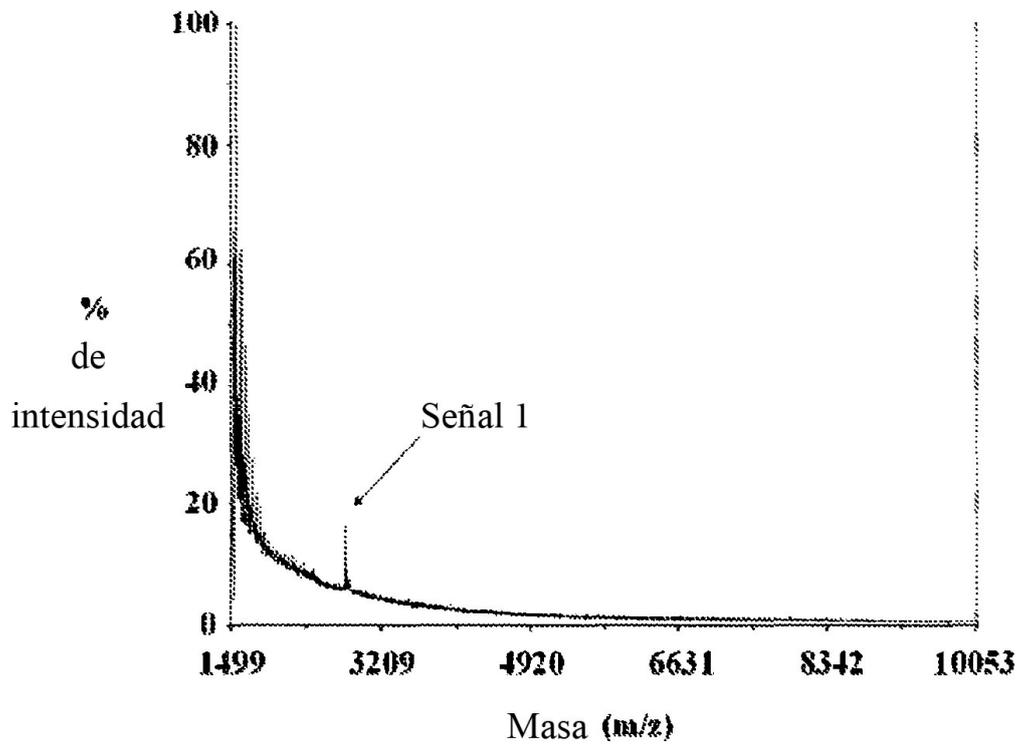


Figura 3

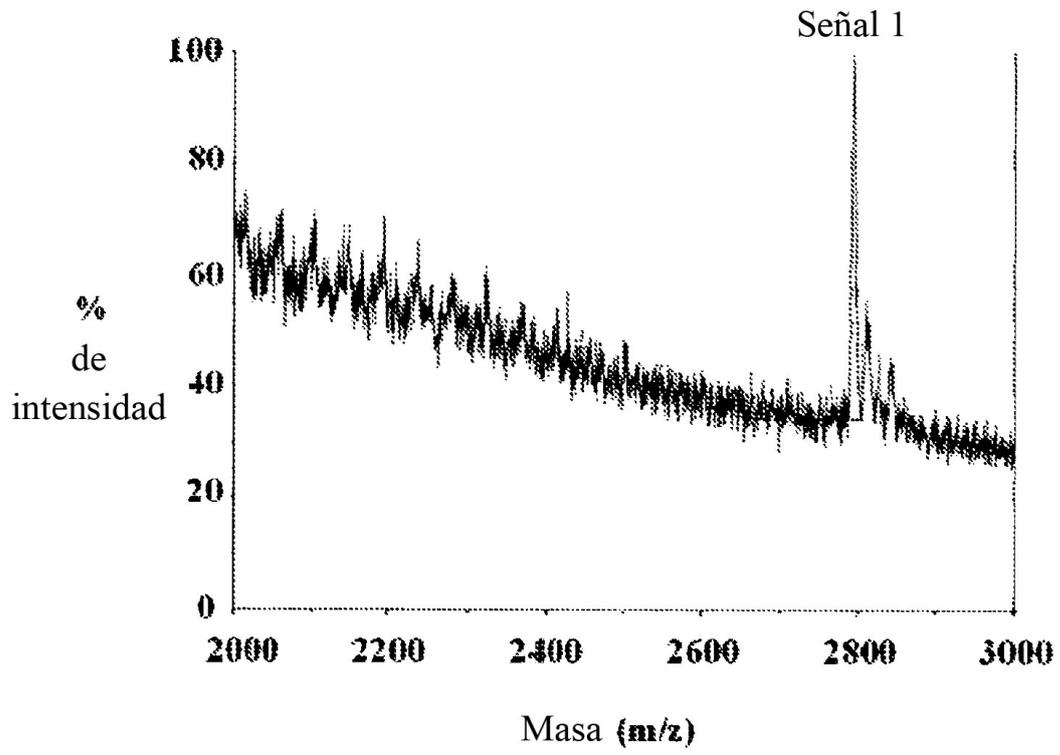


Figura 4

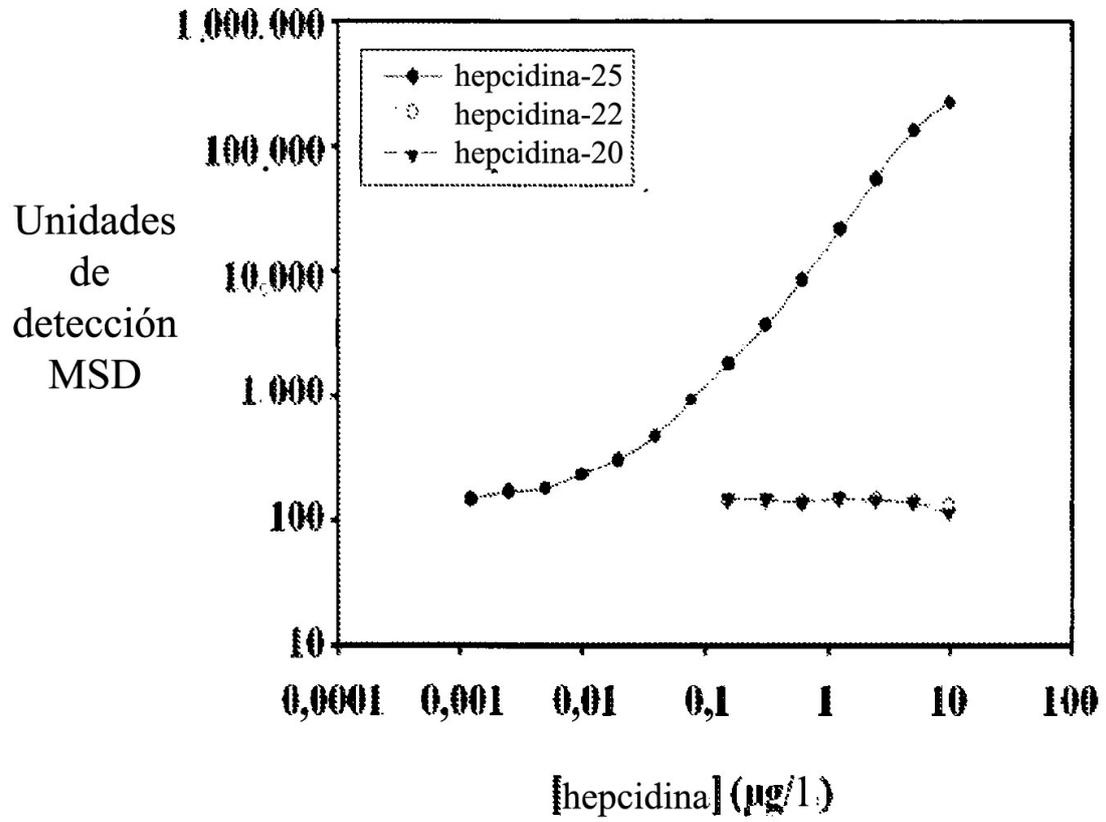


Figura 5