

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 381**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2013 PCT/US2013/073239**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14099391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2013 E 13818045 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2931748**

54 Título: **Anticuerpos anti-BMP-6**

30 Prioridad:

17.12.2012 US 201261737859 P

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

10.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TRUHLAR, STEPHANIE MARIE EATON y
SEO, NEUNGSEON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 608 381 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 anti-BMP-6

La presente invención se refiere al campo de la medicina. Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a BMP-6 humana y pueden ser útiles para el tratamiento de la anemia de las enfermedades crónicas (AEC), tal como la anemia de cáncer, o la anemia de enfermedad renal (nefropatía) crónica (IRC).

BMP-6 es un miembro de la familia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP); hay más de veinte miembros en la familia BMP. Los miembros de la familia BMP son ligandos que inician la señalización en la vía SMAD que conduce a la modulación transcripcional en la célula. Se ha informado que los ratones con BMP-6 desactivada son viables y fértiles y muestran desarrollo óseo y cartilaginoso normal, mientras que los ratones con la BMP-7 estrechamente relacionada desactivada mueren después de nacer con defectos renales, oculares y óseos. Las desactivaciones individuales de BMP-6 o bien BMP-7 han mostrado que no alteran la cardiogénesis, pero la desactivación doble de BMP-6 y BMP-7 demostró varios defectos y retrasos en el corazón y los embriones murieron debido a insuficiencia cardíaca. La presencia de BMP-7 también ha mostrado en modelos de ratón que es importante para evitar la progresión de la cardiopatía crónica asociada con fibrosis. Por lo tanto, cuando se inhibe la BMP-6 humana con un anticuerpo anti-BMP-6, la reactividad cruzada contra BMP-7 es probablemente no deseable.

Determinadas enfermedades crónicas, tales como cáncer, nefropatía y trastornos autoinmunitarios, pueden conducir a AEC cuando las citocinas inflamatorias hiperactivas causan una regulación errónea de la homeostasis del hierro, la reducción de la eritropoyesis y una disminución en el tiempo de vida de los glóbulos rojos. La hepcidina se ha identificado como una hormona clave implicada en la homeostasis del hierro; altos niveles de hepcidina se han asociado con la eritropoyesis restringida en hierro vista en la AEC. La BMP-6 ha mostrado que aumenta la expresión de hepcidina.

El documento WO 2010/056981 divulgó la administración en ratones de un anticuerpo de ratón generado contra BMP-6 humana; se informó de una disminución en hepcidina y un aumento en hierro en un punto temporal después de un régimen de tres días con este anticuerpo de ratón, MAB507, que estaba disponible comercialmente de R&D Systems. También se divulgó selectividad hacia BMP y se mostró que la administración del anticuerpo anti-BMP-6 MAB507 inhibió BMP-7 en ciertas dosis. Sin embargo, hasta la fecha, ningún anticuerpo dirigido contra BMP-6 se ha aprobado para uso terapéutico.

Sigue siendo una necesidad proporcionar anticuerpos anti-BMP-6 alternativos. En particular, sigue siendo una necesidad proporcionar anticuerpos anti-BMP-6 potentes que sean selectivos para BMP-6 con respecto a otros miembros de la familia BMP, incluyendo BMP-7. También sigue siendo una necesidad proporcionar anticuerpos anti-BMP-6 potentes que sean selectivos para BMP-6 con respecto a otros miembros de la familia BMP, incluyendo BMP-7 y produzcan una respuesta farmacodinámica prolongada. También sigue siendo una necesidad proporcionar anticuerpos anti-BMP-6 potentes que sean selectivos para BMP-6 con respecto a otros miembros de la familia BMP, incluyendo BMP-7, para el tratamiento de AEC.

En consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que la LCDR1 es el polipéptido de RSSENIYRNLA (SEQ ID NO: 2), la LCDR2 es el polipéptido de AATNLAD (SEQ ID NO: 3), la LCDR3 es el polipéptido de QGIWGTPLT (SEQ ID NO: 4), la HCDR1 es el polipéptido de GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 5), la HCDR2 es el polipéptido de YINPYNDGTYNENFKG (SEQ ID NO: 6) o YINPYNRGTYNENFKG (SEQ ID NO: 7) y la HCDR3 es el polipéptido de RPFGNAMDI (SEQ ID NO: 8).

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que la LCDR1 es el polipéptido de RSSENIYRNLA (SEQ ID NO: 2), la LCDR2 es el polipéptido de AATNLAD (SEQ ID NO: 3), la LCDR3 es el polipéptido de QGIWGTPLT (SEQ ID NO: 4), la HCDR1 es el polipéptido de GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 5), la HCDR2 es el polipéptido de YINPYNDGTYNENFKG (SEQ ID NO: 6) y la HCDR3 es el polipéptido de RPFGNAMDI (SEQ ID NO: 8).

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que la LCDR1 es el polipéptido de RSSENIYRNLA (SEQ ID NO: 2), la LCDR2 es el polipéptido de AATNLAD (SEQ ID NO: 3), la LCDR3 es el polipéptido de QGIWGTPLT (SEQ ID NO: 4), la HCDR1 es el polipéptido de GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 5), la HCDR2 es el polipéptido de YINPYNRGTYNENFKG (SEQ ID NO: 7) y la

HCDR3 es el polipéptido de RPFGNAMDI (SEQ ID NO: 8).

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 10. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 11.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 10. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 11.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en la que la LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 12 y la HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una LC y una HC, en el que la LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 12 y la HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 13. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una LC y una HC, en el que la LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 12 y la HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 14.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada cadena ligera es el polipéptido de SEQ ID NO: 12 y cada cadena pesada es el polipéptido de SEQ ID NO: 13. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada cadena ligera es el polipéptido de SEQ ID NO: 12 y cada cadena pesada es el polipéptido de SEQ ID NO: 14.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos anteriormente, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención que pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, ADN que incluye ADNc y ADN sintético. El ADN puede ser de bicatenario o monocatenario. Las secuencias codificantes que codifican el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 14. En una realización, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En una realización, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

Los polinucleótidos de la presente invención se expresarán en una célula huésped después de que las secuencias se hayan unido de forma operativa a una secuencia de control de expresión. Los vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención se puede producir fácilmente en células de mamífero tales como células CHO, NSO, HEK293 o COS, en células bacterianas tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*; o en células de hongos o de levaduras. Las células huésped se cultivan usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, los polipéptidos del anticuerpo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo y las secuencias de control de expresión) se pueden transferir a la célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de célula huésped. Por ejemplo, la transformación con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación pueden utilizarse para otros huéspedes celulares.

En una realización, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN o moléculas de ADN de la presente invención, célula que es capaz de expresar un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En una realización, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende moléculas de ADN de la presente invención, célula que es capaz de expresar un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de la presente invención que comprende una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 12, que comprende cultivar una célula de mamífero de la presente invención en condiciones tales que el anticuerpo se expresa y recuperar el anticuerpo expresado. En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de la presente invención que comprende una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 12, que comprende cultivar una célula de mamífero de la presente invención en condiciones tales que el anticuerpo se expresa y recuperar el anticuerpo expresado. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo producido por un procedimiento de la presente invención.

En una realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente aceptable. Más particularmente, las composiciones de la presente invención comprenden adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de anemia, que comprende administrar a un paciente que lo necesita, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de la anemia, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, en el que la anemia es anemia de las enfermedades crónicas. En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de la anemia, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, en el que la anemia de las enfermedades crónicas se selecciona del grupo que consiste en anemia del cáncer y anemia de la enfermedad renal crónica.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de anemia restringida en hierro relacionada con hepcidina, que comprende administrar a un paciente que lo necesita, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de anemia restringida en hierro relacionada con hepcidina, que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, en el que la anemia restringida en hierro relacionada con hepcidina se selecciona del grupo consistente en anemia del cáncer y anemia de enfermedad renal crónica.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro refractaria al hierro (IRIDA), que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En una realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de IRIDA, que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, en el que la IRIDA está causada por un defecto en el gen TMPRSS6.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar el síndrome de Sjogren, que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar los niveles de hierro en suero, el recuento de reticulocitos, el recuento de glóbulos rojos, la hemoglobina y/o el hematocrito, que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar los niveles de hierro en suero que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar el recuento de reticulocitos que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un

- anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar el recuento de glóbulos rojos que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para
- 5 aumentar la hemoglobina que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar el hematocrito, que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz de un anticuerpo, o de fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención.
- 10 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en tratamiento. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento de anemia. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento de anemia de las enfermedades crónicas. En otra
- 15 realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento de la anemia del cáncer o de la anemia de enfermedad renal crónica.
- En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento de la anemia restringida en hierro relacionada con hepcidina. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento de la anemia restringida en hierro relacionada con hepcidina del
- 20 cáncer. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento de la anemia restringida en hierro relacionada con hepcidina de enfermedad renal crónica.
- 25 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento de IRIDA. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento de IRIDA, en el que IRIDA está causada por un defecto en el gen TMPRSS6.
- 30 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjogren.
- En una realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para la fabricación de un medicamento. En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de anemia. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de anemia de las enfermedades crónicas. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de anemia de enfermedad renal crónica. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la anemia del cáncer.
- 35 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la IRIDA. En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la IRIDA, en el que IRIDA es causada por un defecto en el gen TMPRSS6.
- 40 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del síndrome de Sjogren.
- 45 La estructura general de un "anticuerpo" se conoce muy bien en la técnica. Para un anticuerpo del tipo IgG, hay cuatro cadenas de aminoácidos (dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras") que están reticuladas por medio de enlaces disulfuro intracatenarios e intercatenarios. Para un anticuerpo, una de las cadenas pesadas forma un enlace disulfuro intercatenario con una de las cadenas ligeras y la otra cadena pesada forma un enlace disulfuro intercatenario con la otra cadena ligera y una de las cadenas pesadas forma dos enlaces disulfuro intercatenarios con la otra cadena pesada. Un fragmento de unión a antígeno es un fragmento de un anticuerpo, tal como un Fab, Fab', F(ab'), fragmento variable de cadena sencilla (scFv) o di-scFv.
- 50 Cuando se expresan en ciertos sistemas biológicos, los anticuerpos que tienen secuencias de Fc humanas están glucosiladas en la región Fc. Los anticuerpos pueden estar glucosilados en otras posiciones también. Un experto en la técnica apreciará que los anticuerpos de la presente invención pueden contener tal glucosilación. Normalmente, la glucosilación se produce en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glucosilación altamente conservado. Los N-
- 55

glucanos se unen típicamente a asparaginas. La asparagina 295, por numeración secuencial, se prevé que sea un sitio de glucosilación para los anticuerpos de la presente invención.

Un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo manipulado que ha sido diseñado para tener armazones, regiones de bisagra y regiones constantes de origen humano que son idénticas a o sustancialmente idénticas a los armazones y regiones constantes derivadas de secuencias genómicas humanas. Los armazones, regiones de bisagra y regiones constantes totalmente humanas son aquellas secuencias de la línea germinal humana, así como las secuencias con mutaciones somáticas que se dan en la naturaleza y/o aquellas con mutaciones manipuladas. Un anticuerpo de la presente invención puede comprender regiones de armazón, de bisagra o regiones constantes derivadas de una región de armazón, de bisagra o constante totalmente humana conteniendo una o más sustituciones, delecciones o adiciones aminoácídicas en ellas. Además, un anticuerpo de la presente invención es sustancialmente no inmunógeno en seres humanos.

El anticuerpo I comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en las que cada una de las cadenas ligeras consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 12 y cada una de las cadenas pesadas consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 13. El anticuerpo II comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en las que cada una de las cadenas ligeras consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 12 y cada una de las cadenas pesadas consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 14. Una molécula de ADN particular que codifica cada una de las cadenas pesadas de anticuerpo I es SEQ ID NO: 16 y una molécula de ADN particular que codifica cada una de las cadenas ligeras de anticuerpo I es SEQ ID NO: 15. Una molécula de ADN particular que codifica cada una de las cadenas pesadas de anticuerpo II es SEQ ID NO: 17 y una molécula de ADN particular que codifica cada una de las cadenas ligeras de anticuerpo II es SEQ ID NO: 15.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención se puede producir usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de expresión en fagos, tecnologías sintéticas, o combinaciones de tales tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica. Los procedimientos para producir y purificar anticuerpos se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, capítulos 5-8 y 15, ISBN 0-87969-314-2.

La anemia de la CKD es una complicación temprana y común en pacientes que sufren de CKD. La anemia del cáncer es la anemia causada por neoplasias hematológicas y algunos tumores sólidos; mientras que, la anemia inducida por quimioterapia es la anemia causada por el tratamiento de pacientes con cáncer con agentes quimioterapéuticos. La anemia en CKD exacerba la neuropatía diabética, la enfermedad cardiovascular y la retinopatía, entre otras afecciones. La anemia relacionada con el cáncer se asocia con un riesgo relativo de muerte incrementado. Las opciones actuales de tratamiento para la anemia relacionada con el cáncer se limitan a transfusiones de sangre, ya que agentes estimulantes de la eritrocitopoyesis están indicados solamente para la anemia inducida por quimioterapia.

"Une" como se usa en el presente documento en referencia a la afinidad de un anticuerpo anti-BMP-6, o fragmento de unión a antígeno del mismo, por BMP-6 humana, se entiende que significa, a menos que se indique lo contrario, una K_D de menos de aproximadamente 1×10^{-8} M, preferentemente, menos de aproximadamente 1×10^{-9} M como se determina por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo mediante el uso de un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) a 37 °C esencialmente como se describe en el presente documento. El término "selectivo" usado en el presente documento en referencia a un anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a BMP-6 humana con una K_D de aproximadamente 1000-, 500-, 200-, 100-, 50-, 10-, o aproximadamente 5 veces menor que con la que el anticuerpo se une al menos a un miembro de la familia BMP, incluyendo, pero no limitado a, BMP-5 humana o BMP-7 humana, según se mide por resonancia de plasmón superficial a 37 °C. Además, o alternativamente, un anticuerpo selectivo anti-BMP-6, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención se une a BMP-6 humana pero no se une o solo se une mínimamente a al menos un miembro de la familia de la BMP humana, incluyendo, pero no limitado a BMP-5 humana o BMP-7 humana, cuando se ensaya mediante los procedimientos descritos en los ejemplos 2 - 3 en el presente documento a continuación.

"Cantidad eficaz" significa la cantidad de un anticuerpo de la presente invención o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de o el efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o ser humano que se está buscando por el investigador, doctor en medicina, u otro trabajador clínico. Una cantidad eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y de la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo, se supera por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Los términos "tratamiento", "tratar", "tratando" y similares, pretenden incluir ralentizar o revertir la progresión de un trastorno. Estos términos también incluyen aliviar, mejorar, atenuar, eliminar o reducir uno o más síntomas de un trastorno o afección, incluso si el trastorno o afección no se elimina realmente e incluso si la progresión del trastorno o afección no se ralentiza o revierte en sí misma. Un paciente se refiere a un mamífero, preferentemente a un ser humano con una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de la inhibición de la actividad de BMP-6.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, se pueden administrar por vías parenterales (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o transdérmica). Se puede administrar un anticuerpo, o fragmento de unión al mismo, de la presente invención a un paciente solo o en combinación con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable en dosis individuales o múltiples. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.) y comprenden un anticuerpo, como se divulga en el presente documento y uno o más vehículos, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Ejemplo 1: expresión y purificación de anticuerpos

Los polipéptidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y de cadena ligera completas del anticuerpo I y II y las secuencias de nucleótidos que codifican la misma, se enumeran a continuación en la sección titulada "Amino Acid and Nucleotide Sequences". Además, la cadena ligera y los polipéptidos de CDR de la cadena pesada se muestran en la Tabla 1.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos I y II, se pueden fabricar y purificar esencialmente como sigue. Una célula huésped apropiada, tal como HEK 293 EBNA o CHO, puede transfectarse transitoria o establemente con un sistema de expresión de la secreción de anticuerpos usando una proporción de vectores de HC:LC predeterminada óptima o un sistema de vector individual que codifica tanto HC como LC. Los medios aclarados, en los que el anticuerpo se ha segregado, se pueden purificar utilizando cualquiera de las muchas técnicas de uso común. Por ejemplo, el medio puede aplicarse convenientemente a una columna MabSelect (GE Healthcare), o a una columna KappaSelect (GE Healthcare) para el fragmento Fab, que se ha equilibrado con un tampón compatible, tal como solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). La columna puede lavarse para eliminar los componentes de unión no específicos. El anticuerpo unido puede eluirse, por ejemplo, por gradiente de pH (tal como tampón Tris de pH 7 20 mM a tampón de citrato de sodio de pH 3,0 10 mM, o solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 a tampón de glicina de pH 3,0 100 mM). Las fracciones de anticuerpos pueden detectarse, por ejemplo por SDS-PAGE y luego pueden mezclarse. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso previsto. El anticuerpo se puede concentrar y/o se puede filtrar de manera estéril utilizando técnicas comunes. El agregado soluble y los multímeros pueden eliminarse eficazmente por técnicas comunes, incluyendo exclusión por tamaño, interacción hidrofoba, intercambio iónico, multimodal, o cromatografía de hidroxipatita. La pureza del anticuerpo después de estas etapas de cromatografía es mayor del 95 %. El producto se puede congelar inmediatamente a -70 °C o se puede liofilizar.

Tabla 1: SEQ ID NO

Anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	LCVR	HCVR
I	12	13	9	10
II	12	14	9	11

Anticuerpo	LCDR	LCDR	LCDR
I	RSSSENIYRNLA (SEQ ID NO: 2)	AATNLAD (SEQ ID NO: 3)	QGIWGTPLT (SEQ ID NO: 4)
II	RSSSENIYRNLA (SEQ ID NO: 2)	AATNLAD (SEQ ID NO: 3)	QGIWGTPLT (SEQ ID NO: 4)

Anticuerpo	HCDR	HCDR	HCDR
I	GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 5)	YINPYNDGTYKYNENFKG (SEQ ID NO: 6)	RPFGNAMDI (SEQ ID NO: 8)
II	GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 5)	YINPYNRGTYKYNENFKG (SEQ ID NO: 7)	RPFGNAMDI (SEQ ID NO: 8)

Ejemplo 2: cinética de unión, afinidad y especificidad de los anticuerpos anti-BMP6

La cinética, afinidad y selectividad para BMP-6 humana, así como para BMP-5 humana y para BMP-7 humana, para anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, se pueden determinar mediante el uso de un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) tal como un BIAcore® 2000, BIAcore® 3000, o un BIAcore® T100 (GE HealthCare) de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

BMP-5 humana, BMP-6 humana, BMP-7 humana y MAB507 puede ser comprados de R & D Systems (Mineápolis, MN). MAB507 es un anticuerpo comercial que se pretende que sea específico para BMP-6. La BMP-6 de macaco de Java y la BMP-6 de rata se pueden fabricar usando procedimientos estándar. La inmovilización de ligandos sobre un chip CM4 (BIAcore n.º: BR-1005-34) se puede preparar usando procedimiento de acoplamiento de EDC/amina NHS (BIAcore n.º: BR-1000-50). En pocas palabras, las superficies de las cuatro células de flujo se pueden activar mediante la inyección de una mezcla 1:1 de EDC/NHS durante 7 minutos a 10 µl/minuto. BMP-5, BMP-6 y BMP-7 humanas pueden diluirse hasta 1-2 µg/ml en tampón de acetato 10 mM, pH 4,5 y pueden inmovilizarse durante aproximadamente 200 unidades de resonancia (UR) sobre células de flujo (CF) 2, 3 o 4 a un caudal de 10 l/minuto. Fc1 puede dejarse en blanco. Los sitios que no han reaccionado se pueden bloquear con una inyección de 7 minutos de etanolamina a 10 µl/minuto. Las inyecciones de 3 x 30 segundo de glicina pH 1,5 a 30 µl/minuto se pueden utilizar para eliminar cualquier proteína no covalentemente asociada. Todas las mediciones se pueden llevar a cabo a 25 y 37 °C. El tampón de migración puede ser HBS-EP + (BIAcore n.º: BR-1006-69). El software de evaluación BIAcore T100 Versión 2.0.3 se puede utilizar para el análisis.

Para determinar la especificidad de anticuerpo I y MAB 507 entre los diferentes miembros de la familia BMP, los anticuerpos pueden prepararse a una concentración final de 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0 (blanco) nM en el tampón de migración HBS-EP+. Cada ciclo puede consistir en una inyección de anticuerpo diluido a 50 µl/minuto durante 300 segundos más sobre todas las células de flujo, seguido por la disociación a 50 µl/minuto durante 1200 segundos. La superficie del chip se puede regenerar mediante la inyección de 10 mM de glicina a pH 1,5 durante 60 segundos a 50 µl/minuto y de tampón HBS-EP durante 30 segundos a 30 µl/minuto. Los datos de referencia tras la sustracción se pueden recoger y la constante de asociación (k_{on}) y la constante de disociación (k_{off}) para cada ligando se pueden evaluar usando un modelo 1:1 de unión en el software de análisis de BIAevaluation. La afinidad (K_D) puede calcularse a partir de la cinética de unión de acuerdo con la relación $K_D = k_{off}/k_{on}$.

En experimentos llevados a cabo esencialmente como se describe en este ejemplo 2, el Anticuerpo I se une a BMP-6 humana con afinidad 0,020 nM. Con unión no detectable a BMP-5 humana y a BMP-7 humana a 37 °C, el anticuerpo I muestra selectividad sobre los dos miembros de la familia BMP que están más cerca de homología de secuencia con BMP-6.

El anticuerpo de R&D MAB507 se une a BMP-6 humana con afinidad 1 nM y a diferencia del anticuerpo I, MAB507 tiene una afinidad de 23 nM a BMP-7 humana (tabla 2). MAB507 no tiene detectable unión detectable a BMP-5 humana a 37 °C (Tabla 2).

Los Fab de anticuerpo I y anticuerpo II se unen a BMP-6 humana con afinidades similares que van de 0,08-0,09 nM a 37 °C (tabla 3). El Fab de MAB507, Fab507, se une a BMP-6 humana con una afinidad de 12,2 nM a 37 °C (Tabla 3).

Los Fab de anticuerpo I y anticuerpo II presentan una afinidad 135-150 veces mayor a la BMP-6 humana que el Fab de MAB507. El anticuerpo I exhibe una afinidad 50 veces mayor a la BMP-6 humana cuando se compara con MAB507.

El Fab del anticuerpo I se une a BMP-6 de ser humano, de macaco de Java y de rata y con afinidades similares que van desde 79,6 a 88,0 pM a 37 °C (Tabla 4). La alta afinidad del anticuerpo I a BMP-6 de macaco de Java y a BMP-6 de rata permite al anticuerpo I usarse directamente en modelos animales de macaco de Java y de rata sin la necesidad de recurrir a un anticuerpo sustituto.

Tabla 2: Selectividad del anticuerpo I y MAB507 medida usando SPR

mAb	Ligandos	Constante de asociación (K_{on} , $M^{-1}S^{-1}$)	Constante de disociación (K_{off} , S^{-1})	Afinidad (K_D , nM)	Temperatura (°C)
Anticuerpo I	BMP-5 humana	Sin aglutinante			37
	BMP-6 humana	$1,73 \times 10^6$	$4,05 \times 10^{-5}$	0,02	

mAb	Ligandos	Constante de asociación (K_{on} , $M^{-1}S^{-1}$)	Constante de disociación (K_{off} , S^{-1})	Afinidad (K_D , nM)	Temperatura ($^{\circ}C$)
	BMP-7 humana	Sin aglutinante			
MAB507	BMP-5 humana	Sin aglutinante			37
	BMP-6 humana	$1,87 \times 10^5$	$1,87 \times 10^{-4}$	1	
	BMP-7 humana	$3,42 \times 10^4$	$7,93 \times 10^{-4}$	23,2	

Tabla 3: Cinética de unión y afinidad de los anticuerpos anti-BMP6 medidos usando SPR

Fab	Constante de asociación (K_{on} , $M^{-1}S^{-1}$)	Constante de disociación (K_{off} , S^{-1})	Afinidad (K_D , nM)	Temperatura ($^{\circ}C$)
Fab del anticuerpo I	$2,5 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,3 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	$0,09 \pm 0,01$	37
Fab del anticuerpo II	$3,0 \pm 0,4 \times 10^6$	$2,5 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	$0,08 \pm 0,01$	37
Fab507	$3,6 \pm 0,7 \times 10^5$	$4,3 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$12,2 \pm 2,0$	37

Tabla 4: Cinética de unión y afinidad de anticuerpo I a BMP-6 humana, de macaco de Java y de rata, medida usando SPR

Fab	Ligandos de BMP-6	Constante de asociación (K_{on} , $M^{-1}S^{-1}$) ($\pm$ DE)	Constante de disociación (K_{off} , S^{-1}) ($\pm$ DE)	Afinidad (K_D , pM) ($\pm$ DE)	Temperatura ($^{\circ}C$)
Fab del anticuerpo I	Humano	$3,7 \pm 1,5 \times 10^6$	$2,8 \pm 0,3 \times 10^{-4}$	$84,5 \pm 24,9$	37
	Macaco de Java	$4,1 \pm 2,2 \times 10^6$	$2,8 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	$79,6 \pm 29,9$	
	Rata	$4,1 \pm 2,3 \times 10^6$	$3,0 \pm 0,7 \times 10^{-4}$	$88,0 \pm 33,1$	

Ejemplo 3: los anticuerpos anti-BMP6 inhiben la inducción de BMP-6 de la expresión de hepcidina

- 5 La inhibición basada en células *in vitro* de BMP-6 humana por un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención pueden medirse en un ensayo basado en células donde BMP-6 induce la expresión de hepcidina. El ensayo basado en células *in vitro* también se puede usar para evaluar la selectividad de anticuerpos anti-BMP-6 contra la inducción de la hepcidina por otras BMP, tales como BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-7, BMP-9 y BMP-10. En el ensayo basado en células *in vitro* mencionado anteriormente, la unión de ligandos BMP a los
- 10 elementos de respuesta a BMP en el promotor de la hepcidina induce la actividad de informador de luciferasa en las células HepProm_Luc. El ensayo es extremadamente sensible y como tal no es apropiado para mostrar qué miembros de la familia BMP están involucrados en la homeostasis del hierro. El ensayo es eficaz, empero, para mostrar la selectividad de inhibidores contra diferentes miembros de la familia BMP en un entorno celular.
- 15 La línea celular HepProm_Luc puede ser generada por transfección estable de células Hep3B2.1-7 (ATCC, Manassas, VA, n.º: HB-8064) con un vector indicador de luciferasa, que contiene una secuencia de ADN de promotor de hepcidina clonado (HepProm 0,3 + 1,0 kb). Las células HepProm_Luc se pueden mantener en medio completo de DMEM/alto contenido de glucosa (Hyclone, Logan, UT, n.º: SH30243.01) más FBS inactivado por calor al 5 % (Invitrogen, Grand Island, NY, n.º: 10082-147) con MEM de NEAA 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 200 mg/ml de sulfato de G418 (Invitrogen, Grand Island, NY, n.º: 30-234-CI).
- 20 Para el ensayo, las células HepProm_Luc se pueden resuspender a 150.000 células/ml en medio completo que no

5 contenía ningún antibiótico. 0,1 ml de las células HepProm_Luc resuspendidas pueden añadirse a placas de 96 pocillos de microtitulación (Corning, Lowell, MA, n.º: 3917) a 15.000 células/pocillo y las células pueden luego incubarse durante 24 horas a 37 °C en CO₂ al 5% (v/v). El medio de cultivo puede eliminarse luego y las células se someten a privación en 80 µl de OptiMEM I (Invitrogen, Grand Island, NY, n.º: 31985) con BSA al 0,1 % (p/v) (Invitrogen, Grand Island, NY, n.º: 15260) durante 5 horas a 37 °C en CO₂ al 5% (v/v).

10 Se pueden añadir a las células 10 µl de anticuerpos anti-BMP6 (la concentración final 10X) en OptiMEM I con BSA al 0,1 % (p/v) para un intervalo de dosificación final de 0,2 nM a 20 nM para inducción de BMP-6; un intervalo de dosificación final de 7,8 nM a 1000 nM para inducción de BMP-5 y de BMP-7 y hasta dosis de punto único de 1000 nM, para inducción de BMP-2, BMP-4, BMP-9 y BMP-10. Se pueden añadir después 10 l de ligando BMP (concentración final 10X) hasta una concentración final de BMP-2 (3,8 nM), BMP-4 (3,8 nM), BMP-5 (12,8 nM), BMP-6 (3,4 nM), BMP-7 (3,2 nM), BMP-9 (0,8 nM) o BMP-10 (4,1 nM) en cada pocillo; las células se pueden incubarse durante 22-24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 % (v/v). El medio de cultivo puede eliminarse de las células y se pueden añadir 50 µl de tampón de lisis Glo (Promega, Madison, WI, n.º: E2661) a las células y se pueden incubarse a temperatura ambiente durante 5 minutos después de 2 minutos de agitación. Se pueden añadir luego a las células 50 µl de reactivo de luciferasa Bright Glo™ (Promega, Madison, WI, n.º: E2620) y se pueden incubarse a temperatura ambiente durante 5 minutos después de 30 segundos de agitación. La luminiscencia puede medirse durante 1 segundo/pocillo en un instrumento Wallac Victor.

20 Para calcular el porcentaje de inhibición por el anticuerpo anti-BMP-6, el 0 % de inhibición se puede fijar en la luminiscencia promedio para el tratamiento de ligando BMP sin adición de anticuerpo anti-BMP-6 y el 100 % de inhibición se puede fijar en la luminiscencia promedio de ningún tratamiento de ligando BMP sin adición de anticuerpo anti-BMP-6. Se puede llevar a cabo análisis de ajuste de curvas de tres o cuatro parámetros usando software GraphPad Prism (San Diego, CA).

25 En experimentos llevados a cabo esencialmente como se describe en este ejemplo 3, los anticuerpos I y II inhiben potentemente la actividad del promotor de luciferasa hepcidina inducida por BMP-6 de las células HepProm_Luc (Tabla 5); esta inhibición es aproximadamente 22 veces más potente que MAB507.

30 Los datos en la Tabla 6 muestran que los anticuerpos I y II no inhiben la inducción por BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-7, BMP-9 y BMP-10 de la actividad luciferasa del promotor de hepcidina significativamente cuando se ponen a prueba a una sola concentración puntual de 1.000 nM en comparación con el control de IgGPA4 humana. Los anticuerpos I y II en este ensayo muestran selectividad sobre el panel de las BMP puestas a prueba. MAB507, sin embargo, no muestra la selectividad para BMP-6 y tiene una media de inhibición del 54,2 % a 1.000 nM (N = 2) contra BMP-7 en comparación con el control de IgGPA4 humana que tiene una media de inhibición del -1,7 % a 1.000 nM (N = 6).

Tabla 5: CI₅₀ de anticuerpos anti-BMP-6 en ensayo de Hep_Luc inducidas por BMP-6

Anticuerpo	N	Media Geométrica CI ₅₀ (nM)
I	5	0,99
II	4	0,94
MAB507	5	22,08

Tabla 6: Selectividad de anticuerpos anti-BMP-6 probados a 1000 nM en ensayo de Hep/Luc inducido con BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-7, BMP-9, BMP-10

Ligando de BMP	Anticuerpo	N	Media de la inh. en % a 1000 nM	Desviación estándar
BMP-2	I	4	8,5	14,1
	II	3	6,6	5,1
	MAB507	3	-50,6	40,5
	Control	6	7,8	10,5
BMP-4	I	4	0,3	9,0
	II	3	-2,8	6,9

Ligando de BMP	Anticuerpo	N	Media de la inh. en % a 1000 nM	Desviación estándar
	MAB507	3	-65,4	52,7
	Control	6	4,2	7,9
BMP-5	I	4	3,9	8,8
	II	3	1,9	9,3
	MAB507	3	-43,5	34,8
	Control	5	2,5	6,7
BMP-7	I	4	-12,0	28,1
	II	3	-8,2	18,0
	MAB507	2	54,2	0,8
	Control	6	-1,7	11,5
BMP-9	I	4	-1,7	5,5
	II	3	-2,7	6,6
	MAB507	3	-76,1	47,8
	Control	6	2,8	8,7
BMP-10	I	4	-6,7	6,9
	II	3	0,9	10,8
	MAB507	3	-87,2	80,1
	Control	6	5,4	9,4

Ejemplo 4: Estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos de anticuerpos anti-BMP-6

Después de una sola dosis por vía intravenosa a macacos de Java macho

La farmacocinética/farmacodinámica sérica (PK/PD) de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención se puede poner a prueba después de dosis intravenosas únicas a macacos de Java macho normales. Los macacos de Java macho se pueden inyectar con una única dosis de bolo intravenoso (IV) de anticuerpo en un volumen de dosis de 1 ml/kg. A partir de muestras de suero tomadas en diferentes puntos temporales, la concentración de hierro sérica, el nivel de anticuerpos anti-BMP-6 y el nivel de la hepcidina se pueden medir.

Para la farmacocinética, la hepcidina sérica y la cuantificación de BMP-6, se pueden recoger aproximadamente 1,5 ml de sangre en los puntos temporales de cada animal en tubos sin anticoagulante. Se puede permitir que las muestras coagulen en condiciones ambientales antes de la centrifugación para obtener suero; las muestras se pueden mantener en hielo húmedo antes de su almacenamiento a aproximadamente -70 °C. Para el análisis de patología clínica, se pueden recoger aproximadamente 0,5 ml de sangre en puntos temporales de cada animal por medio de una vena femoral en tubos que no contienen nada de anticoagulante. La sangre se puede usar para medir el hierro sérico, la capacidad de unión a hierro no saturado, la capacidad de unión a hierro total, el porcentaje de saturación de hierro y las mediciones de hematología estándar utilizando procedimientos estándar. La concentración de hepcidina puede medirse como se describe en Murphy y otros, Blood, 110 (3): 1048 (2007).

Las muestras de suero se pueden analizar para las concentraciones de anticuerpo anti-BMP-6 utilizando un ELISA de IgG totales humanas. El anticuerpo anti-BMP-6 en el suero se puede unir a los pocillos revestidos de anticuerpos anti-cadena ligera kappa humana de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Immobilizer Amino número de catálogo: 436006) y se puede detectar con anticuerpo conjugado IgG4-HRP anti-humano (Southern Biotech, n.º: 9200-05). Los límites superior e inferior de detección en el ensayo pueden ser 200 y 10 ng/ml, respectivamente. La concentración de anticuerpo inmunorreactivo anti-BMP-6 se puede determinar a partir de curvas estándar preparadas a partir de cantidades conocidas del compuesto en suero de rata usando un algoritmo de 4/5 parámetros (StatLIA, versión 3.2). Los parámetros farmacocinéticos se pueden calcular utilizando paquete de software de

Watson (Bioanalytical LIMS Versión 7.4) (Thermo Scientific). Los parámetros calculados pueden incluir el área bajo la curva ($AUC_{0-\infty}$), aclaramiento aparente (Cl) y vida media de eliminación.

En un experimento realizado esencialmente como se describe en este ejemplo 4, el Estudio I tiene dosis de 0,3, 1,0, 3,0 y 10 mg/kg de anticuerpo que se administran como un bolo intravenoso individual. La IgG4 humana de control se dosifica a 10 mg/kg. El vehículo en el Estudio I es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Los datos de la farmacocinética, las respuestas de hierro sérico y las respuestas de hepcidina sérica después de la administración de anticuerpo I se miden de cada animal antes de la dosis (día -1) y a las 1, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 432, 528 y 672 horas después de la dosis y en los días de estudio 36, 43, 50 y 57 para la farmacocinética, la hepcidina sérica y la cuantificación de BMP-6.

En un experimento realizado esencialmente como se describe en este ejemplo 4, el Estudio II tiene dosis de 0,05, 0,3 y 3,0 mg/kg de anticuerpo que se administran como un bolo intravenoso individual. La IgG4 humana de control se dosificó a 3 mg/kg. El vehículo en el Estudio II es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) más Tween 80 al 0,02 %. Los datos de la farmacocinética, las respuestas de hierro sérico y las respuestas de hepcidina sérica después de la administración de anticuerpos se miden de cada animal antes de la dosis (día -1) y a las 1, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 432, 528, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, 1680 y 1848 horas después de la dosis.

En Estudios I y II, las concentraciones máximas en suero (C_{max}) de anticuerpo I se incrementan en un modo aproximadamente proporcional a la dosis en los 0,05 a 10 mg/kg examinados. En el intervalo de dosis examinado, el anticuerpo I muestra una farmacocinética no lineal con un decrecimiento de aclaramiento y de la vida media de eliminación con dosis crecientes. El aclaramiento disminuye de ~ 0,57 a ~ 0,17 ml/h/kg a lo largo del intervalo de dosis examinado. A lo largo del marco temporal y del intervalo de dosis estudiado, la vida media oscila desde ~ 58 a ~ 295 horas.

Los datos farmacodinámicos en las Tablas 8 y 9 muestran que la administración de anticuerpo I está asociada con un incremento inmediato inicial en hierro sérico que alcanza su pico 24 horas antes de volver a niveles cercanos al valor inicial (de pre-dosis) a las 120-240 horas después de la dosificación. En los grupos de dosis 3 y 10 mg/kg, el hierro sérico se eleva de nuevo después de 240 horas de una manera más dependiente de la dosis; se observa elevación de hierro sérico prolongada al final del estudio.

La administración de anticuerpo I se asocia también con una disminución aguda en la hepcidina sérica de macaco de Java que tiene lugar tan pronto como 6 a 12 horas después de la dosis. La hepcidina sérica vuelve a la línea base de una manera dependiente de la dosis en el Estudio II, pero esta dependencia de la dosis del retorno de hepcidina al valor inicial no es tan evidente en el Estudio I. El anticuerpo de control IgG4 humana en el Estudio I muestra una disminución de la hepcidina sérica que no se replica en el Estudio II. Ambos estudios también muestran cambios significativos en los niveles de hierro en suero en la presencia de anticuerpo I que no están correlacionados con los niveles bajos de hepcidina sérica observados.

Tabla 8: Estudio I

Muestra	Media de concentraciones de hierro sérico, µg/dl (2 sujetos)									
	Control		Anticuerpo I							
Dosis	10 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		3,0 mg/kg		10 mg/kg	
	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE
Tiempo, h										
0	103	15,6	119,5	16,3	93	8,5	126	26,9	112	12,7
1	97	0	130	9,9	86,5	10,6	110	8,5	114,5	7,8
6	81	15,6	111,5	21,9	87	14,1	96,5	2,1	95,5	20,5
12	135,5	6,4	189,5	19,1	176	45,3	217	49,5	181,5	20,5
24	70,5	10,6	290	2,8	221	83,4	296	52,3	230,5	62,9
48	87	2,8	257	49,5	200	62,2	266	12,7	257,5	14,8
72	77	14,1	153,5	19,1	120,5	47,4	156	33,9	207	73,5
120	61,5	12	118,5	10,6	118	36,8	133,5	31,8	142	9,9

	Media de concentraciones de hierro sérico, µg/dl (2 sujetos)									
Muestra	Control		Anticuerpo I							
Dosis	10 mg/kg		0,3 mg/kg		1,0 mg/kg		3,0 mg/kg		10 mg/kg	
	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE
Tiempo, h										
168	75,5	7,8	155	22,6	80	11,3	206,5	3,5	200	45,3
240	67	15,6	123,5	12	103	35,4	155	43,8	137,5	0,7
336	65,5	0,7	133,5	26,2	102,5	17,7	168,5	20,5	222	41
432	58	1,4	141,5	16,3	104,5	23,3	224	52,3	204,5	29
528	62,5	3,5	163,5	21,9	145	14,1	265	22,6	239,5	12
672	83,5	6,4	110,5	3,5	99,5	31,8	184	39,6	193,5	24,7
864	82	12,7	115	12,7	92	5,7	193,5	37,5	187	17
1032	75	9,9	99	32,5	75	2,8	136	1,4	173,5	48,8
1200	84	7,1	114	18,4	84,5	9,2	179,5	6,4	185	14,1
1368	86	7,1	117	1,4	76	11,3	158,5	4,9	198	18,4

Tabla 9: Estudio II

	Concentraciones de hierro sérico promedio, µg/dl (3 sujetos para el anticuerpo I)							
Muestra	Control		Anticuerpo I					
Dosis	3 mg/kg		0,05 mg/kg		0,3 mg/kg		3,0 mg/kg	
	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE
Tiempo, h								
0	120,5	3,5	137,7	30,5	149,3	23,4	96,3	10,7
1	119	28,3	152,3	34,8	121,3	31	95,3	13,6
6	91	14,1	134,7	13,3	115	32	79,7	14,6
12	121	5,7	193	37,4	201	37,3	147,3	7,6
24	128,5	2,1	276,3	27,5	305	45,6	283,7	7,5
48	118,5	9,2	182,7	52,2	275,7	54,4	263,3	32
72	85,5	0,7	165,7	56,5	192,7	36,1	163,7	45,3
120	81,5	3,5	149	61	168	32,8	153,3	13,9
168	96,5	9,2	138,7	38,6	189,3	22,6	143,3	10,1
240	108,5	20,5	105	31,5	140,3	16,7	146,7	19,4
336	119,5	4,9	111,3	35,4	170	24,6	159	80,3
432	96,5	4,9	179,3	40,5	249,7	24	235,7	47,4
528	83	28,3	109,3	30,4	152,7	32,6	176,3	60,1
672	151	15,6	125	27,9	118	21	184,7	25,1

	Concentraciones de hierro sérico promedio, µg/dl (3 sujetos para el anticuerpo I)							
Muestra	Control		Anticuerpo I					
Dosis	3 mg/kg		0,05 mg/kg		0,3 mg/kg		3,0 mg/kg	
	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE	µg/dl	DE
Tiempo, h								
840	106,5	37,5	134	44,8	114	20	161	8,5
1008	106,5	23,3	132	32,1	126	28,8	188,7	50,6
1176	117,5	0,7	133,7	35,2	125,3	20,6	199,3	69,5
1344	111	14,1	121,3	24,4	108,7	10,5	166,7	11,6
1512	139,5	3,5	137,3	40,1	118,7	13,1	121,7	11,8
1680	141	9,9	135,7	25,1	123,7	11,4	125,7	16,4
1848	142	11,3	141,3	43	132,7	14,6	107	19,3

Estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos de HuA507 después de una dosis intravenosa única a macacos de Java macho

En un experimento realizado esencialmente como se describe en este ejemplo 4, la PK/PD sérica de HuA507 se pone a prueba después de una dosis intravenosa única a macacos de Java macho normales. HuA507 es un anticuerpo quimérico hecho reemplazando las regiones constantes de ratón del anticuerpo MAB507 de R & D Systems con un armazón de IgG4PAA humana. Una dosis de 10 mg/kg de bolo intravenoso individual de anticuerpo anti-HuA507 o de IgG4 humana de control se da en un volumen de 1 ml/kg. El vehículo en el estudio es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). La sangre se extrajo de cada pre-dosis para animales (Día 1) y en 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 264, 336, 432, 528 y 624 horas después de la dosis para los análisis. Con la dosis de 10 mg/kg de anticuerpo HuA507, la concentración de hierro en suero promedio aumenta desde aproximadamente 150 µg/ml en pre-dosis a aproximadamente 210 µg/ml a las 12 horas después de la dosis, pero luego cae de nuevo al valor inicial durante 48 horas. A diferencia del efecto farmacodinámico prolongado para el Anticuerpo I mostrado en este ejemplo 4, el tratamiento con HuA507 solo muestra un aumento corto, inicial en la concentración de hierro en suero a las 48 horas, pero no la respuesta prolongada vista con el anticuerpo I.

Ejemplo 5: Eficacia en modelo de AEC en rata

La eficacia de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención se puede medir en un modelo de AEC de rata. En ratas Lewis hembra, de 8 a 10 semanas de edad, la inflamación puede inducirse por una dosis intraperitoneal de 5 mg/kg de extracto de pared celular bacteriana gram-positiva (Lee Labs, n.º: PG-PS 10S) en el día 0. Sin ningún tratamiento adicional, las concentraciones de hemoglobina reducidas se pueden ver en este modelo dentro de los 10 días de tratamiento con el extracto de pared celular. El tratamiento con 10 mg/kg de un anticuerpo de la presente invención se puede iniciar con una dosis IV en el día 8 y dosis IV semanalmente continuadas del anticuerpo. Las concentraciones de hemoglobina, hierro sérico y hepcidina se pueden medir y comparar con los valores observados con el tratamiento por un control de HulgG4.

Para el análisis de patología clínica, aproximadamente 0,2 ml de sangre se pueden recoger en los puntos temporales de cada animal a través de un pinzamiento de la cola en tubos que contenían EDTA. La sangre se puede usar para medir el hierro sérico, la capacidad de unión a hierro no saturado, la capacidad de unión a hierro total, el porcentaje de saturación de hierro y las mediciones de hematología estándar utilizando procedimientos estándar. Para todos los demás análisis, se pueden recoger aproximadamente 0,75 ml de sangre en los puntos temporales de cada animal a través de un pinzamiento de la cola en tubos que no contenían ningún anticoagulante.

En un experimento realizado esencialmente como se describe en este ejemplo 5, el anticuerpo I muestra una respuesta farmacodinámica prolongada con hemoglobina y hierro más altos de forma estadísticamente significativa que en el control de isotipo hlgG4 en la mayoría de los días hasta el final del estudio en el día 60. En comparación con el control, el aumento de la concentración de hemoglobina es de aproximadamente 0,82 a 1,5 g/dl. Los eritrocitos en el grupo tratado se hacen microcíticos y menos hipocrómicos una vez se inicia el tratamiento con anticuerpo I. En base al cambio en las características de eritrocitos, se puede concluir que el aumento en hemoglobina observado en el estudio se deriva de la normalización incrementada de tamaño de los eritrocitos y del nivel de hemoglobina celular más que del aumento de la producción de glóbulos rojos.

Listado de secuencias

<110> Eli Lilly & Company
 <120> Anticuerpos anti-BMP-6
 <130> X19829
 <150> 61/737.859
 5 <151> 17/12/2012
 <160> 17
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 490
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

Pro Pro Pro Leu Arg Pro Pro Leu Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 1          5          10          15

Gly Gly Gln Leu Leu Gly Asp Gly Gly Ser Pro Gly Arg Thr Glu Gln
 20          25          30

Pro Pro Pro Ser Pro Gln Ser Ser Ser Gly Phe Leu Tyr Arg Arg Leu
 35          40          45

Lys Thr Gln Glu Lys Arg Glu Met Gln Lys Glu Ile Leu Ser Val Leu
 50          55          60

Gly Leu Pro His Arg Pro Arg Pro Leu His Gly Leu Gln Gln Pro Gln
 65          70          75          80

Pro Pro Ala Leu Arg Gln Gln Glu Glu Gln Gln Gln Gln Gln Leu
 85          90          95

Pro Arg Gly Glu Pro Pro Pro Gly Arg Leu Lys Ser Ala Pro Leu Phe
100          105          110

Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Leu Ser Ala Asp Asn Asp Glu Asp Gly
115          120          125

Ala Ser Glu Gly Glu Arg Gln Gln Ser Trp Pro His Glu Ala Ala Ser
130          135          140

Ser Ser Gln Arg Arg Gln Pro Pro Pro Gly Ala Ala His Pro Leu Asn
145          150          155          160

Arg Lys Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ala Ser Pro
    
```

ES 2 608 381 T3

				165				170				175			
Leu	Thr	Ser	Ala	Gln	Asp	Ser	Ala	Phe	Leu	Asn	Asp	Ala	Asp	Met	Val
			180				185						190		
Met	Ser	Phe	Val	Asn	Leu	Val	Glu	Tyr	Asp	Lys	Glu	Phe	Ser	Pro	Arg
			195				200				205				
Gln	Arg	His	His	Lys	Glu	Phe	Lys	Phe	Asn	Leu	Ser	Gln	Ile	Pro	Glu
			210				215				220				
Gly	Glu	Val	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg	Ile	Tyr	Lys	Asp	Cys	Val
225				230						235			240		
Met	Gly	Ser	Phe	Lys	Asn	Gln	Thr	Phe	Leu	Ile	Ser	Ile	Tyr	Gln	Val
			245						250			255			
Leu	Gln	Glu	His	Gln	His	Arg	Asp	Ser	Asp	Leu	Phe	Leu	Leu	Asp	Thr
			260						265			270			
Arg	Val	Val	Trp	Ala	Ser	Glu	Glu	Gly	Trp	Leu	Glu	Phe	Asp	Ile	Thr
			275						280			285			
Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Val	Thr	Pro	Gln	His	Asn	Met	Gly	Leu
			290			295						300			
Gln	Leu	Ser	Val	Val	Thr	Arg	Asp	Gly	Val	His	Val	His	Pro	Arg	Ala
305				310						315			320		
Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Arg	Asp	Gly	Pro	Tyr	Asp	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
			325						330			335			
Val	Ala	Phe	Phe	Lys	Val	Ser	Glu	Val	His	Val	Arg	Thr	Thr	Arg	Ser
			340						345			350			
Ala	Ser	Ser	Arg	Arg	Arg	Gln	Gln	Ser	Arg	Asn	Arg	Ser	Thr	Gln	Ser
			355			360						365			
Gln	Asp	Val	Ala	Arg	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ser	Glu
			370			375						380			
Leu	Lys	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Gln	Asp
385				390						395			400		
Leu	Gly	Trp	Gln	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asn
			405						410			415			

ES 2 608 381 T3

Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala
420 425 430

Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro Glu
435 440 445

Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser
450 455 460

Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg
465 470 475 480

Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
485 490

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

Arg Ser Ser Glu Asn Ile Tyr Arg Asn Leu Ala
1 5 10

10 <210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 3

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 4

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 4

Gln Gly Ile Trp Gly Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Met His
1 5 10

10 <210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 6

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 7

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Arg Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 8

Arg Pro Phe Gly Asn Ala Met Asp Ile
1 5

5

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Asn Ile Tyr Arg Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 10

15

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

ES 2 608 381 T3

<400> 10

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	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Asn	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	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	Arg	Pro	Phe	Gly	Asn	Ala	Met	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115													

<210> 11

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 11

ES 2 608 381 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 Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Arg Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Arg Pro Phe Gly Asn Ala Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 12

ES 2 608 381 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	Arg	Ser	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Arg	Asn	20	25	30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Ala	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gly	Ile	Trp	Gly	Thr	Pro	Leu	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	210													

<210> 13

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

ES 2 608 381 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 13

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	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Asn	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	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	Arg	Pro	Phe	Gly	Asn	Ala	Met	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125	
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140	
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190	
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	210	215	220	

ES 2 608 381 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 444

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 14

ES 2 608 381 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	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Arg	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Asn	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	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	Arg	Pro	Phe	Gly	Asn	Ala	Met	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125	
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140	
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190	
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	210	215	220	
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240

ES 2 608 381 T3

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 15

<211> 642

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 15

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gatcttccga aaatatattac cgtaatttag catgggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaacaaact tagcagatgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcaaggc atttggggta ctccgctcac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc	642

<210> 16

<211> 1332

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 16

ES 2 608 381 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggata tacattcact agctatgcta tgcaactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat attaatcctt ataatgatgg tactaagtac	180
aatgagaact tcaaaggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggccc	300
tttggtaacg ctatggacat ttggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcggctctt cccgctagcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca	420
gccgccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc	540
tactccctca gcagcgtggc gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc	600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttga gtccaaatat	660
ggcccccat gccaccctg cccagcacct gaggccgccg ggggaccatc agtcttcctg	720
ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
gtgggtggacg tgagccagga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagagc cacagggtga caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggc caaaggcttc taccacgagc acatcgccgt ggagtgggaa	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc	1320
ctgtctctgg gt	1332

<210> 17

<211> 1332

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 17

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggata tacattcact agctatgcta tgcactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat attaatcctt ataatcgtgg tactaagtac	180
aatgagaact tcaaaggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaggccc	300
tttggtaacg ctatggacat ttggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcggtctt cccgctagcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca	420
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc	600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttga gtccaaatat	660
ggtcccccat gccaccctg cccagcacct gagggccgcg ggggaccatc agtcttcctg	720
ttcccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggaa	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc	1320
ctgtctctgg gt	1332

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a BMP-6 humana (SEQ ID NO: 1), que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que la LCDR1 es el polipéptido de RSSENIYRNLA (SEQ ID NO: 2), la LCDR2 es el polipéptido de AATNLAD (SEQ ID NO: 3), la LCDR3 es el polipéptido de QGIWGTPLT (SEQ ID NO: 4), la HCDR1 es el polipéptido de GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 5), la HCDR2 es el polipéptido de YINPYNDGTYKYNENFKG (SEQ ID NO: 6) o YINPYNRGTYKYNENFKG (SEQ ID NO: 7) y la HCDR3 es el polipéptido de RPFGNAMDI (SEQ ID NO: 8).
2. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, en el que el LCDR1 es el polipéptido de RSSENIYRNLA (SEQ ID NO: 2), la LCDR2 es el polipéptido de AATNLAD (SEQ ID NO: 3), la LCDR3 es el polipéptido de QGIWGTPLT (SEQ ID NO: 4), la HCDR1 es el polipéptido de GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 5), la HCDR2 es el polipéptido de YINPYNDGTYKYNENFKG (SEQ ID NO: 6) y la HCDR3 es el polipéptido de RPFGNAMDI (SEQ ID NO: 8).
3. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, en el que el LCDR1 es el polipéptido de RSSENIYRNLA (SEQ ID NO: 2), la LCDR2 es el polipéptido de AATNLAD (SEQ ID NO: 3), la LCDR3 es el polipéptido de QGIWGTPLT (SEQ ID NO: 4), la HCDR1 es el polipéptido de GYTFTSYAMH (SEQ ID NO: 5), la HCDR2 es el polipéptido de YINPYNRGTYKYNENFKG (SEQ ID NO: 7) y la HCDR3 es el polipéptido de RPFGNAMDI (SEQ ID NO: 8).
4. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.
5. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 4, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 10.
6. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 4, en el que la LCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 9 y la HCVR es el polipéptido de SEQ ID NO: 11.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 4, que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que la LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 12, y la HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que la LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 12, y la HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 13.
9. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que la LC es el polipéptido de SEQ ID NO: 12, y la HC es el polipéptido de SEQ ID NO: 14.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 7, que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada cadena ligera es el polipéptido de SEQ ID NO: 12, y cada cadena pesada es el polipéptido de SEQ ID NO: 13.
11. El anticuerpo de una cualquiera de la reivindicación 1, 4 o 7, que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada cadena ligera es el polipéptido de SEQ ID NO: 12 y cada cadena pesada es el polipéptido de SEQ ID NO: 14.
12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un vehículo, diluyente o excipiente aceptable.
13. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en tratamiento.
14. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso en el tratamiento de anemia.
15. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para el uso según la reivindicación 14, en el que la anemia es anemia de las enfermedades crónicas.
16. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para el uso según la reivindicación 15, en el que la anemia de las enfermedades crónicas se selecciona del grupo que consiste en anemia del cáncer y la anemia de enfermedad renal crónica.