

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 232**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/EP2010/056298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10128158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10717658 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2427494**

54 Título: **Métodos de modulación de fibrosis usando moduladores de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP-9)**

30 Prioridad:

**08.05.2009 US 215694 P**

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

**26.02.2018**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BUCKLER, ALAN;  
CHEN, CHAO-MIN;  
GUY, CHANTALE y  
HEWETT, JEFFREY**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 656 232 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**

Métodos de modulación de fibrosis usando moduladores de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP-9)

**Antecedentes de la invención**

5 La fibrosis es un proceso patológico que se refiere a la formación o el desarrollo anómalo de tejido conectivo fibroso en exceso por las células en un órgano o tejido. Aunque los procesos relacionados con la fibrosis pueden tener lugar como parte de la formación o reparación de tejido normal, la desregulación de estos procesos puede llevar a una composición celular alterada y a una deposición de tejido conectivo en exceso que progresivamente deteriora la función del tejido o del órgano.

10 Por ejemplo, más de cinco millones de personas en todo el mundo están afectadas por fibrosis pulmonar, que tiene lugar cuando los sacos aéreos de los pulmones se van reemplazando de manera gradual por tejido fibrótico, provocando una pérdida irreversible de la capacidad del tejido para transferir oxígeno al torrente sanguíneo. De manera adicional, la fibrosis hepática supone una importante carga asistencial a nivel mundial y es resultado de una excesiva formación de tejido conectivo en el hígado que puede llevar a hipertensión portal o incluso a cirrosis (véase Murphy y col., Expert Opin Investig Drugs. noviembre de 2002; 11(11):1575-85). De manera adicional, existen otros muchos trastornos fibróticos, incluyendo fibrosis vascular, fibrosis pancreática, fibrosis renal, fibrosis musculoesquelética, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel, fibrosis ocular, esclerosis sistémica progresiva (ESP), enfermedad injerto contra huésped crónica, enfermedad de Peyronie, estenosis uretral postcistoscopia, fibrosis retroperitoneal idiopática y farmacológicamente inducida, fibrosis del mediastino, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa y fibrosis neoplásica.

20 Aunque los agentes terapéuticos, tales como los fármacos antiinflamatorios, se usan a menudo para tratar la fibrosis, tales tratamientos pueden tener una baja eficacia y efectos secundarios indeseables. Por otra parte, actualmente no existen tratamientos o curas totalmente eficaces para los trastornos fibróticos. En consecuencia, existe una gran necesidad en la materia de grupos que puedan inhibir la fibrosis y, por lo tanto, se puedan usar para tratar o prevenir la fibrosis en un sujeto, así como métodos para diagnosticar esta enfermedad debilitante.

**25 Sumario de la invención**

La presente invención proporciona anticuerpos antagonistas anti-BMP9 para su uso en procedimientos para tratar o prevenir la fibrosis en un sujeto y procedimientos para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico. La presente invención se basa, al menos en parte, en la demostración por los presentes inventores de que la BMP9 y la BMP 10 desempeñan un papel anteriormente desconocido en la diferenciación de fibroblastos y la síntesis excesiva y la acumulación de matriz extracelular y remodelación de tejidos mediante fibroblastos durante la fibrosis.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para tratar o prevenir un trastorno fibrótico en un sujeto. Los procedimientos incluyen la administración a un sujeto, por ejemplo, un ser humano o un animal, de una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de proteína morfogenética ósea 9 (BMP9). En una realización, el trastorno fibrótico incluye, pero no se limita a, fibrosis vascular, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), fibrosis pancreática, fibrosis hepática (por ejemplo, cirrosis), fibrosis renal, fibrosis musculoesquelética, fibrosis cardíaca (por ejemplo, fibrosis del endomiocardio, miocardiopatía idiopática), fibrosis de la piel (por ejemplo, esclerodermia, cicatrización cutánea postraumática, operatoria, queloides y formación de queloides cutáneos), fibrosis ocular (por ejemplo, glaucoma, esclerosis de los ojos, fibrosis de la conjuntiva y de la córnea y terigio), esclerosis sistémica progresiva (ESP), enfermedad injerto contra huésped crónica, enfermedad de Peyronie, estenosis uretral postcistoscopia, fibrosis retroperitoneal idiopática y farmacológicamente inducida, fibrosis del mediastino, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa y fibrosis neoplásica. En una realización particular, el trastorno fibrótico no es mielofibrosis.

45 En una realización particular, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-BMP9 para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno fibrótico en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anti-BMP9, en donde el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel y fibrosis pulmonar.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona procedimientos para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico. Los procedimientos incluyen poner en contacto una muestra de un sujeto con un reactivo capaz de detectar BMP9 y detectar BMP9, en donde un elevado nivel de BMP9 (por ejemplo, al menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5 veces mayor en relación con el control) es un indicativo de que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico. En una realización particular, el procedimiento incluye una etapa adicional de detectar la presencia de marcadores adicionales de fibrosis, por ejemplo, alfa actina de músculo liso, proteína oligomérica de la matriz del cartílago de colágeno de tipo III, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, proteína 1

específica de fibroblastos, fibronectina, serpinE1, periostina, IGFBP3, SPARC, CTGF, TGF $\beta$ , Cyr61, y fosfo smad 2/3.

5 En una realización, la muestra incluye células o tejidos obtenidos del sujeto. En otra realización, la muestra es un líquido (por ejemplo, líquido sanguíneo, linfa, líquido ginecológico, líquido cístico, líquido ocular, orina y líquido recogido mediante enjuague peritoneal) obtenido del sujeto.

10 Los reactivos abarcados por los procedimientos de la invención incluyen cualquier agente conocido capaz de detectar la BMP9. En una realización, el reactivo es un anticuerpo. En otra, el reactivo es un ácido nucleico. Los reactivos también se pueden marcar (por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato de metal o una enzima), para facilitar la detección de BMP9.

15 En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona procedimientos para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar un trastorno fibrótico en un sujeto. Estos procedimientos incluyen poner en contacto una primera muestra obtenida del sujeto antes de administrar al menos una parte del régimen de tratamiento al sujeto con un reactivo capaz de detectar BMP9, poner en contacto una segunda muestra obtenida del sujeto tras la administración de al menos una parte del régimen de tratamiento con un reactivo capaz de detectar BMP9 o BMP10, comparar los niveles de BMP9 de la primera y segunda muestra, en donde un elevado nivel de BMP9 presente en la primera muestra, en relación con la segunda muestra, es un indicativo de que el régimen de tratamiento es eficaz para tratar un trastorno fibrótico en el sujeto. En una realización particular, el régimen de tratamiento comprende la administración de un anticuerpo antagonista de BMP9.

20 Los anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención incluyen todas las formas conocidas de anticuerpos que tienen al menos secuencias de región variable. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal murino, humano, humanizado, quimérico o biespecífico. El anticuerpo puede ser un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, afficuerpo, avímero, versacuerpo, nanocuerpo y anticuerpo de dominio y el anticuerpo puede ser un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE.

25 Los anticuerpos antagonistas de BMP9 usados en los procedimientos de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier procedimiento adecuado que incluye, pero sin limitación, la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

### 30 **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** representa los resultados de un experimento de inmunotinción de alto contenido que lleva a la identificación de BMP9 (es decir, GDF2) y BMP10 como dianas terapéuticas capaces del tratamiento de trastornos fibróticos.

35 La **Figura 2** es un gráfico que representa la actividad de BMP9 y BMP10 sobre la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos en un ensayo de cribado de alto rendimiento (HTS, por el inglés *High Throughput Screening*).

La **Figura 3** es un gráfico que representa la regulación positiva del colágeno de tipo III, un marcador de fibrosis conocido, tras el tratamiento de los fibroblastos con BMP9 o BMP10 recombinante.

40 La **Figura 4** es un gráfico que representa la regulación positiva de la alfa actina del músculo liso, un marcador de fibrosis conocido, tras el tratamiento de los fibroblastos con BMP9 o BMP10 recombinante.

La **Figura 5** es un gráfico que representa la regulación positiva de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (POMC), un marcador de fibrosis conocido, tras el tratamiento de los fibroblastos con BMP9 o BMP10 recombinante.

45 La **Figura 6** es un gráfico que representa los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-BMP9 y un receptor soluble ALK1-Fc sobre la actividad de BRE-luciferasa estimulada por BMP9 en un ensayo de gen reportero.

La **Figura 7** representa los cambios morfológicos e inmunohistoquímicos en células Hep3B tratadas con o sin BMP9 en un ensayo de transdiferenciación epitelio-mesénquima (TEM).

Las **Figuras 8A-8D** son gráficos que representan el efecto de BMP9 sobre la expresión de cuatro marcadores de

fibroblastos diferentes (es decir,  $\alpha$ AML, Col la1, proteína específica de fibroblasto y vimentina) en un ensayo de TEM.

La **Figura 9** representa los efectos de un anticuerpo monoclonal neutralizante de BMP9 y un receptor soluble (ALK1-Fc) sobre la expresión de FSP-1 inducida por BMP9 en un ensayo de TEM.

**5 Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona el uso de anticuerpos antagonistas anti-BMP9 para el tratamiento o la prevención de un trastorno fibrótico en un sujeto y procedimientos para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico. La presente invención se basa, al menos en parte, en la demostración por los presentes inventores de que la BMP9 y la BMP10 desempeñan un papel previamente desconocido en la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos durante el desarrollo de la fibrosis.

Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente invención, se definen previamente determinados términos. Las definiciones adicionales se proporcionan a lo largo de la descripción detallada.

**I. Definiciones**

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión proteínas morfogenéticas óseas (también citadas de manera intercambiable en el presente documento como "BMP") se refiere a un grupo de factores de crecimiento y citocinas multifuncionales conocidos por su capacidad para inducir la formación de hueso y cartílago. Hasta la fecha, se han identificado aproximadamente 20 BMP. Con la excepción de la proteína morfogenética ósea 1 (BMP1), todas las proteínas morfogenéticas óseas pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF  $\beta$ ) (véase Chen y col., Growth Factors. diciembre de 2004;22(4):233-41).

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión proteína morfogenética ósea 9 (también citada de manera intercambiable en el presente documento como "BMP9", "BMP-9", "factor de diferenciación de crecimiento 2", "GDF-2", "GDF2", y "precursor del factor de crecimiento/diferenciación 2" se refiere al miembro conocido en la materia de la superfamilia de TGF $\beta$ /BMP que es conocido por ser un potente inductor de la diferenciación de osteoblastos de las células madre mesenquimales (véase Tang y col. (2008) J Cell Mol Med. [PMID: 19175684]). También se ha  
25 demostrado que la BMP9 está implicada en la regulación del metabolismo de la glucosa, capaz de reducir la glucemia en ratones diabéticos, un factor de diferenciación para las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central, y de inducir la expresión de una hormona (hepcidina) que desempeña un papel en la homeostasis del hierro (David y col. 2008. Circ Res. 25 de abril;102(8):914-22).

30 Se ha descubierto que tras la activación de células madre hepáticas, éstas secretan rápidamente cantidades en aumento de la BMP9, que después inducen la señalización mediada por Smad1 en hepatocitos, afectando por lo tanto a la expresión de genes que median la proliferación y/o la fibrogénesis (Breitkopf y col. 2009, Journal of Hepatology, vol.50, 1 de abril, página S110). Una secuencia representativa de BMP9, incluye, pero no se limita a, la secuencia expuesta a continuación.

BMP9 / Factor de diferenciación de crecimiento 2 [Homo sapiens] (NP\_057288) (SEQ ID NO:1)

MCPGALWVALPLLSLLAGSLQGKPLQSWGRGSAGGNAHSPLGVPGGGLPE  
HTFNLMFLENVKVDFLRSLNLSGVPSQDKTRVEPPQYMIDLNRYTSDKSTTPA  
SNIVRSFSMEDAISITATEDFPFQKHILLFNISIPRHEQITRAELRLYVSCQNHVDPSH  
DLKGSVVIYDVLDGTDWDSATETKTFLVSQDIQDEGWETLEVSSAVKRWVRS  
STKSKNKLEVTVESHRKGCDTLDISVPPGSRNLPFFVVFSDNHSSGKTRLELRE  
MISHEQESVLKLSKDGSTEAGESSHEEDTDGHVAAGSTLARRKRSAGAGSHCQ

35 KTSLRVNFEDIGWDSWIIAPKEYEAYECKGGCFFPLADDVTPTKHAIVQTLVHLK  
FPTKVGKACCVPTKLSPIVLYKDDMGVPTLKYHYEGMSVAECGR

BMP9 / Factor de diferenciación de crecimiento 2 [Homo sapiens] (AF188285) (SEQ ID NO:2)

ES 2 656 232 T3

```

cgggccagcc cggcagcggg tgagagtggg tgctggccag gacggttcct tcagagcaaa
cagcagggag atgcccggcc gctccttccc agctcctccc cgtgcccget aacacagcac
ggccgctgc agtctctctt ctgggtgatt gcgcccggcct aagatgtgtc ctggggcact
gtgggtggcc ctgcccctgc tgctcctgct ggctggctcc ctacagggga agcactgca
gagctgggga cgaggggtctg ctgggggaaa cgcaccacagc ccaactggggg tgccctggagg
tgggctgcct gagcacacct tcaacctgaa gatgtttctg gagaacgtga aggtggattt
cctgcgcagc cttaacctga gtgggggtccc ttgcagggac aaaaccaggg tggagccgcc
gcagtacatg attgacctgt acaacaggta caggtccgat aagtcgacta cgcacagcgtc
caacattgtg cggagcttca gcatggaaga tgccatctcc ataactgcca cagaggactt
ccccttccag aagcacatct tgctcttcaa catctccatt cctaggcctg agcagatcac
cagagtggag ctccgactct atgtctcctg tcaaaatcac gtggaccctc ctcatgacct
gaaaggaaagc gtgggtcattt atgatgttct ggatggaaca gatgcctggg atagtgtctac
agagaccaag accttctggg tgtcccagga cattcaggat gagggtggg agaccttggg
agtgtccagc gccgtgaagc gctgggtccg gtccgactcc accaagagca aaaataagct
ggaagtgact gtggagagcc acaggaaggg ctgagacacg ctggacatca gtgtccccc
aggttccaga aacctgcctt tttttgttgt cttctccaat gaccacagca gtgggacca
ggagaccagg ctggagctga gggagatgat cagccatgaa caagagagcg tgctcaagaa
gctgtccaag gacggctcca cagagggcagg tgagagcagt cacgaggagg acacggatgg
ccacgtggct gcgggggtcga ctttagccag gcggaaaagg agcgcggggg ctggcagcca
ctgtcaaaaag acctccctgc gggtaaaactt cgaggacatc ggtggggaca gctggatcat
tgacaccaag gagtatgaag cctacgagtg taagggcggc tgettcttcc ccttggctga
cgatgtgagc ccgacgaaac acgctatcgt gcagaccctg gtgcatctca agtccccac
aaaggctggc aaggcctgct gtgtgcccac caaactgagc cccatctccg tccctacaa
ggatgacatg ggggtgcccc ccccaagta ccattacgag ggcatgagcg tggcagagtg
tgggtgcagg tagtatctgc ctgcccgggt ggggaggcag gccaaagggg ctccacatga
gaggtcctgc atgcccctgg gcacaacaag gactgattca atctgcatgc cagcctggag
gaggaaaagg agcctgctct cctccccac accccacca aagcatacac cgtgagctc
aactgccagg gaaggctaag gaaatgggga tttgagcaca acaggaaagc ctgggagggt
tgttgggatg caaggaggtg atgaaaagga gacaggggga aaaataatcc atagtacgca
gaaaacaaca gcagtgagcc agaggagcac aggcggggcag gtcaactgag agactgatgg
aagttagaga ggtggaggag gccagctcgc tccaaaacc ttggggagta gagggaagga
gcagggcggc tgtcacaccc atcattgtat gttatttccc acaaccagc tggaggggca
tggcttccaa tttagagacc cg

```

Las moléculas de BMP9 de murino y de otros animales se conocen en la materia (véase, por ejemplo, NP\_062379 para la BMP9 de murino y NP\_001099566 para la BMP9 de rata).

- 5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión proteína morfogenética ósea 10 (también citada de manera intercambiable en el presente documento como "BMP10", "BMP-10", "MGC126783" y "precursor de proteína morfogenética ósea 10" se refiere en la materia a un miembro conocido de la superfamilia de TGFβ/BMP. Se ha sugerido que la BMP10 es un componente esencial en la modulación de la proliferación y maduración de los cardiomiocitos durante el desarrollo ventricular cardíaco. (Chen y col.,(2004) Development.131(9):2219-31 y Neuhaus y col., (1999) Mech Dev., 80(2):181-4).
- 10 Una secuencia representativa de BMP10, incluye, pero no se limita a, la secuencia expuesta a continuación.

Preproteína de proteína morfogenética ósea 10 [Homo sapiens](NP\_055297) (SEQ ID NO:3)

```

MGSVLVTLCLFCLAAYLVSGSPIMNLEQSPLEEDMSLFGDVFSEQDGVDFNTLL
QSMKDEFLKTLNLSDIPTQDSAKVDPPEYMLELYNKFATDRSMPANIIRSFKNE
DLFSQPVSFNVSIPHHEEVIMAELRLYTLVQRDRMIYDGVDRKITIFEVLESKGDN
EGERNMLVLVSGEITYGTNSEWETFDVTDAIRRWQKSGSSTHQLEVHIESKHDEAE
DASSGRLEIDTSAQNKHNPLLIVSDDQSSDKERKEELNEMISHEQLPELDNLGLD
SFSSGPGEEALLQMRSNIIYDSTARIRRNAKGNKYCKRTPLYIDFKEIGWDSWIIAPP
GYEAYECRGVCNYPLAEHLTPTKHAIQALVHLKNSQKASKACCVPTKLEPISILY
LDKGVVYTKFKYEGMAVSECGCR

```

Proteína morfogenética ósea 10 [Homo sapiens](NM\_014482) (SEQ ID NO:4)

```

ggggagagga agagtggtag ggggagggag agagagagga agagtttcca aacttgtctc
cagtgcacagg agacatttac gttccacaag ataaaactgc cacttagagc ccaggggaagc
taaacccttc tggcttggcc taggagctcg agcggagtca tgggctctct ggctctgaca
ctgtgcgctc ttttctgcct ggcagettac ttggtttctg gcagccccat catgaacctc
gagcagctc ctctggaaga agatatgtcc ctctttgggtg atgttttctc agagcaagac
ggtgtcgact ttaacacact gctccagagc atgaaggatg agtttcttaa gacactaaac
ctctctgaca tccccacgca ggattcagcc aaggtggacc caccagagta catggttgaa
ctctacaaca aatttgcaac agatcggacc tccatgcctc ctgccaacat cattaggagt
ttcaagaatg aagatctggt tccccagccg gtcagtttta atgggctccg aaaatacccc
ctctcttca atgtgtccat tctccaccat gaagaggtea tcatggctga acttaggcta
tacacactgg tgcaaaagggg tegtatgata tacgatggag tagaccggaa aattaccatt
tttgaagtgc tggagagcaa aggggataat gagggagaaa gaaacatgct ggtcttgggtg
tctggggaga tatatggaac caacagtgag tgggagactt ttgatgtcac agatgccatc
agacgttggc aaaagtcagg ctcatccacc caccagctgg aggtccacat tgagagcaaa
cacgatgaag ctgaggatgc cagcagtggg cggctagaaa tagataccag tgcccagaat
aagcataacc ctttgcctcat cgtgttttct gatgacccaa gcagtgacaa ggagaggaag
gaggaactga atgaaatgat tccccatgag caacttccag agctggacaa cttgggcctg
gatagctttt ccagtggacc tggggaagag gctttgttgc agatgagatc aaacatcctc
tatgactcca ctgcccgaat cagaaggaac gccaaaggaa actactgtaa gaggaccccg
ctctacatcg acttcaagga gattgggtgg gactcctgga tcatcgtcc gcctggatac
gaagcctatg aatgcctggg tgtttgtaac taccctctgg cagagcatc cacaccaca
aagcatgcaa ttatccaggc cttggctcac ctcaagaatt cccagaaagc ttccaaagcc
tgctgtgtgc ccacaaagct agagcccatc tccatcctc atttagacaa aggcgtcgtc
acctacaagt ttaaatacga aggcattggc gtctccgaat gtggctgtag atagaagaag
agtcctatgg cttatttaat aactgtaa atgtgtatatt ggtgttcta tttaatgaga
ttatttaata aggggtgtaca gtaatagagg cttgctgcct tcaggaaatg gacaggtcag
tttgttgtag gaaatgcata tttt

```

Las moléculas de BMP10 de murino y de otros animales se conocen en la materia (véase, por ejemplo, NP\_033886 para la BMP10 de murino).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "antagonista" se refiere a cualquier resto que regula negativamente la actividad de BMP9 y/o BMP10, incluyendo agentes que regulan negativamente la expresión de BMP9 y/o BMP10 o inhiben la función de BMP9 y/o BMP10.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "regula negativamente" se refiere a cualquier descenso estadísticamente significativo en una actividad biológica y/o expresión de BMP9 y/o BMP10, incluyendo el bloqueo completo de la actividad (es decir, la inhibición completa) y/o de la expresión. Por ejemplo, "regulación negativa" se puede referir a una disminución de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 % en la actividad y/o en la expresión de BMP9 y/o de BMP10.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibir" o "inhibición" de fibrosis se refiere a cualquier descenso estadísticamente significativo en una actividad biológica y/o en la expresión de BMP9 y/o de BMP10, incluyendo el bloqueo completo de la actividad y/o de la expresión. Por ejemplo, "inhibición" puede referirse a un descenso de aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 % en la actividad y/o en la expresión de BMP9 y/o de BMP10.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "fibrosis" se refiere a la formación o el desarrollo anómalo de tejido conectivo fibroso en exceso por las células en un órgano o tejido. Aunque los procesos relacionados con la fibrosis pueden tener lugar como parte de la formación o reparación de tejido normal, la desregulación de estos procesos puede llevar a una composición celular alterada y a una deposición de tejido conectivo en exceso que progresivamente deteriora la función del tejido o del órgano. Existen varios tipos de fibrosis, por ejemplo, la fibrosis quística del páncreas y de los pulmones, la fibrosis por inyección, que puede tener lugar como una complicación de las inyecciones intramusculares, especialmente en niños, la fibrosis endomiocárdica, la fibrosis pulmonar idiopática del pulmón, la fibrosis del mediastino, la mielofibrosis, la fibrosis retroperitoneal, la fibrosis masiva progresiva, una  
25 complicación de la neumoonosis de los trabajadores del carbón, y la fibrosis sistémica nefrogénica.

30 Tal como se usa en el presente documento, Las expresiones "trastorno fibrótico", "afección fibrótica", y "enfermedad fibrótica", se usan de manera intercambiable para referirse a un trastorno, afección o enfermedad caracterizada por fibrosis. Los ejemplos de trastornos fibróticos incluyen, pero sin limitación, fibrosis vascular, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), fibrosis pancreática, fibrosis hepática (por ejemplo, cirrosis), fibrosis renal, fibrosis musculoesquelética, fibrosis cardíaca (por ejemplo, fibrosis del endomiocardio, miocardiopatía idiopática), fibrosis de la piel (por ejemplo, esclerodermia, cicatrización cutánea postraumática, operatoria, queloides y formación

de queloides cutáneos), fibrosis ocular (por ejemplo, glaucoma, esclerosis de los ojos, fibrosis de la conjuntiva y de la córnea y terigio), esclerosis sistémica progresiva (ESP), enfermedad injerto contra huésped crónica, enfermedad de Peyronie, estenosis uretral postcistoscopia, fibrosis retroperitoneal idiopática y farmacológicamente inducida, fibrosis del mediastino, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa y fibrosis neoplásica.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "célula" se refiere a cualquier célula predispuesta a experimentar una respuesta fibrótica, incluyendo, pero sin limitación, células individuales, tejidos, y células en tejidos y órganos. El término célula, tal como se usa en el presente documento, incluye a la propia célula, así como a la matriz extracelular (MEC) que rodea a la célula. Por ejemplo, la inhibición de la respuesta fibrótica de una célula, incluye, pero sin limitación, la inhibición de la respuesta fibrótica de una o más células en el pulmón (o en el tejido pulmonar); una o más células en el hígado (o en el tejido hepático); una o más células en el riñón (o en el tejido renal); una o más células en el tejido muscular; una o más células en el corazón (o en el tejido cardíaco); una o más células en el páncreas; una o más células en la piel; una o más células en el hueso, una o más células en el sistema vascular, una o más células madre o una o más células en el ojo.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "transición epitelio-mesénquima" (TEM) se refiere a la conversión desde un fenotipo epitelial hasta un fenotipo mesenquimático, que es un proceso normal del desarrollo embrionario. La TEM es también el proceso mediante el cual las células epiteliales que funcionan como transportadores iónicos y de fluidos llegan a ser células mesenquimáticas que remodelan la matriz. En carcinomas, esta transformación da como resultado la alteración de la morfología celular, la expresión de proteínas mesenquimáticas y un aumento de la capacidad de invasión. Los criterios para definir la TEM *in vitro* implican la pérdida de polaridad de las células epiteliales, la separación en células individuales y la posterior dispersión tras la adquisición de motilidad celular (véase Vincent-Salomon y col., *Breast Cancer Res.* 2003; 5(2): 101-106). Las clases de moléculas que cambian en la expresión, distribución y/o función durante la TEM, y que están causalmente implicadas, incluyen factores de crecimiento (por ejemplo, factores de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ , wnts), factores de transcripción (por ejemplo, snails, SMAD, LEF y  $\beta$ -catenina nuclear), moléculas del eje de adhesión célula a célula (cadherinas, cateninas), moduladores del citoesqueleto (familia Rho) y proteasas extracelulares (metaloproteinasas de la matriz, activadores del plasminógeno) (véase Thompson y col., *Cancer Research* 65, 5991-5995, 15 de julio de 2005).

## II. Métodos de tratamiento o prevención de trastornos fibróticos

30 La presente invención proporciona métodos novedosos de tratamiento y/o prevención de un trastorno fibrótico en un sujeto. Los métodos incluyen la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de BMP9, tratando y/o previniendo de este modo un trastorno fibrótico en un sujeto.

35 Los términos "tratar", "tratado", "tratando", y "tratamiento", tal como se usan en el presente documento, se refieren a las medidas terapéuticas descritas en el presente documento. Los métodos de "tratamiento" incluyen la administración de un anticuerpo antagonista de BMP9 a un sujeto con el fin de curar, reducir la gravedad o aliviar uno o más síntomas de una enfermedad o afección fibrótica, con el fin de prolongar la salud o la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento. Por ejemplo, "tratamiento" incluye el alivio de un síntoma de enfermedad fibrótica (por ejemplo, dificultad para respirar, astenia, tos, pérdida de peso, pérdida de apetito asociada con fibrosis pulmonar o anorexia, astenia, pérdida de peso, hipertensión portal y ascitis asociada con fibrosis hepática) en un sujeto en al menos el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, el 13 %, el 14 %, el 15 %, el 16 %, el 17 %, el 18 %, el 19 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o más.

45 Los términos "prevenir", "prevenido", "previniendo" y "prevención", tal como se usan en el presente documento, se refieren a medidas preventivas descritas en el presente documento. Los métodos de "prevención" incluyen la administración de un anticuerpo antagonista de BMP9 a un sujeto con el fin de retrasar, prevenir o impedir uno o más síntomas de una enfermedad o afección. Por ejemplo, "prevención" incluye una aparición retrasada o una inhibición de un síntoma de enfermedad fibrótica (por ejemplo, dificultad para respirar, astenia, tos, pérdida de peso, pérdida de apetito asociada con fibrosis pulmonar o anorexia, astenia, pérdida de peso, hipertensión portal y ascitis asociada con fibrosis hepática) en un sujeto en al menos el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, el 13 %, el 14 %, el 15 %, el 16 %, el 17 %, el 18 %, el 19 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o más.

50 Los términos "paciente" o "sujeto" tal como se usan en el presente documento pretenden incluir al ser humano y a pacientes veterinarios. En una realización particular, el sujeto es un ser humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ratones, conejos, ovejas, perro, vaca, pollos, anfibios y reptiles.

55

#### A. Indicaciones

Los métodos de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir trastornos fibróticos. Los tipos ejemplares de trastornos fibróticos incluyen, aunque sin limitación, fibrosis vascular, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), fibrosis pancreática, fibrosis hepática (por ejemplo, cirrosis), fibrosis renal, fibrosis musculoesquelética, fibrosis cardíaca (por ejemplo, fibrosis del endomiocardio, miocardiopatía idiopática), fibrosis de la piel (por ejemplo, esclerodermia, cicatrización cutánea postraumática, operatoria, queloides y formación de queloides cutáneos), fibrosis ocular (por ejemplo, glaucoma, esclerosis de los ojos, fibrosis de la conjuntiva y de la córnea y terigio), esclerosis sistémica progresiva (ESP), enfermedad injerto contra huésped crónica, enfermedad de Peyronie, estenosis uretral postcistoscopia, fibrosis retroperitoneal idiopática y farmacológicamente inducida, fibrosis del mediastino, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, enfermedad de Dupuytren, estenosis y fibrosis inducida por radiación. En una realización particular, el trastorno fibrótico no es mielofibrosis.

#### B. Terapias de combinación

La presente invención contempla el uso de BMP9 y los antagonistas en combinación con una u otras modalidades terapéuticas más. Por lo tanto, además del uso del anticuerpo antagonista de BMP9, se puede administrar al sujeto una o más terapias "convencionales" para el tratamiento de trastornos fibróticos. Por ejemplo, se pueden administrar los antagonistas en combinación con (es decir, junto con o unidos a (es decir, un inmunoconjugado)) citotoxinas, agentes inmunosupresores, agentes radiotóxicos y/o anticuerpos terapéuticos. Los coterapéuticos contemplados por la presente invención incluyen, aunque sin limitación, esteroides (por ejemplo, corticosteroides, tales como prednisona), agentes inmunosupresores y/o antiinflamatorios (por ejemplo, interferón gamma, ciclofosfamida, azatioprina, metotrexato, penicilamina, ciclosporina, colchicinas, globulina antitimocítica, micofenolato mofetilo e hidroxiclороquina), fármacos citotóxicos, bloqueadores de los canales de calcio (por ejemplo, nifedipina), inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), ácido para-aminobenzoico (PABA), dimetilsulfóxido, inhibidores del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), inhibidores de interleucina 5 (IL-5) e inhibidores de pan caspasa.

Los agentes antifibróticos que se pueden usar en combinación con un anticuerpo antagonista de BMP9 incluyen, aunque sin limitación, lectinas (tal como se describe en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º: 7.026.283, así como los agentes antifibróticos descritos por Wynn y col. (Journal Clin. Invest. Vol 117 Número 3, marzo de 2007, p524. Por ejemplo, los agentes antifibróticos y las terapias adicionales incluyen, aunque sin limitación, diversos fármacos antiinflamatorios/ inmunosupresores/ citotóxicos (que incluyen colchicina, azatioprina, ciclofosfamida, prednisona, talidomida, pentoxifilina y teofilina), modificadores de la señalización del TGF- $\beta$  (que incluyen relaxina, SMAD7, HGF y BMP7, así como inhibidores de TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ RI, TGF $\beta$ RII, EGR-1 y CTGF), citocina y antagonistas del receptor de citocina (inhibidores de IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-13, IL-21, IL-4R, IL-13R $\alpha$ 1, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , oncostatina M, WISP-1 y PDGF), citocinas y quimiocinas (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha/\beta$ , IL-12, IL-10, HGF, CXCL10 y CXCL11), antagonistas de quimiocinas (inhibidores de CXCL1, CXCL2, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL6, CCL17 y CCL18), antagonistas del receptor de quimiocinas (inhibidores de CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2 y CXCR4), antagonistas de TLR (inhibidores de TLR3, TLR4 y TLR9), antagonistas de angiogénesis (anticuerpos específicos de VEGF y terapia de reemplazo de adenosina desaminasa), fármacos antihipertensivos (beta bloqueantes e inhibidores de ANG II, ECA y aldosterona), sustancias vasoactivas (antagonistas del receptor ET-1 y bosetan), inhibidores de enzimas que sintetizan y procesan colágeno (inhibidores de prolil hidroxilasa), antagonistas de linfocitos B (rituximab), antagonistas de integrina/moléculas de adhesión (moléculas que bloquean las integrinas  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 y  $\alpha$ v $\beta$ 6, así como los inhibidores de cinasa ligada a integrina y anticuerpos específicos para ICAM-1 y VCAM-1), fármacos proapoptóticos que se dirigen a miofibroblastos, inhibidores de MMP (inhibidores de MMP2, MMP9 y MMP12) e inhibidores de TIMP (anticuerpos específicos para TIMP-1).

El anticuerpo antagonista de BMP9 y el agente coterapéutico o la coterapia se puede administrar en la misma formulación o de manera separada. En el caso de la administración separada, el anticuerpo antagonista de BMP9 se puede administrar antes, después o de manera concurrente con el coterapéutico o la coterapia. Un agente puede preceder o seguir la administración del otro agente en intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones en las que se apliquen por separado dos o más tipos diferentes de agentes terapéuticos a un sujeto, en general, se aseguraría de que no pase un período de tiempo significativo entre el momento de administración, de manera que estos diferentes tipos de agentes aún sean capaces de ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre los tejidos o células diana.

En una realización, el anticuerpo antagonista de BMP9 (por ejemplo, un anti-BMP9 o anti-anticuerpo) se puede unir a una segunda molécula de unión, tal como un anticuerpo (es decir, formando de este modo una molécula biespecífica) u otro agente de unión que, por ejemplo, se una a una diana diferente o a un epítipo diferente sobre BMP9 o BMP10. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar en terapia de combinación con los antagonistas desvelados en el presente documento se describen en mayor detalle a continuación en la sección de inmunoconjugados.

### C. Dosificaciones/ Cantidades

Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento, se refieren a una cantidad de un anticuerpo antagonista de BMP9 que es suficiente como para efectuar un tratamiento o la prevención de un trastorno fibrótico, tal como se describe en el presente documento, cuando se administra a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y de la gravedad del trastorno fibrótico que se está tratando, del peso y de la edad del sujeto, de la forma de administración y similares, que se puede determinar fácilmente por el experto en la materia. Las dosificaciones de anticuerpo antagonista de BMP9 para la administración pueden variar desde, por ejemplo, de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 10.000 mg, de aproximadamente 5 ng a aproximadamente 9.500 mg, de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 9.000 mg, de aproximadamente 20 ng a aproximadamente 8.500 mg, de aproximadamente 30 ng a aproximadamente 7.500 mg, de aproximadamente 40 ng a aproximadamente 7.000 mg, de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 6.500 mg, de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 6.000 mg, de aproximadamente 200 ng a aproximadamente 5.500 mg, de aproximadamente 300 ng a aproximadamente 5.000 mg, de aproximadamente 400 ng a aproximadamente 4.500 mg, de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 4.000 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3.500 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 3.000 mg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 2.600 mg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 2.575 mg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 2.550 mg, de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 2.500 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 2.475 mg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 2.450 mg, de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 2.425 mg, de aproximadamente 300 µg a aproximadamente 2.000, de aproximadamente 400 µg a aproximadamente 1.175 mg, de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 1.150 mg, de aproximadamente 1.100 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1.125 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1.100 mg, de aproximadamente 1,25 mg a aproximadamente 1.075 mg, de aproximadamente 1,5 mg a aproximadamente 1.050 mg, de aproximadamente 2,0 mg a aproximadamente 1.025 mg, de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 3,0 mg a aproximadamente 975 mg, de aproximadamente 3,5 mg a aproximadamente 950 mg, de aproximadamente 4,0 mg a aproximadamente 925 mg, de aproximadamente 4,5 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 875 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 850 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 825 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 775 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 725 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 675 mg, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 650 mg, aproximadamente 500 mg, o de aproximadamente 525 mg a aproximadamente 625 mg de un anticuerpo antagonista de BMP9. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial (es decir, efectos secundarios) de un anticuerpo antagonista de BMP9 se minimizan y/o se compensan mediante los efectos beneficiosos.

Los niveles de dosificación reales del anticuerpo antagonista de BMP9 usado en los métodos de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, la composición y el modo de administración, sin ser tóxicas para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad del anticuerpo antagonista de BMP9 particular empleado, o el éster, la sal o la amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de eliminación del antagonista particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el antagonista particular empleado, la edad, el sexo, el peso, la afección, el estado de salud general y los antecedentes médicos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario que tenga experiencia en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del antagonista requerido. Por ejemplo, el médico o el veterinario podría comenzar con dosis del antagonista a niveles más bajos del requerido con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un anticuerpo antagonista de BMP9 será esa cantidad que es la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrada de manera próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de un anticuerpo antagonista de BMP9 se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado en intervalos apropiados a lo largo del día, de manera opcional, en formas de dosificación unitarias. Cuando sea posible administrar un anticuerpo antagonista de BMP9 de la presente invención solo, es preferible administrar el antagonista como una formulación farmacéutica (composición).

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis tal como se indique con las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, el anticuerpo antagonista de BMP9 usado en los métodos de la presente invención se puede administrar una vez o dos veces semanalmente mediante inyección subcutánea o una o dos veces mensualmente mediante inyección subcutánea.

Es especialmente ventajoso formular anticuerpos antagonistas de BMP9 parenterales en formas de dosificación unitaria para la facilidad de la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del antagonista activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria se dictan por y dependen directamente de (a) las características únicas del antagonista activo y el efecto terapéutico particular a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer tal antagonista activo para el tratamiento de la sensibilidad en sujetos.

#### D. Métodos de administración y formulaciones

Para administrar un anticuerpo antagonista de BMP9 usado en los métodos de la presente invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario incluir el antagonista en una formulación adecuada para evitar su inactivación. Por ejemplo, el anticuerpo antagonista de BMP9 se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones acuosas tamponadas. los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan y col. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el anticuerpo antagonista de BMP9, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar con el anticuerpo antagonista de BMP9.

El anticuerpo terapéutico antagonista de BMP9 típicamente debe ser estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El antagonista se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar incluyendo un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el antagonista activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración.

En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y el secado en frío (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

El anticuerpo antagonista de BMP9 que se puede usar en los métodos de la presente invención incluyen aquellos adecuados para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la materia de farmacia. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación generalmente será aquella cantidad de antagonista que produce un efecto terapéutico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente el 0,001 por ciento a aproximadamente el noventa por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente el 0,005 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferentemente desde aproximadamente el 0,01 por ciento hasta aproximadamente el 30 por ciento.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración que no sean la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Los ejemplos de los vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear junto con el anticuerpo antagonista de BMP9 utilizado en los métodos de la presente invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

El anticuerpo antagonista de BMP9 también se puede administrar con adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar mediante procedimientos de esterilización y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorbutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma inyectable del fármaco se puede llevar a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando el anticuerpo antagonista de BMP9 usado en los métodos de la presente invención se administra a seres humanos y animales, se puede dar solo o como un antagonista farmacéutico que contiene, por ejemplo, del 0,001 al 90 % (más preferentemente, del 0,005 al 70 %, tal como del 0,01 al 30 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El anticuerpo antagonista de BMP9 se puede administrar con dispositivos médicos conocidos en la materia. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede administrar un antagonista con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos desvelados en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de Estados Unidos N.º 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamento a una tasa controlada; la Patente de Estados Unidos N.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente de Estados Unidos N.º 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicamento para suministrar medicamento a una tasa de infusión precisa; la Patente de Estados Unidos N.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la Patente de Estados Unidos N.º 4.439.196, que desvela un sistema de administración osmótica de fármaco que tiene compartimentos multicámara; y la Patente de Estados Unidos N.º 4.475.196, que desvela un sistema de administración osmótica de fármaco. Muchos otros de estos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

En ciertas realizaciones, se pueden formular los antagonistas para asegurar la adecuada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHM) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que el anticuerpo antagonista de BMP9 cruza la BHM (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más grupos que se transportan de manera selectiva en células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida de fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Los grupos de direccionamiento ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.416.016 para Low y col.); manósidos (Umezawa y col., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y col. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais y col. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de proteína A del tensioactivo (Briscoe y col. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134), diferentes especies de las cuales pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier y col. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

### **III. Métodos de diagnóstico**

La presente invención también proporciona métodos novedosos para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico. Los individuos sospechosos de tener un trastorno fibrótico se beneficiarían de una detección temprana, de manera que la progresión de la enfermedad fibrótica se pueda retrasar o incluso detener. Los métodos incluyen evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico, que comprende poner en contacto una muestra de un sujeto con un reactivo capaz de detectar BMP9 y detectar la BMP9 o la BMP10, en donde un nivel elevado de BMP9 en relación con un control es un indicativo de que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico.

La invención proporciona adicionalmente métodos para determinar o predecir la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar un trastorno fibrótico. Estos métodos incluyen evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar un trastorno fibrótico en un sujeto, comprendiendo el método: a) poner en contacto una primera muestra obtenida del sujeto antes de administrar al menos una parte del régimen de tratamiento al sujeto con un reactivo capaz de detectar BMP9 o BMP10; b) poner en contacto una segunda muestra obtenida del sujeto

tras la administración de al menos una parte del régimen de tratamiento con un reactivo capaz de detectar BMP9 o BMP10; y c) comparar los niveles de BMP9 de la primera y segunda muestra, en donde un elevado nivel de BMP9 presente en la primera muestra, en relación con la segunda muestra, es un indicativo de que el régimen de tratamiento es eficaz para tratar un trastorno fibrótico en el sujeto.

- 5 En una realización particular, el método puede incluir una etapa adicional de detección de un marcador adicional de fibrosis, incluyendo, pero sin limitación, alfa actina de músculo liso, colágeno de tipo III, proteína oligomérica de la matriz del cartílago, colágeno de tipo I, colágeno de tipo IV, proteína 1 específica de fibroblastos, fibronectina, serpinE1, periostina, IGFBP3, SPARC, CTGF, TGFb, Cyr61, y fosfo smad 2/3, usando ensayos bien conocidos en la materia. Tales ensayos incluyen, aunque sin limitación, métodos inmunológicos para la detección de proteínas, métodos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad proteica, métodos de hibridación de ácido nucleico, métodos de transcripción inversa de ácido nucleico y métodos de amplificación de ácido nucleico, ELISA, inmunotransferencia, análisis por transferencia de Western, análisis por transferencia de Northern, microscopía electrónica y análisis por transferencia de Southern. En una realización particular, el método puede incluir adicionalmente la detección de fibrosis usando biopsias, tales como biopsias de hígado, o dispositivos comercialmente disponibles, tales como Fibroscan (disponible en Londres, Reino Unido) o Fibrotest (disponible en Francia, Europa).

- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" incluye cualquier fluido corporal (por ejemplo, líquido sanguíneo, linfa, líquido ginecológico, líquido cístico, orina, líquidos oculares y líquidos recogidos mediante enjuague peritoneal) o una célula de un sujeto. Normalmente, el tejido o célula se extraerá del paciente, pero también se contempla el diagnóstico *in vivo*. Otras muestras de pacientes, incluyen lágrimas, suero, líquido cefalorraquídeo, heces, esputos y extractos celulares.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "reactivo capaz de detectar BMP9 y/o BMP10" incluye cualquier reactivo capaz de unirse de manera específica con BMP9 y transformar BMP9 en un grupo detectable. Los reactivos detectables incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y similares. Los reactivos adecuados para la unión con un ácido nucleico de BMP9 (por ejemplo, un ADN genómico, un ARNm, un ARNm cortado y empalmado, un ADNc o similares) incluyen ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, los reactivos de ácidos nucleicos pueden incluir oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un sustrato, oligonucleótidos marcados no unidos con un sustrato, pares de cebadores de PCR, sondas de balizas moleculares y similares.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "control" puede ser el nivel de BMP9 en una muestra de un sujeto que no padece fibrosis. Puede ser el mismo tipo de muestra que la muestra de ensayo o diferente. Por ejemplo, si la muestra del sujeto que se está ensayando es una muestra de hígado (por ejemplo, una célula, un grupo de células o tejido obtenido de una biopsia del hígado), entonces la muestra de control también puede ser una muestra de hígado de un sujeto que no padece un trastorno fibrótico. Como alternativa, la muestra de control puede ser de un tipo diferente, por ejemplo, puede ser una muestra de sangre de un sujeto que no padece un trastorno fibrótico. En otras realizaciones, la muestra de control puede ser un grupo de muestras de un sujeto que no tiene un trastorno fibrótico o una muestra de un grupo de sujetos que no tienen trastorno fibrótico.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, "un nivel anómalo" de BMP9 es cualquier nivel de BMP9 que difiere del nivel de control de BMP9 y/o de BMP10, por ejemplo, los niveles significativamente mayores o elevados, o los niveles significativamente menores o disminuidos.

- 45 Tal como se usa en el presente documento, un "nivel superior", "nivel elevado", o "nivel aumentado" de BMP9 se refiere a un nivel que es elevado en relación con un control adecuado. Preferentemente, el diferencial del control adecuado es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar el nivel. Por otra parte, el nivel elevado es preferentemente al menos dos veces y más preferentemente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces el nivel de BMP9 en un control adecuado (por ejemplo, una muestra de un sujeto que no tiene una enfermedad fibrótica o el nivel promedio de BMP9 en varias muestras de control u otro punto de referencia adecuado).

- 50 Tal como se usa en el presente documento, un "nivel deprimido", "nivel menor" o "nivel disminuido" de una BMP9 se refiere a un nivel que ha disminuido en relación con un control adecuado. Preferentemente, el diferencial del control adecuado es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar el nivel. El nivel disminuido es preferentemente al menos dos veces, y más preferentemente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces menor que el nivel del control adecuado (por ejemplo, el nivel en un sujeto sano que no tiene una enfermedad fibrótica o el nivel promedio de BMP9 en varias muestras de control u otro punto de referencia adecuado).

- 55 Tal como se usa en el presente documento, los términos "eficaz" y "eficacia" se refieren a la probabilidad de que un régimen de tratamiento trate un trastorno fibrótico en un sujeto. Por ejemplo, un régimen de tratamiento se considera "eficaz" y se considera una opción de tratamiento viable si el tratamiento lleva a un alivio de los síntomas de la

enfermedad fibrótica (por ejemplo, dificultad para respirar, astenia, tos, pérdida de peso, pérdida de apetito asociada con fibrosis pulmonar o anorexia, astenia, pérdida de peso, hipertensión portal y ascitis asociada con fibrosis hepática) en un sujeto en al menos el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, el 13 %, el 14 %, el 15 %, el 16 %, el 17 %, el 18 %, el 19 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o más.

A. Ensayos

La presencia, la ausencia y/o el nivel de BMP9 en una muestra biológica obtenida de un sujeto se puede evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de técnicas y métodos *in vitro* e *in vivo*, que transforman la BMP9 en la muestra en un grupo que se puede detectar y cuantificar. Los ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen analizar la muestra usando métodos inmunológicos para la detección de proteínas, métodos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad proteica, métodos de hibridación de ácido nucleico, métodos de transcripción inversa de ácido nucleico y métodos de amplificación de ácido nucleico, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), inmunotransferencia, análisis por transferencia de Western, análisis por transferencia de Northern, microscopía electrónica, espectrometría de masas, inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, hibridaciones de Southern y similares. Tales técnicas, así como otras descritas en el presente documento, también se pueden usar para detectar marcadores fibróticos adicionales, incluyendo, pero sin limitación, alfa actina de músculo liso, colágeno de tipo III, proteína oligomérica de la matriz del cartílago, colágeno de tipo I, colágeno de tipo IV, proteína 1 específica de fibroblastos, fibronectina, serpinE1, periostina, IGFBP3, SPARC, CTGF, TGF $\beta$ , Cyr61, y fosfo smad 2/3, cuando sea aplicable.

En una realización, la presencia, la ausencia y/o el nivel de BMP9 en una muestra se puede evaluar usando un reactivo, tal como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima), un derivado de anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo conjugado con un sustrato o con la proteína o el ligando de un par proteína-ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina)), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla o un dominio hipervariable aislado de un anticuerpo) al que se une de manera específica y transforma el biomarcador, por ejemplo, BMP9 y/o BMP10, en una mezcla en una molécula detectable.

El término "marcado", con relación al anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo del anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable para el anticuerpo, así como el marcaje indirecto del anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado de forma directa. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente, de manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada de manera fluorescente.

En otra realización, la presencia, la ausencia y/o el nivel de BMP9 se evalúa usando un ácido nucleico. Por ejemplo, En una realización, la presencia, la ausencia y/o el nivel de BMP9 se evalúa usando una sonda de ácido nucleico.

El término "sonda", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que es capaz de unirse de manera selectiva a BMP9 y/o a BMP10. Las sondas se pueden sintetizar por un experto en la materia, o derivan de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas se pueden diseñar de manera específicas para ser marcadas. Los ejemplos de moléculas que se pueden utilizar como sondas incluyen, aunque sin limitación, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

El ARNm aislado se puede usar en ensayos de hibridación o de amplificación que incluyen, aunque sin limitación, análisis de Southern o de Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matriz de sondas. Un método para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que se pueda hibridar con ARNm de BMP9. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente como para hibridar de manera específica en condiciones rigurosas con ADN genómico de BMP9.

En una realización, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, dejando correr el ARNm sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm desde el gel hasta una membrana, tal como nitrocelulosa. En una realización alternativa, la(s) sonda(s) se inmovilizan sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en una matriz de microplaca de genes Affymetrix. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente los métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la detección del nivel de ARNm de BMP9.

Un método alternativo para determinar el nivel de ARNm de BMP9 en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, 1987, Patente de Estados Unidos N.º 4.683.202.), la reacción en cadena de la ligasa (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), la replicación de secuencia autosostenida (Guatelli y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 87:1874-1878), el sistema de amplificación tradicional (Kwo y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), la replicasa Q-beta (Lizardi y col. (1988) Bio/Technology 6:1197), la replicación en círculo rodante (Lizardi y col. Patente de Estados Unidos N.º 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. En aspectos particulares de la invención, la expresión de BMP9 y/o de BMP10 se evalúa mediante RT-PCR cuantitativa fluorogénica (es decir, el sistema TaqMan™). Tales métodos típicamente utilizan pares de cebadores de oligonucleótidos que son específicos para BMP9 y/o BMP10. Los métodos para diseñar cebadores de oligonucleótidos específicos para una secuencia conocida son bien conocidos en la materia.

Los niveles de expresión del ARNm de BMP9 se pueden controlar usando una membrana de transferencia (tal como las usadas en análisis de hibridación tales como Northern, Southern, dot y similares), o micropocillos, tubos de muestra, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprenda ácidos nucleicos unidos). Véase las patentes de EE.UU. N.º 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 y 5.445.934. La detección de la expresión de BMP9 también puede comprender el uso de sondas de ácido nucleico en solución.

En una realización de la invención, se usan micromatrices para detectar la expresión de BMP9. Las micromatrices son particularmente muy adecuadas para este fin debido a la reproducibilidad entre diferentes experimentos. Las micromatrices de ADN proporcionan un método para la medida simultánea de los niveles de expresión de grandes números de genes. Cada ensayo consiste en un patrón reproducible de sondas de captura unidas a un soporte sólido. El ADN o el ARN marcado se hibrida con las sondas complementarias sobre la matriz y después se detecta mediante escáner láser. Se determinan las intensidades de hibridación para cada sonda sobre la matriz y se convierten a un valor cuantitativo que representa niveles de expresión relativa de los genes. Véase, las patentes de EE.UU. n.º 6.040.138, 5.800.992 y 6.020.135, 6.033.860, y 6.344.316. Las matrices de oligonucleótidos de alta densidad son particularmente útiles para determinar el perfil de expresión génica para un gran número de ARN en una muestra.

Por otro lado, las técnicas *in vivo* para la detección de BMP9 incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra BMP9 y/o BMP10, a los que se une y transforma BMP9 en una molécula detectable. Tal como se ha tratado anteriormente, la presencia, el nivel o incluso la localización de la BMP9 detectable en un sujeto se puede detectar y determinar mediante técnicas convencionales de generación de imágenes.

En otra realización, se puede usar espectrometría de masas para detectar BMP9 en una muestra. La espectrometría de masas es una técnica analítica que consiste en ionizar compuestos químicos para generar moléculas cargadas (o fragmentos de las mismas) y medir sus proporciones de masa frente a carga. En un procedimiento típico de espectrometría de masas, se obtiene una muestra de un sujeto, se carga en el espectrómetro de masas y sus componentes (por ejemplo, BMP9 se ioniza mediante diferentes métodos (por ejemplo, impactándolos con un haz de electrones), dan como resultado la formación de partículas cargadas (iones). La proporción de masa frente a carga de las partículas se calcula entonces a partir del movimiento de los iones a medida que pasan a través de los campos electromagnéticos.

#### **IV. BMP9 y anticuerpos de antagonismo**

##### **A. Anticuerpos**

En una realización de la invención, los métodos terapéuticos y de diagnóstico descritos en el presente documento emplean un anticuerpo que se une, por ejemplo, directa o indirectamente a, e inhibe la actividad de BMP9.

##### **i. General**

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina", tal como se usa de manera intercambiable en el presente documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, la "parte de unión a antígeno") o las cadenas simples de los mismos. Un "anticuerpo" comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de la cadena pesada (abreviado en el presente documento como V<sub>H</sub>) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviado en el presente documento como V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, del inglés *complementarity determining regions*), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, del inglés *framework regions*). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta de tres CDR y de cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las

regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del clásico sistema del complemento.

5 La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente la "parte del anticuerpo"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse de manera específica a un antígeno (por ejemplo, a BMP9 y/o BMP 10). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de unión abarcados en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $CL$  y  $CH1$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $CH1$ ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un único brazo de un anticuerpo, (v) un dAb que incluye los dominios  $V_H$  y  $V_L$ ; (vi) un fragmento de dAb (Ward y col. (1989) Nature 341, 544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vii) un dAb que consiste en un dominio  $V_H$  o en un dominio  $V_L$ ; y (viii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (ix) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas mediante un enlazador sintético. Por otro lado, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242, 423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883). También se pretende que los anticuerpos de cadena única estén abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la materia y se seleccionan en función de su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, al contrario de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre el antígeno. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier técnica reconocida en la materia y las descritas en el presente documento, tales como, por ejemplo, un método de hibridoma, tal como se describe por Kohler y col. (1975) Nature, 256:495, un animal transgénico, tal como se describe por, por ejemplo, (véase, por ejemplo, Lonberg, y col. (1994) Nature 368(6474): 856-859), los métodos del ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567) o usando bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanos y los anticuerpos humanizados y pueden darse de manera natural o producirse de manera recombinante.

El término "anticuerpo recombinante", se refiere a anticuerpos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina (por ejemplo, genes de inmunoglobulina humana) o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes (por ejemplo que contiene secuencias de anticuerpos humanos) usando la expresión en fago, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina (por ejemplo, genes de inmunoglobulina humana) con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes que provienen de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos recombinantes humanos se pueden someter a mutagénesis *in vitro* y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones  $V_H$  y  $V_L$  de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, cuando provienen de y se relacionan con las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  de la línea germinal, no pueden existir de manera natural en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo*.

La expresión "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables provienen de una primera especie y cuyas regiones constantes provienen de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o los anticuerpos quiméricos se pueden construir, por ejemplo, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulinas que pertenecen a especies diferentes.

60 La expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que

5 tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR provienen de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana tal como se describe, por ejemplo, por Kabat y col. (véase Kabat y col. (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242). Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también proviene de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio dirigido *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR provengan de la línea germinal de otra especie de mamífero, tales como un ratón, se han insertado en las secuencias marco humanas.

15 El anticuerpo humano puede tener al menos uno o más aminoácidos sustituidos por un resto de aminoácido, por ejemplo, un resto de aminoácido que mejora la actividad y que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulinas de la línea germinal. Típicamente, el anticuerpo humano puede tener hasta veinte posiciones sustituidas con restos de aminoácidos que no son parte de la secuencia de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En una realización particular, estas sustituciones están en las regiones CDR tal como se describe en detalle a continuación.

20 La expresión "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). La expresión "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizada" (es decir, una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o una "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región marco sustancialmente variable de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano y adicionalmente incluye regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o una parte de la misma, en el caso de una cadena ligera y preferentemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). La expresión "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región marco sustancialmente variable de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

35 Un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos que incluyen la fusión de los hibridomas o la unión de los fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79, 315-321; Kostelny y col. (1992) J. Immunol. 148, 1547-1553.

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con el organismo no humano o planta transgénicos que producen tal anticuerpo.

40 Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une de manera específica a BMP9 es sustancialmente libre de anticuerpos que se unen de manera específica a antígenos que no sean BMP9). Además, un anticuerpo aislado típicamente es sustancialmente libre de otro material celular y/o compuesto químico. En una realización de la invención, una composición de anticuerpos monoclonales "aislados" que tiene diferentes especificidades de unión se combinan en una composición bien definida.

50 Tal como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. En una realización, un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo es de un isotipo seleccionado de una IgG1, una IgG2, una IgG3, una IgG4, una IgM, una IgA1, una IgA2, una IgAsec, una IgD o un isotipo de anticuerpo IgE.

Tal como se usa en el presente documento, "cambio de isotipo" se refiere el fenómeno mediante el cual la clase o el isotipo de un anticuerpo cambia desde una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

55 Tal como se usa en el presente documento, "isotipo no cambiado" se refiere a la clase isotípica de la cadena pesada que se produce cuando no tiene lugar el cambio de isotipo; el gen de CH que codifica el isotipo no cambiado es típicamente el primer gen de CH inmediatamente aguas abajo desde el gen VDJ funcionalmente reorganizado. El cambio de isotipo se ha clasificado como cambio de isotipo clásico o no clásico. El cambio de isotipo clásico tiene

lugar mediante fenómenos de recombinación que implican al menos una región de secuencia de cambio en un gen que codifica un anticuerpo. El cambio de isotipo no clásico puede tener lugar mediante, por ejemplo, recombinación homóloga entre la  $\sigma_{\mu}$  humana y la  $\Sigma_{\mu}$  humana (deleción asociada a  $\delta$ ). Los mecanismos alternativos de cambio no clásico, tales como la recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otros, pueden tener lugar y efectúan un cambio de isotipo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia de cambio" se refiere a aquellas secuencias de ADN responsables de la recombinación del cambio. Una secuencia "donadora del cambio", típicamente una región de cambio  $\mu$ , estará en 5' (es decir, aguas arriba) de la región de la construcción a delecionar durante la recombinación del cambio. La región "aceptora del cambio" estará entre la región de la construcción a delecionar y la región constante de sustitución (por ejemplo,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , etc.). Como ni hay un sitio específico en el que siempre tiene lugar la recombinación, la secuencia génica final típicamente no será predecible a partir de la construcción.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un lugar sobre un antígeno al que se une de manera específica una inmunoglobulina o anticuerpo. Los epítipos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se mantienen al tratarlos con disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados mediante plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una única conformación espacial. Los métodos para determinar la conformación espacial de un epítipo incluyen las técnicas en la materia y las descritas en el presente documento, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear en 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Las proteínas de anticuerpos obtenidas a partir de miembros de la familia del camello y del dromedario (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), incluyendo los miembros del Nuevo Mundo tales como las especies de llama (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*), se han caracterizado en función del tamaño, la complejidad estructural y la antigenicidad para sujetos humanos. Determinados anticuerpos IgG hallados en la naturaleza en esta familia de mamíferos carecen de cadenas ligeras y, por lo tanto, son estructuralmente diferentes de la estructura cuaternaria de cuatro cadenas que tiene dos cadenas pesadas y dos ligeras, típica de los anticuerpos de otros animales. Véase, por ejemplo, la Publicación de PCT WO 94/04678.

Se puede obtener una región del anticuerpo de camélido que es el dominio variable único y pequeño identificado como  $V_{HH}$  mediante ingeniería genética para producir una pequeña proteína que tiene alta afinidad por una diana, lo que da como resultado una proteína de bajo peso molecular que proviene de anticuerpos, conocida como un "nanocuerpo de camélido". Véase Patente de EE.UU. N.º 5.759.808; véase también Stijlemans y col., 2004 J. Biol. Chem. 279: 1256-1261; Dumoulin y col., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger y col., 2003 Bioconjugate Chem. 14: 440-448; Cortez-Retamozo y col., 2002 Int. J. Cancer 89: 456-62; y Lauwereys y col., 1998 EMBO J. 17: 3512-3520. Las bibliotecas de anticuerpos de camélidos y de fragmentos de anticuerpos diseñados genéticamente están comercialmente disponibles, por ejemplo, por Ablynx, Ghent, Bélgica. Como con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido se puede alterar de manera recombinante para obtener una secuencia que se asemeja más estrechamente a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo se puede "humanizar". Por lo tanto, la baja antigenicidad natural de los anticuerpos de camélidos para los seres humanos se puede reducir adicionalmente.

El nanocuerpo de camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte del de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de solo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de los nanocuerpos de camélido para unirse a sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles para las proteínas de anticuerpos más grandes, es decir, los nanocuerpos de camélidos son útiles como reactivos para detectar antígenos que son crípticos usando técnicas inmunológicas clásicas y como posibles agentes terapéuticos. Por lo tanto, otra consecuencia más del pequeño tamaño es que un nanocuerpo de camélido puede inhibir como resultado de la unión a un sitio específico en un surco o hendidura angosta de una proteína diana, y por tanto puede servir en una capacidad que se asemeja más estrechamente a la función de un clásico fármaco de bajo peso molecular que a la de un clásico anticuerpo.

El bajo peso molecular y el tamaño compacto además dan como resultado que los nanocuerpos de los camélidos sean extremadamente termoestables, estables a pH extremos y a la digestión proteolítica y poco antigénicos. Otra consecuencia es que los nanocuerpos de camélidos se desplazan fácilmente desde el sistema circulatorio a los tejidos, e incluso atraviesan la barrera hematoencefálica y pueden tratar trastornos que afectan al tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar además el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Véase por ejemplo la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20040161738, publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características junto con la baja antigenicidad en seres humanos suponen un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas se pueden expresar por completo en células procarióticas tales como *E. coli*.

En consecuencia, una característica de la presente invención es un anticuerpo de camélido o un nanocuerpo de

camélido que tiene alta afinidad por la BMP9 o la BMP10. En determinadas realizaciones en el presente documento, el anticuerpo o nanocuerpo de camélido se produce de manera natural en el animal camélido, es decir, se produce por el camélido tras la inmunización con BMP9 o un fragmento peptídico de la misma, usando técnicas descritas en el presente documento para otros anticuerpos. Como alternativa, el nanocuerpo de camélido se diseña por ingeniería genética, es decir, se produce mediante selección, por ejemplo, a partir de una biblioteca de fago que expresa de manera apropiada proteínas de nanocuerpo de camélido mutagenizado usando procedimientos de selección. Los nanocuerpos diseñados por ingeniería genética se pueden hacer a medida adicionalmente mediante ingeniería genética para aumentar la semivida en un sujeto receptor desde 45 minutos hasta dos semanas.

Los diacuerpos son moléculas bivalentes y biespecíficas en las que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se expresan en una única cadena polipeptídica, conectada mediante un enlazador que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se emparejan con dominios complementarios de otra cadena, creando de este modo dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger y col., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak y col., 1994 Structure 2:1121-1123). Los diacuerpos se pueden producir expresando dos cadenas polipeptídicas, bien con la estructura  $V_{HA}-V_{LB}$  y  $V_{HB}-V_{LA}$  (configuración de  $V_H-V_L$ ), o bien  $V_{LA}-V_{HB}$  y  $V_{LB}-V_{HA}$  (configuración de  $V_L-V_H$ ) en la misma célula. La mayoría de ellos se pueden expresar en forma soluble en bacterias.

Los diacuerpos de cadena única (scDb) se producen conectando las dos cadenas polipeptídicas que forman el diacuerpo con un enlazador de aproximadamente 15 restos de aminoácidos (véase Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4):128-30; Wu y col., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36). Los scDb se pueden expresar en las bacterias en forma soluble activa monomérica (véase Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(34): 128-30; Wu y col., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36; Pluckthun y Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2): 83-105; Ridgway y col., 1996 Protein Eng., 9(7):617-21).

Un diacuerpo se puede fusionar a Fc para generar un "didiacuerpo" (véase Lu y col., 2004 J. Biol. Chem., 279(4):2856-65).

Los anticuerpos que se pueden usar en los métodos de la presente invención también incluyen aquellos anticuerpos que se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapante como los anticuerpos particulares descritos en el presente documento, es decir, los anticuerpos que compiten por la unión a BMP9 o se unen a un epítipo sobre BMP9 reconocido por los anticuerpos particulares descritos en el presente documento.

Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo o un epítipo solapante se pueden identificar usando técnicas habituales tales como un inmunoensayo, por ejemplo, demostrando la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina a ensayar inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno, tal como BMP9 o BMP10. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA, del inglés *radioimmunoassay*) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA, del inglés *enzyme immunoassay*) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición de tipo sándwich (véase Stahl y col., (1983) Methods in Enzymology 9:242); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland y col., (1986) J. Immunol. 137:3614); ensayo de marcaje directo en fase sólida, ensayo de tipo sándwich de marcaje directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA de marcaje directo en fase sólida usando el marcador I-125 (véase Morel y col., (1988) Mol. Immunol. 25(1):7); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung y col., (1990) Virology 176:546); y RIA de marcaje directo. (Moldenhauer y col., (1990) Scand. J. Immunol. 32:77). Típicamente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado (por ejemplo BMP9 unida a una superficie sólida o a células que lleven cualquiera de ellos), una inmunoglobulina de ensayo sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Normalmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos el 50-55 %, el 55-60 %, el 60-65 %, el 65-70 %, el 70-75 % o más.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "unión específica", "se une de manera específica", "unión selectiva", y "se une selectivamente", significa que un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo, presenta una afinidad apreciable por un antígeno o epítipo en particular y, en general, no presenta una reactividad cruzada significativa con otros antígenos y epítopos. La unión "apreciable" o preferida incluye la unión con una afinidad de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$   $M^{-1}$ , o  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Las afinidades mayores de  $10^7$   $M^{-1}$ , preferentemente, las afinidades mayores de  $10^8$   $M^{-1}$  son más preferidas. Los valores intermedios de éstos expuestos en el presente documento también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención y se puede indicar una afinidad de unión preferida como un intervalo de afinidades, por ejemplo, de  $10^6$  a  $10^{10}$   $M^{-1}$ , preferentemente de  $10^7$  a  $10^{10}$   $M^{-1}$ , más preferentemente de  $10^8$  a  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Un anticuerpo que "no presenta una reactividad cruzada significativa" es el que no se unirá de manera apreciable a una entidad indeseable (por ejemplo, una entidad proteica indeseable). La unión específica o selectiva se puede determinar de acuerdo con cualquiera de los medios reconocidos en la materia

para determinar tal unión, incluyendo, por ejemplo, de acuerdo con el análisis de Scatchard y/o los ensayos de unión competitiva.

El término " $K_D$ ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular o la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. En una realización, el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención se une a un antígeno (por ejemplo, BMP9 con una afinidad ( $K_D$ ) de 50 nM o mejor (es decir, o menos) (por ejemplo, 40 nM o 30 nM o 20 nM o 10 nM o menos), tal como se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. En una realización particular, un anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención se une a BMP9 con una afinidad ( $K_D$ ) de 8 nM o mejor (por ejemplo, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1,4 nM, 1,3 nM, 1 nM o menos), tal como se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. En otras realizaciones, un anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo se une a un antígeno (por ejemplo, BMP9 con una afinidad ( $K_D$ ) de aproximadamente menos de  $10^{-7}$  M, tal como aproximadamente menos de  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o incluso menor cuando se determina mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (RPS) en un instrumento BIACORE 3000 usando BMP9 recombinante como el analito y el anticuerpo como el ligando, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

El término " $K_{off}$ ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de la tasa de disociación para la disociación de un anticuerpo a partir del complejo anticuerpo/antígeno.

El término "CE50", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo, que induce una respuesta, bien en un ensayo *in vitro* o en un ensayo *in vivo*, que es el 50 % de la respuesta máxima, es decir, a medio camino entre la respuesta máxima y la de partida.

Tal como se usa en el presente documento, "patrón de glucosilación" se define como el patrón de unidades de hidratos de carbono que están unidas de manera covalente a una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina.

La expresión "de origen natural" tanto usada en el presente documento como aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede hallar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo a los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el ser humano en el laboratorio es de origen natural.

El término "reordenado" tal como se usa en el presente documento se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o de cadena ligera en donde un segmento V se sitúa inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio  $V_H$  o  $V_L$  completo, respectivamente. Un locus de gen de inmunoglobulina reorganizado se puede identificar mediante comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reorganizado tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

Las expresiones "no reorganizado" o "configuración de la línea germinal" tal como se usa en el presente documento en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina para estar inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

El término "modificador", o "modificación", tal como se usa en el presente documento, pretenden referirse a cambiar uno o más aminoácidos en los anticuerpos. El cambio se puede producir mediante adición, sustitución o delección de un aminoácido en una o más posiciones. El cambio se puede producir usando técnicas conocidas, tales como mutagénesis de PCR. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede modificar un anticuerpo empleado por los métodos de la presente invención, para modificar de ese modo la afinidad de unión del anticuerpo a BMP9 o BMP10.

La presente invención también abarca sustituciones de "sustituciones de aminoácidos conservativas" en las secuencias de los anticuerpos usados en los métodos de la invención, es decir, las modificaciones de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo codificada por la secuencia de nucleótidos o que contienen la secuencia de aminoácidos, al antígeno, es decir, BMP9 o BMP10. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, en donde una clase se define mediante las propiedades fisicoquímicas de la cadena lateral de aminoácidos y las altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas halladas en la naturaleza, tal como se determina, por ejemplo, mediante una matriz convencional de frecuencias de intercambio de Dayhoff una matriz BLOSUM. Se han categorizado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro resto de la clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservativa. Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-BMP9 de la

presente invención se sustituye preferiblemente con otro resto de aminoácido de la misma clase. Los métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Brummell y col., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi y col. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

- 5 La expresión "sustitución de aminoácidos no conservativa" se refiere a la sustitución de un aminoácido de una clase con un aminoácido de otra clase; por ejemplo, la sustitución de una Ala, un resto de la clase II, por un resto de la clase III tal como Asp, Asn, Glu o Gln.

10 Como alternativa, en otra realización, las mutaciones (conservativas o no conservativas) se pueden introducir de manera aleatoria a lo largo de toda o de una parte de la secuencia codificante del anticuerpo anti-BMP9, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-BMP9 resultantes modificados se pueden seleccionar en función de la actividad de unión.

15 Una "secuencia consenso" es una secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se dan con más frecuencia en una familia de secuencias relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se da con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se dan con la misma frecuencia por igual, se puede incluir cualquiera de ellos en la secuencia consenso. Un "marco consenso" de una inmunoglobulina se refiere a una región marco en la secuencia consenso de la inmunoglobulina.

#### ii. Anticuerpos diseñados y modificados genéticamente

20 Se puede preparar un anticuerpo de la invención usando un anticuerpo que tiene una o más secuencias de  $V_H$  y/o de  $V_L$  como material de partida para diseñar genéticamente un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede diseñar genéticamente modificando uno o más restos en una o ambas regiones variables (es decir,  $V_H$  y/o  $V_L$ ), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones marco. Adicionalmente o como alternativa, se puede diseñar genéticamente un anticuerpo modificando los restos en la(s) región(es) constante(s), por ejemplo, para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

30 Un tipo de ingeniería genética en la región variable que se puede realizar es la inserción de CDR. Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana de manera predominante a través de los restos de aminoácidos que están localizados en las seis CDR de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico de origen natural insertadas en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann y col., 1998 *Nature* 332:323-327; Jones y col., 1986 *Nature* 321:522-525; Queen y col., 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; la Patente de Estados Unidos N.º 5.225.539 y la Patente de Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

40 Las secuencias marco se pueden obtener a partir de bases de datos públicas de ADN o de referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en internet en [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), así como en Kabat y col., 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242; Tomlinson y col., 1992 *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox y col., 1994 *Eur. J. Immunol.* 24:827-836.

45 Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$  se pueden insertar en regiones marco que tienen la secuencia idéntica a la hallada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del que proviene la secuencia marco, o las secuencias de CDR se pueden insertar en regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en determinados casos es beneficioso mutar restos en las regiones marco para conservar o potenciar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370).

55 Las CDR también se pueden insertar en regiones marco de polipéptidos que no sean dominios de inmunoglobulina. Las estructuras apropiadas forman un marco estable de manera conformacional que presenta los restos insertados de manera que formen una superficie localizada y se unan a la diana de interés (por ejemplo, BMP9 o BMP 10). Por ejemplo, las CDR se pueden insertar en una estructura en la que las regiones marco se basan en fibronectina, ankyrina, lipocalina, neocarzinostatina, citocromo b, dedos de zinc de CP1, PST1, superhélice, LACI-D1, dominio Z o

tendramisat (véase, por ejemplo, Nygren y Uhlen, 1997 Current Opinion in Structural Biology, 7, 463-469).

Otro tipo de modificación de la región variable es la mutación de restos de aminoácidos en las regiones de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de  $V_H$  y/o  $V_L$  para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, la afinidad) del anticuerpo de interés, conocida como "maduración de afinidad". La mutagénesis de sitio dirigido o la mutagénesis mediada por PCR se pueden realizar para introducir la(s) mutación(es), y el efecto sobre la unión de los anticuerpos y otra propiedad de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como los descritos en el presente documento. Se pueden introducir modificaciones conservativas. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Por otra parte, típicamente no se alteran más de una, dos, tres, cuatro o cinco restos en una región de CDR.

Los anticuerpos diseñados por ingeniería genética de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones en los restos de la región marco en  $V_H$  y/o  $V_L$ , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones en la región marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "retromutar" uno o más restos de la región marco a la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a una mutación somática puede contener restos de la región marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales restos se pueden identificar mediante la comparación de las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que proviene el anticuerpo. Para reestablecer las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende que tales anticuerpos "retromutados" estén abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación en la región marco implica mutar uno o más restos en la región marco o incluso en una o más regiones CDR, para eliminar los linfocitos T-epítomos para reducir de este modo la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030153043 por Carr y col.

Además o como alternativa a las modificaciones hechas en la región marco o en las regiones CDR, los anticuerpos de la invención se pueden diseñar genéticamente para incluir modificaciones en la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en el suero, la fijación al complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más grupos químicos al anticuerpo) se puede modificar para alterar su glucosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades del anticuerpo.

En una realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de manera que se altera el número de restos de cisteína en la región de bisagra, por ejemplo, se aumenta o se disminuye. Esta estrategia se describe en detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 5.677.425 por Bodmer y col. El número de restos de cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra-Fc de manera que el anticuerpo tiene una unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada en relación con la unión a SpA de Fc-bisagra natural. Esta aproximación se describe en mayor detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 6.165.745 por Ward y col.

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.277.375 describe las siguientes mutaciones en una IgG que aumentan *in vivo* su semivida: T252L, T254S, T256F. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, se puede alterar el anticuerpo en la región CH1 o CL para que contenga un receptor de rescate que se une al epítipo tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.869.046 y 6.121.022 por Presta y col.

En otras realizaciones más, se altera la región Fc sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos por un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero mantenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo original. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc del componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe en detalle en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter y col.

En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos se pueden sustituir por un

resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o abolida. Esta estrategia se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos N.º 6.194.551 por Idusogie y col.

5 En otra realización, se alteran uno o más restos de aminoácidos para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Esta estrategia se describe con más detalle en el documento WO 94/29351 por Bodmer y col.

10 En otra realización más, se modifica la región Fc para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Esta estrategia se describe adicionalmente en el documento WO 00/42072 por Presta. Por otra parte, los sitios de unión sobre la IgG1 humana para FcγR1, FcγR2, FcγR3 y FcRn se han mapeado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. y col., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

15 En otra realización más, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglucosilado (es decir, que el anticuerpo carece de glucosilación). Se puede alterar la glucosilación, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por un antígeno. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden generar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de la región marco variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Tal aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal estrategia se describe con más detalle  
20 en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.714.350 y 6.350.861 por Co y col.

Adicionalmente o como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tiene que tiene estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glucosilación alterada aumentan la capacidad de CCDA de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se  
25 pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Las células con la maquinaria de glucosilación alterada se han descrito en la materia y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hang y col. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa,  
30 de manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular presentan hipofucosilación. La Publicación de PCT WO 03/035835 por Presta describe una variante de la línea celular CHO, las células Lecl3, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono enlazados a Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. y col., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). El documento WO 99/54342 por Umana y col. describe líneas celulares diseñadas por ingeniería genética para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo la beta(1,4)-  
35 N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que tales anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas por ingeniería genética presentan estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas que dan como resultado una actividad de CCDA aumentada de los anticuerpos (véase también Umana y col., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

40 Otra modificación de los anticuerpos en el presente documento que se contempla por la invención es la pegilación. Se puede pegar un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en el suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, típicamente se hace reaccionar el anticuerpo o el fragmento del mismo con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más restos de PEG se unen al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo  
45 mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo y soluble en agua). Tal como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxipoli- polietilenglicol o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la materia  
50 y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 por Nishimura y col. y el documento EP 0 401 384 por Ishikawa y col.

Además, la pegilación se puede lograr en cualquier parte de un polipéptido de unión a BMP9 de la invención mediante la introducción de un aminoácido no natural. Se pueden introducir determinados aminoácidos no naturales mediante la tecnología descrita en Deiters y col., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang y Schultz, Science  
55 301:964-967, 2003; Wang y col., Science 292:498-500, 2001; Zhang y col., Science 303:371-373, 2004 o en la Patente de Estados Unidos N.º 7.083.970. En resumen, algunos de los sistemas de expresión implican la mutagénesis de sitio dirigido para introducir un codon sin sentido, tal como un TAG ámbar, en el marco de lectura abierta que codifica un polipéptido de la invención. Tales vectores de expresión se introducen entonces en un hospedador que puede utilizar un ARNt específico para el codon sin sentido introducido y cargado con el aminoácido

no natural elegido. Los aminoácidos no naturales que son beneficiosos para el fin de conjugar restos con los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con cadenas laterales de acetileno y azido. Los polipéptidos que contienen estos aminoácidos novedosos se pueden entonces pegar en estos sitios elegidos en la proteína.

### iii. Fragmentos de anticuerpo

- 5 La presente invención no se limita a anticuerpos tradicionales y se puede realizar mediante el uso de fragmentos de anticuerpo. Tal como se detalla a continuación, actualmente se ha desarrollado una amplia variedad de tecnologías de fragmentos de anticuerpos y son ampliamente conocidas en la materia.

Los anticuerpos de dominio (dAb) son las unidades de unión funcionales más pequeñas de anticuerpos, que se corresponden con las regiones variables de cualquiera de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y altamente funcionales de dAb de VH y VL humanos (más de diez mil millones de secuencias diferentes en cada biblioteca) y usa estas bibliotecas para seleccionar los dAb que son específicos para dianas terapéuticas. Al contrario de muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas bacterianos, de levaduras y de células de mamífero. Los detalles adicionales de los anticuerpos de dominio y los métodos de producción de los mismos se pueden obtener a modo de referencia en las Patentes de Estados Unidos 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6.696.245; el documento de Estados Unidos de N.º de serie 2004/0110941; la Solicitud de Patente Europea N.º 1433846 y las Patentes Europeas 0368684 y 0616640; los documentos WO05/035572, WO04/10179 WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada de origen natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). De manera importante, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad completa de unión a antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Los nanocuerpos tienen una alta homología con los dominios VH de los anticuerpos humanos y se pueden humanizar de manera adicional sin ninguna pérdida de actividad. De manera importante, los nanocuerpos tiene un bajo potencial inmunogénico, que se ha confirmado en estudios de primates con compuestos que llevan nanocuerpos.

Los nanocuerpos combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con características importantes de los fármacos de molécula pequeña. Al igual que los anticuerpos convencionales, los nanocuerpos presentan una alta especificidad con la diana, una alta afinidad por su diana y una baja toxicidad inherente. Sin embargo, al igual que los fármacos de molécula pequeña, pueden inhibir enzimas y acceder fácilmente a las hendiduras del receptor. Además, los nanocuerpos son extremadamente estables, se pueden administrar por otros medios que no sean la inyección (véase, por ejemplo, el documento WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los nanocuerpos incluyen el reconocimiento de epítopos no comunes o escondidos como resultado de su pequeño tamaño, la unión a cavidades o sitios activos de dianas proteicas con alta afinidad y selectividad debido a su flexibilidad tridimensional única de formato de fármaco, el ajuste de la vida media y la facilidad y velocidad de descubrimiento de fármacos.

Los nanocuerpos se codifican por genes únicos y se producen de manera eficaz en casi todos los hospedadores procariotas y eucariotas, por ejemplo, E. coli (véase, por ejemplo, el documento U.S. 6.765.087, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su integridad), mohos (por ejemplo, Aspergillus o Trichoderma) y levaduras (por ejemplo, Saccharomyces, Kluyveromyces, Hansenula o Pichia) (véase, por ejemplo, el documento U.S. 6.838.254). El proceso de producción se puede hacer a escala y se han producido cantidades de varios kilogramos de nanocuerpos. Dado que los nanocuerpos presentan una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, se pueden formular como una solución de larga vida útil y fácil de usar.

El método del nanoclon (véase, por ejemplo, el documento WO 06/079372) es un método patentado para generar nanocuerpos contra una diana deseada, basado en la selección automatizada de linfocitos B de alto rendimiento y se podría usar en el ámbito de la presente invención.

Los unicuerpos son otra tecnología de fragmentos de anticuerpo, sin embargo, esta se basa en la eliminación de la región de bisagra de los anticuerpos IgG4. La delección de la región de bisagra da como resultado una molécula que es esencialmente de la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales y tiene una región de unión univalente en lugar de la región de unión bivalente de los anticuerpos IgG4. También es bien sabido que los anticuerpos IgG4 son inertes y, por lo tanto, no interaccionan con el sistema inmunitario, lo que puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades en donde no se desea una respuesta inmunitaria, y esta ventaja se consigue con los unicuerpos. Por ejemplo, los unicuerpos pueden funcionar para inhibir o silenciar, pero no eliminar, las células a las que se unen. De manera adicional, la unión de los unicuerpos a células cancerosas no estimula su proliferación. Además, dado que los unicuerpos son aproximadamente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden presentar una mejor distribución sobre tumores sólidos más grandes con una eficacia potencialmente ventajosa. Los unicuerpos se eliminan del cuerpo a una tasa similar a la de los anticuerpos IgG4 completos y son capaces de unirse con una afinidad por sus antígenos similar a la de los anticuerpos completos. Los

detalles adicionales de los unicuerpos se pueden obtener con referencia a la solicitud de patente WO2007/059782.

## B. Inmunoconjugados

En otro aspecto, los métodos de la presente invención emplean agentes inmunoconjugados que se dirigen a BMP9 y que inhiben o regulan de manera negativa a la BMP9. Los agentes que se pueden dirigir a BMP9 incluyen, aunque  
5 sin limitación, agentes citotóxicos, agentes antiinflamatorios, por ejemplo, un agente inflamatorio esteroideo o no esteroideo, o antimetabolitos de citotoxina (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozaotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina)  
10 y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

El término "citotoxina" o "agente citotóxico" incluye cualquier agente que es perjudicial (por ejemplo, que lo elimina) para el tejido fibrótico. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina,  
15 dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los inmunoconjugados se pueden formar conjugando (por ejemplo, por enlace químico o por expresión recombinante) anticuerpos con agentes terapéuticos adecuados. Los agentes adecuados incluyen, por ejemplo, un agente citotóxico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) y/o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de la misma que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, las proteínas de Aleurites fordii, las proteínas de diantina, las proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, el inhibidor de sapaonaria officinalis, geloina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Hay una variedad de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re.  
20

Los inmunoconjugados se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoi) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta y col., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante  
30 ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo (véase, por ejemplo, el documento WO94/11026).

## Ejemplos

### Ejemplo 1

La BMP9 y la BMP10 se identificaron como indicadores de fibrosis en una prueba de selección de fenotipo y, por lo tanto, como posibles dianas terapéuticas capaces del tratamiento de trastornos fibróticos. El experimento se realizó en un formato de placa de 384 pocillos y por triplicado. En resumen, se realizó una transfección inversa en células Hek293 de aproximadamente 1500 clones de expresión de ADNc humano que codifican proteínas secretadas predichas usando Eugene 6 (Roche) en una proporción de 4:1 (Eugene:ADN) en medio DMEM completo (Invitrogen). Las células Hek293 se lavaron 24 horas después de la transfección y se incubaron durante 48 horas  
45 adicionales para enriquecer las proteínas secretadas. Los medios acondicionados de las células Hek293 transfectadas se transfirieron a fibroblastos dérmicos primarios humanos en etapa 3 (Lonza) que se sincronizaron mediante inanición durante 24 horas en ausencia de suero. La diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos se apuntó 96 más tarde mediante inmunotinción para la presencia de alfa actina del músculo liso ( $\alpha$ AML [Sigma], un marcador conocido de la diferenciación de fibroblastos) usando la generación de imágenes de alto contenido (Figura 1). Se generaron imágenes de tres campos de visión usando un analizador In Cell (GE Healthcare) y la intensidad del píxel por núcleo se calculó como una medida de la diferenciación porcentual.  
50

Para confirmar la actividad de BMP9 y BMP10 sobre la diferenciación de los fibroblastos, se obtuvo la proteína BMP9 y BMP10 recombinante (R&D) y se usó para estimular el fibroblasto restante (Figura 2). En resumen, 40 ng/ml de proteína BMP9 recombinante activa y 1000 ng/ml de proteína BMP10 recombinante activa (R&D System) se diluyeron de manera seriada 2 veces y se usaron en un experimento de respuesta a 12 dosis usando fibroblastos  
55

dérmicos primarios humanos en etapa 3 que se sincronizaron mediante inanición durante 24 horas en ausencia de suero. La diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos se apuntó 96 más tarde mediante inmunotinción para la presencia de alfa actina del músculo liso usando la generación de imágenes de alto contenido. Se demostró que BMP9 y BMP 10 modularon de forma positiva la diferenciación de fibroblastos a una concentración eficaz (CE50) de aproximadamente 2 ng/ml y aproximadamente 125 ng/ml, respectivamente. Además, el tratamiento de fibroblastos con proteínas BMP9 o BMP10 recombinantes usadas a una dosis CE90 de 10 ng/ml y 250 ng/ml respectivamente durante 24-96 horas también llevó a la regulación positiva de los marcadores de fibrosis conocidos. En resumen, los fibroblastos dérmicos primarios humanos en etapa 3 que se sincronizó mediante inanición durante 24 horas en ausencia de suero se trataron después con BMP9, BMP10 o con 10 ng/ml de TGFb1. Los fibroblastos se recogieron en diversos momentos tras la estimulación (24-96 horas) y se prepararon los ARN (Qiagen) para su uso en ensayos de PCR cuantitativa. Se determinó la modulación de los marcadores fibróticos conocidos, incluyendo alfa actina de músculo liso, colágeno de tipo III y proteína oligomérica de la matriz del cartílago (POMC) mediante TGFb, BMP9 o BMP10 (Figuras 3-5). Tanto la BMP9 como la BMP10 demostraron inducir la actividad transcripcional de la alfa actina del músculo liso, del colágeno de tipo III, y de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago.

### 15 **Ejemplo 2**

Para evaluar adicionalmente el papel de BMP9 en la fibrosis, se estableció un ensayo de gen reportero (EGR). De manera específica, se generó una construcción reportera de BMP9 (ID-BRE) usando el elemento de respuesta a BMP (BRE) del promotor Id1 fusionado con el gen de la luciferasa de luciérnaga. El EGR de BMP9 se llevó a cabo sobre células HEK293 transfectadas de forma estable con ID-BRE. Las células HEK293 ID-BRE se cultivaron a  $5 \times 10^5$  células/35 mm-placa un día antes de la transfección. Se cotransfectaron 2,5 µg de construcciones de ADN de ALK1 constitutivamente activa y de GFP (10:1) en células HEK293 ID-BRE mediante Fugene 6 (Roche, 8 µl), siguiendo el protocolo del fabricante en el día 2. La eficacia de la transfección se midió mediante la visualización de la GFP. Las células transfectadas se cultivaron después en placas de 96 pocillos a  $1 \times 10^4$  células/pocillo en el día 3. La BMP9 se añadió a la placa de 96 pocillos a diferentes concentraciones con o sin un anticuerpo neutralizante de BMP9 o un receptor soluble, ALK1-Fc, en el día 4. Las células se recolectaron en el día 5 y la actividad de luciferasa se midió usando el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante.

Tal como se muestra en la Figura 6, tanto un anticuerpo neutralizante anti-BMP9 como un receptor soluble, ALK1-Fc, inhibieron la actividad BRE-luciferasa estimulada por BMP9.

### Ejemplo 3

30 Se realizó un ensayo de transdiferenciación epitelio-mesénquima (TEM) para evaluar si la BMP9 tiene algún efecto sobre la TEM en hepatocitos. De manera específica, se cultivaron las células Hep3B (ATCC) en DMEM-F12, complementado con FBS al 10 %, 10 U/ml de penicilina y 10 U/ml de estreptomycin, a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene CO<sub>2</sub> al 5 %. Se cultivaron  $2 \times 10^5$  células Hep3B en DMEM-F12 completo en cada pocillo de placas de 24 pocillos. El medio se sustituyó por medio bajo en suero (1 %) con o sin 10 ng/ml de BMP9 (R&D).

35 En un experimento, las células se fijaron 24 horas tras el tratamiento con o sin BMP9, se fijaron para el análisis de imágenes y se sometieron a tinción de inmunohistoquímica con E-cadherina y α-AML. Tal como se evidencia mediante los cambios morfológicos en la célula representados en la Figura 6, la BMP9 indujo la TEM, redujo la E-cadherina y aumentó la α-AML, en comparación con el control.

40 Para los análisis de PCR cuantitativa, las células se recolectaron 48 horas después del tratamiento con BMP9 y el ARN total se extrajo y se sometió a análisis de RT-PCR. La PCR se dejó correr en ABI7700HT. Tal como se muestra en las Figuras 8A-8D, la BMP9 indujo la expresión de cuatro marcadores de fibroblastos diferentes (es decir, αAML, Col la1, proteína específica de fibroblasto (FSP-1) y vimentina) de una manera dependiente de la dosis.

45 Las células también se trataron con BMP9 en ausencia o presencia de un anticuerpo anti-BMP9 o ALK1-Fc. 48 horas después del tratamiento, se extrajo el ARN total de la proteína específica de fibroblasto (FSP-1) y se sometió a análisis de PCR cuantitativa. Como se muestra en la Figura 9, tanto un anticuerpo monoclonal neutralizante de BMP9 como un receptor soluble (ALK1-Fc) inhibieron la expresión de FSP-1 inducida por BMP9.

### Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando nada más que la experimentación habitual, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento.

50

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo antagonista anti-BMP9 para su uso en un método para tratar o prevenir un trastorno fibrótico en un sujeto, en particular, un ser humano, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-BMP9.
- 5 2. El anticuerpo antagonista anti-BMP9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis vascular, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis musculoesquelética, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel, fibrosis ocular, glaucoma, esclerosis sistémica progresiva (ESP), enfermedad injerto contra huésped crónica, esclerodermia, enfermedad de Peyronie, estenosis uretral postcistoscopia, fibrosis retroperitoneal idiopática y farmacológicamente inducida, fibrosis del mediastino, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa y fibrosis neoplásica.
- 10 3. El anticuerpo antagonista anti-BMP9 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho anticuerpo se administra a dicho sujeto
- a) junto con un agente terapéutico adicional; y/o  
b) por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.
- 15 4. El anticuerpo antagonista anti-BMP9 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en
- a) un anticuerpo de murino, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico y un anticuerpo quimérico, o  
b) un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, afficuerpo y un anticuerpo de dominio.
- 20 5. El anticuerpo antagonista anti-BMP9 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel y fibrosis pulmonar.
6. El anticuerpo antagonista anti-BMP9 para su uso en un método de tratamiento o prevención de un trastorno fibrótico de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el trastorno fibrótico es fibrosis hepática.
- 25 7. Un método para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico que comprende: (i) poner en contacto una muestra de dicho sujeto con un reactivo capaz de detectar BMP9; y (ii) detectar BMP9, en donde un nivel elevado de BMP9 en relación con un control es un indicativo de que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno fibrótico.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente detectar un marcador de fibrosis adicional seleccionado del grupo que consiste en alfa actina de músculo liso, proteína oligomérica de la matriz del cartílago de colágeno de tipo III, colágeno tipo I, colágeno de tipo IV, proteína 1 específica de fibroblastos, fibronectina, serpinE1, periostina, IGFBP3, SPARC, CTGF, TGFb, Cyr61, BMP10 y fosfo smad 2/3.
9. El método de la reivindicación 7, en donde el reactivo es
- 35 a) un anticuerpo o un ácido nucleico; y/o  
b) está marcado de manera detectable, particularmente con un marcador seleccionado del grupo que consiste en un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato de metal o una enzima.
10. El método de la reivindicación 7, en donde la muestra comprende
- 40 a) células obtenidas del sujeto; o  
b) un líquido obtenido del sujeto, en particular, un líquido seleccionado del grupo que consiste en líquidos sanguíneos, linfa, líquido ginecológico, líquido cístico, líquido ocular, orina y líquidos recogidos mediante enjuague peritoneal.
11. El método de la reivindicación 7, en donde el nivel de BMP9 es (a) al menos 2 veces, (b) al menos 3 veces, mayor en comparación con el control.
- 45 12. Un método para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento para tratar un trastorno fibrótico en un sujeto, comprendiendo el método:

- 5 a) poner en contacto una primera muestra obtenida de dicho sujeto antes de administrar al menos una parte del régimen de tratamiento al sujeto con un reactivo capaz de detectar BMP9;  
b) poner en contacto una segunda muestra obtenida de dicho sujeto tras la administración de al menos una parte del régimen de tratamiento con un reactivo capaz de detectar BMP9; y  
c) comparar los niveles de BMP9 de la primera y segunda muestra,

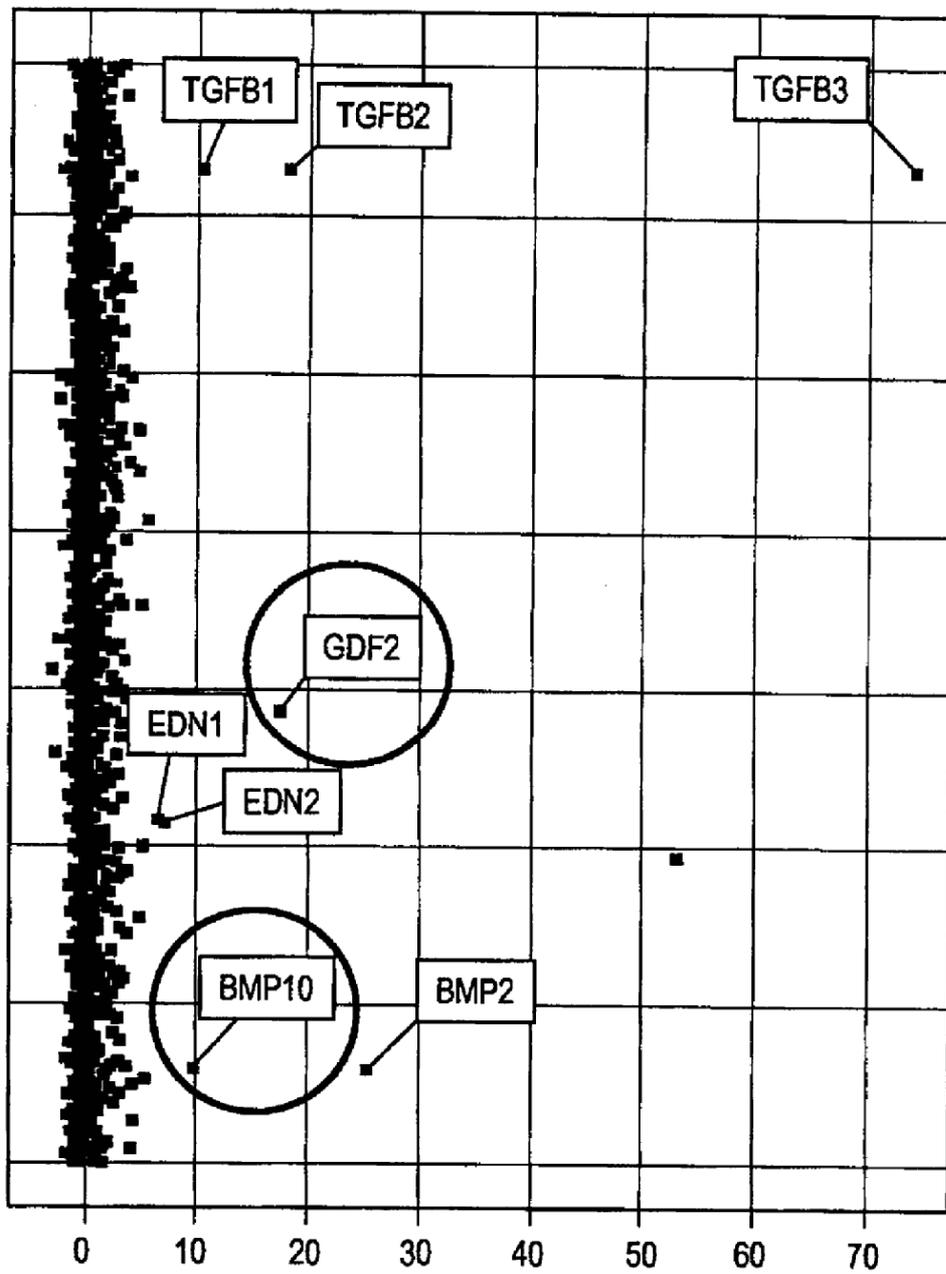
en donde un elevado nivel de BMP9 presente en la primera muestra, en relación con la segunda muestra, es un indicativo de que el régimen de tratamiento es eficaz para tratar un trastorno fibrótico en el sujeto.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el régimen de tratamiento comprende la administración de un anticuerpo anti-BMP9.

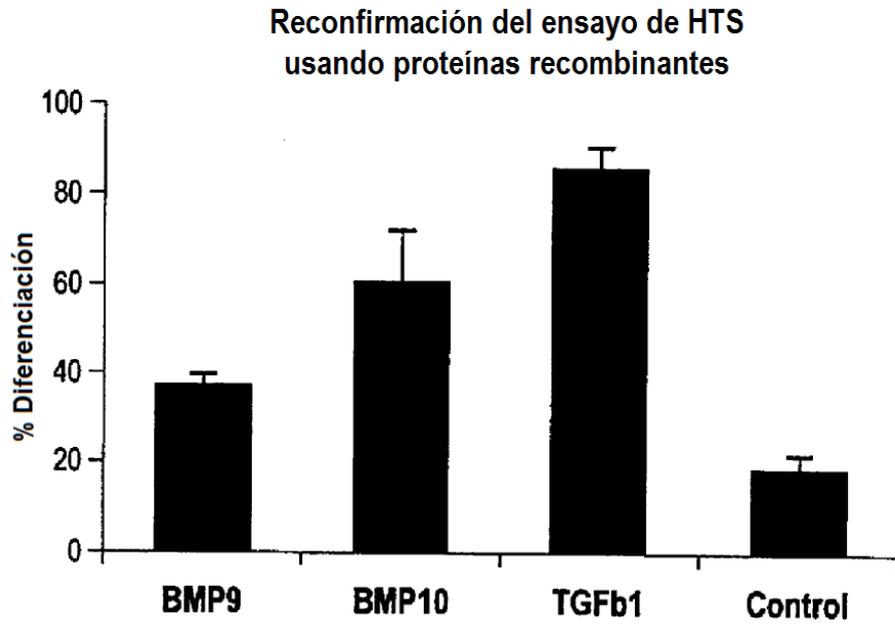
- 10 14. El método de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo anti-BMP9 se selecciona del grupo que consiste en  
a) un anticuerpo de murino, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico y un anticuerpo quimérico, o  
b) un Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, afficuerpo y un anticuerpo de dominio.

- 15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis vascular, fibrosis pulmonar, fibrosis pancreática, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis musculoesquelética, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel, fibrosis ocular, glaucoma, esclerosis sistémica progresiva (ESP), enfermedad injerto contra huésped crónica, esclerodermia, enfermedad de Peyronie, estenosis uretral postcistoscopia, fibrosis retroperitoneal idiopática y farmacológicamente inducida, fibrosis del mediastino, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa y fibrosis neoplásica.

20

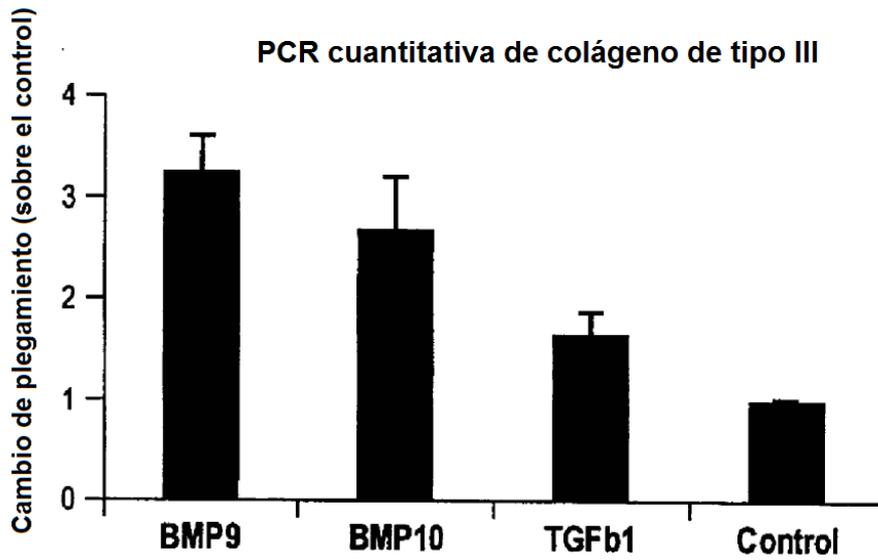


*Fig. 1*

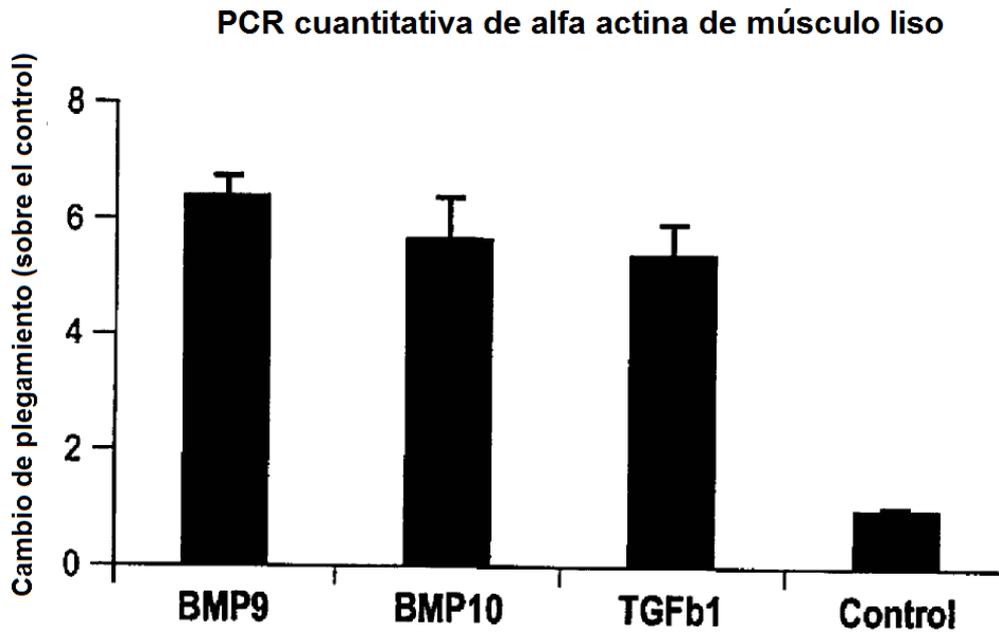


% Diferenciación

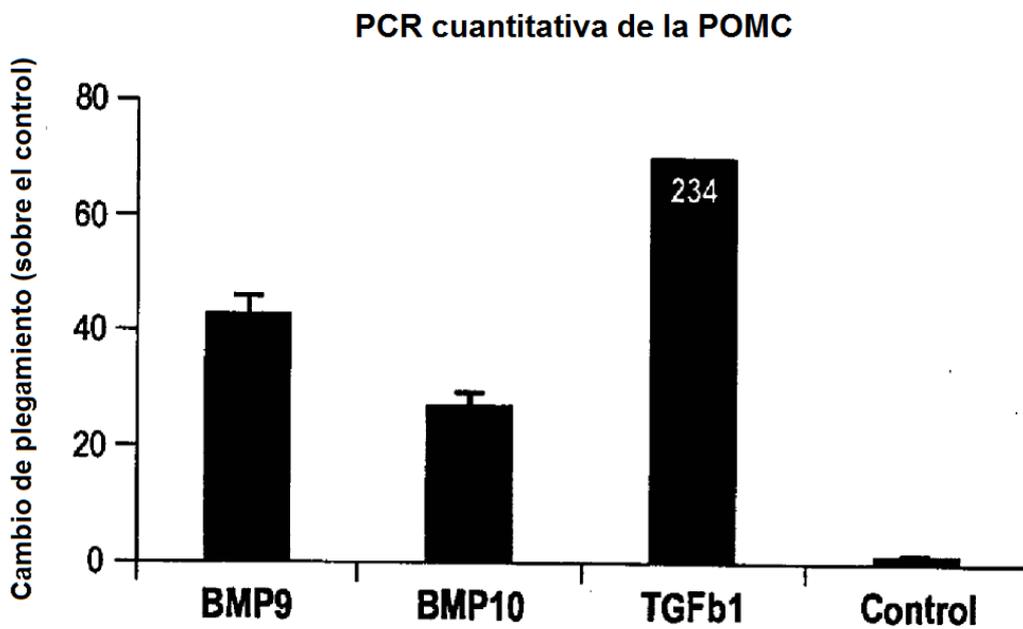
*Fig. 2*



*Fig. 3*



*Fig. 4*



*Fig. 5*

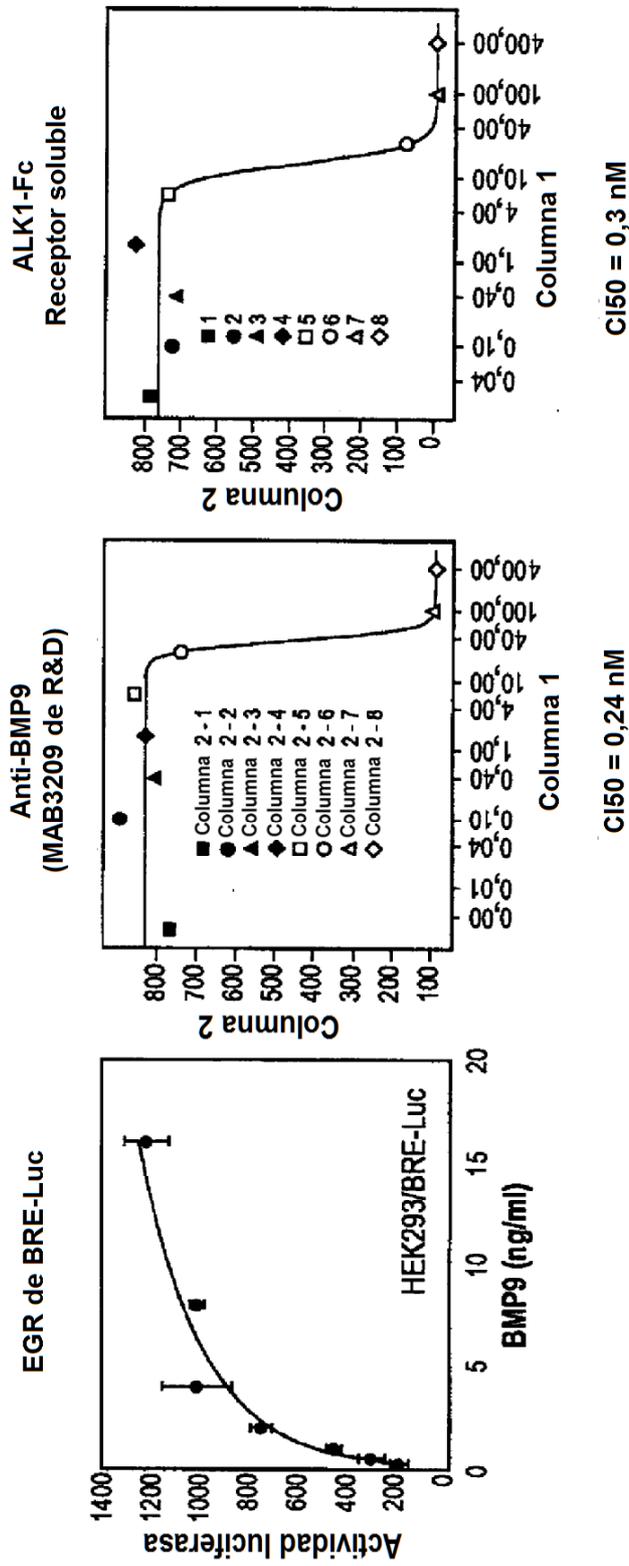
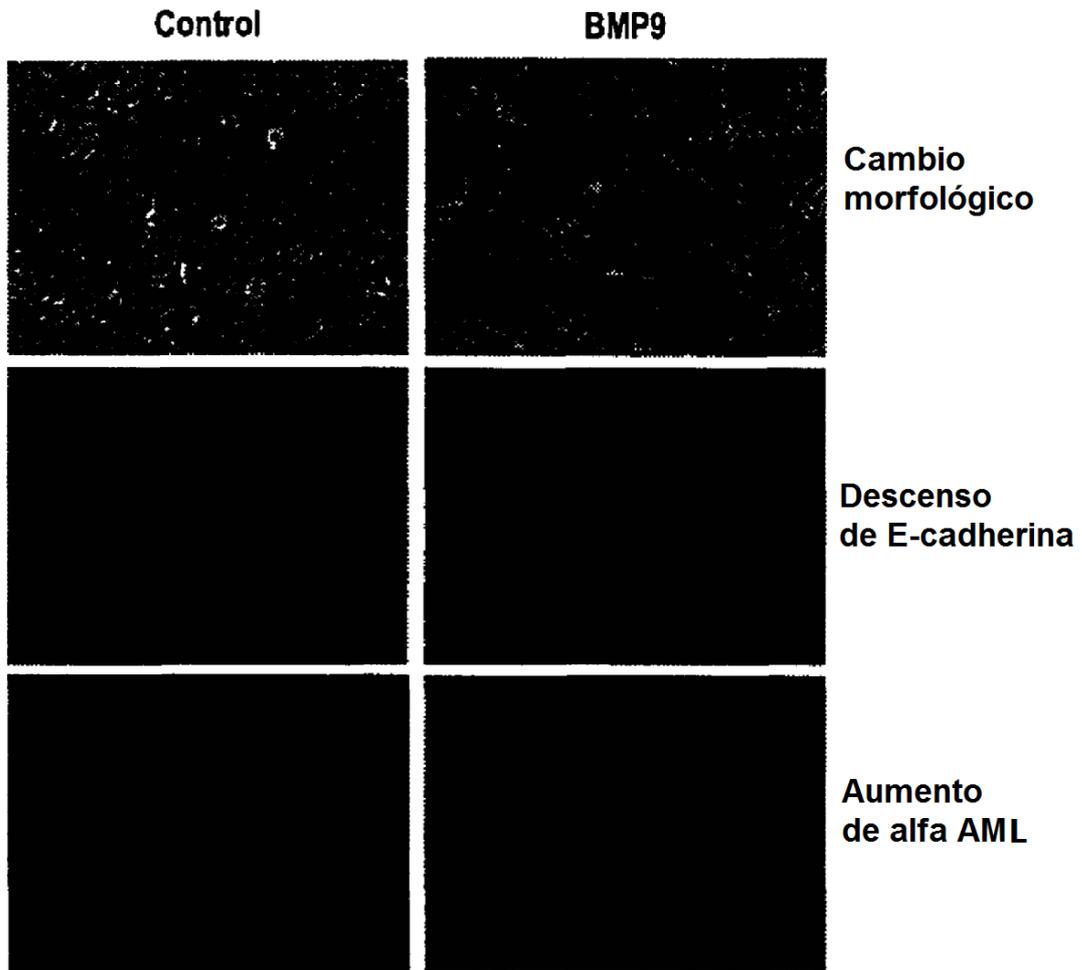
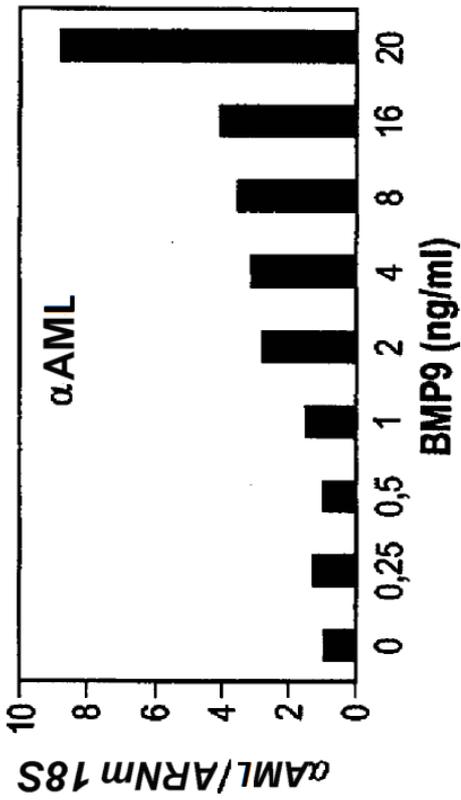


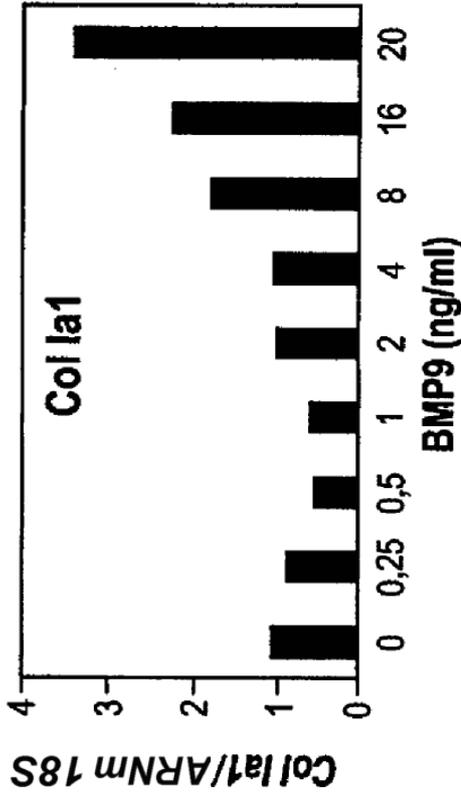
Fig. 6



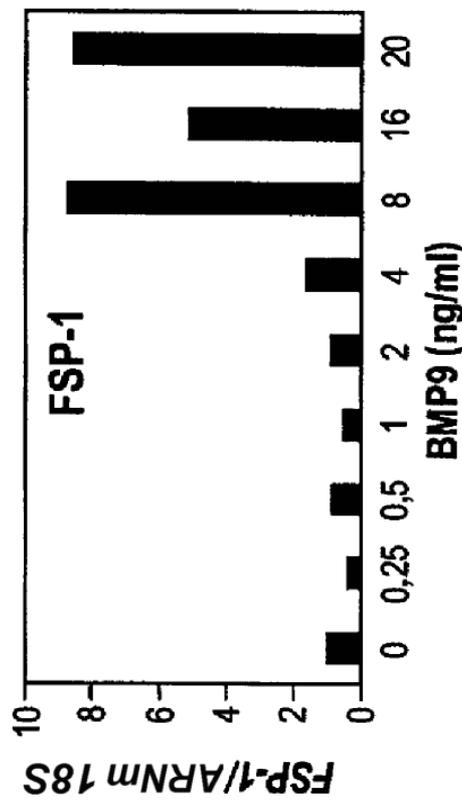
*Fig. 7*



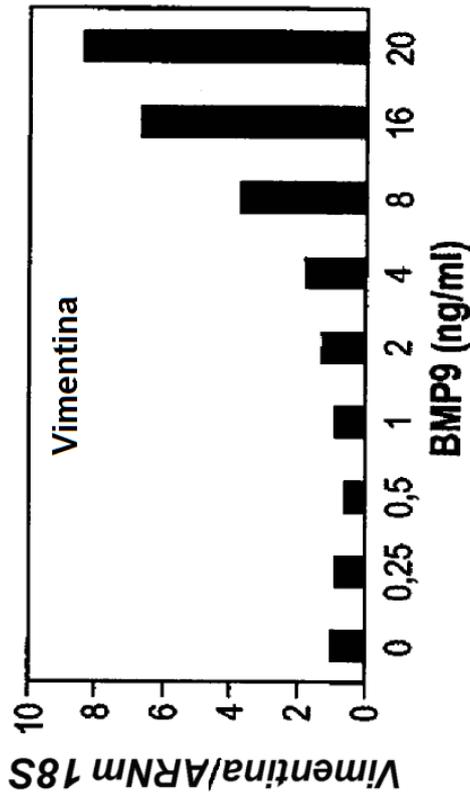
*Fig. 8A*



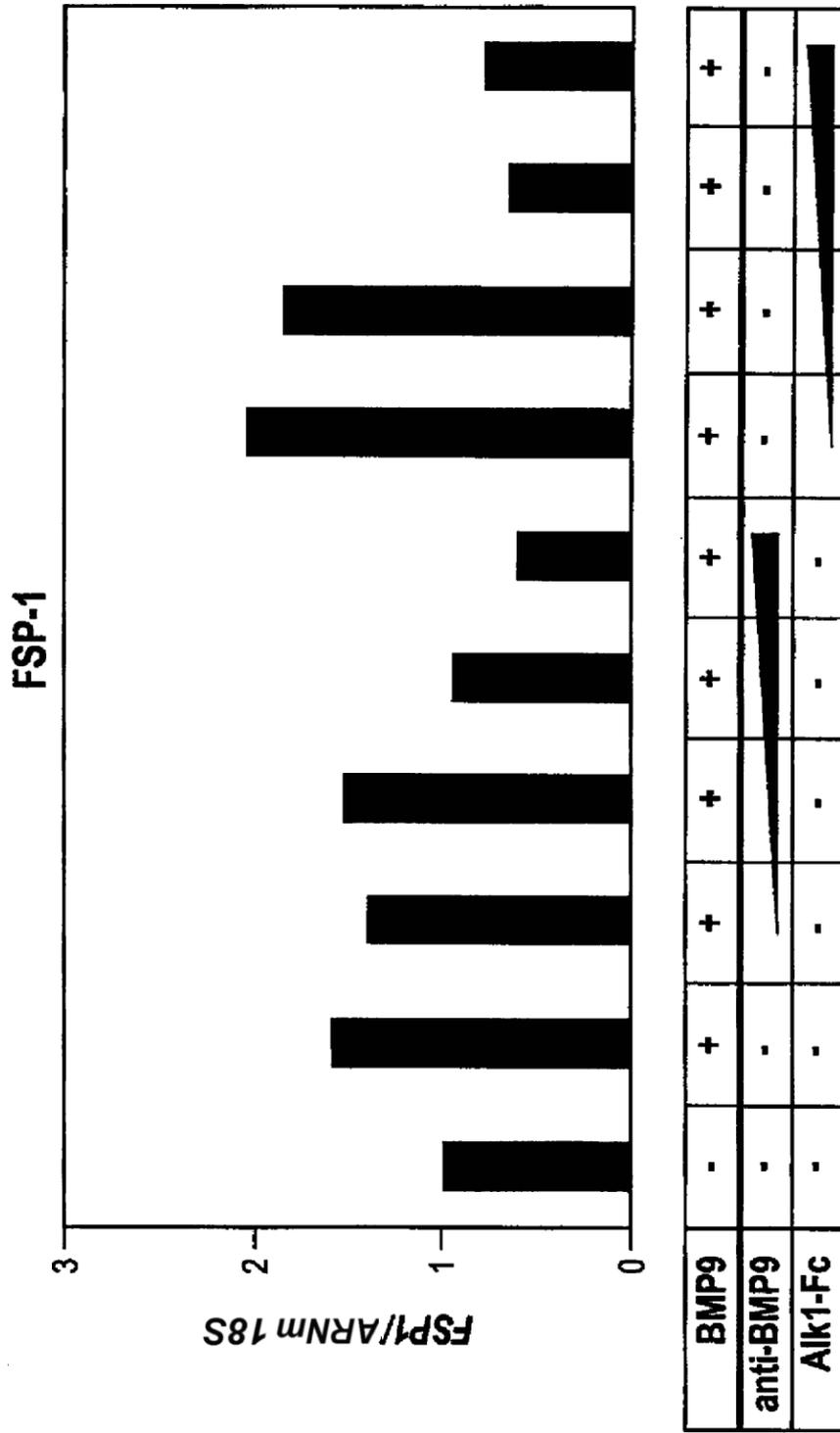
*Fig. 8B*



*Fig. 8C*



*Fig. 8D*



*Fig. 9*