

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 401**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/18</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/15</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/19</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/21</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)
<b>C12P 21/08</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2013 PCT/JP2013/067994**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14007198**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2013 E 13812775 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2868667**

54 Título: **Agente terapéutico para la anemia que incluye la anemia renal y la anemia inducida por cáncer que contiene anticuerpo anti-BMP9 como principio activo**

30 Prioridad:

**02.07.2012 US 201261666981 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.07.2019**

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)  
1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**SHIMIZU KIYOSHI;  
YAMAZAKI YUJI;  
KUBOTA TSUGUO y  
KIMURA KANAME**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 720 401 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

Agente terapéutico para la anemia que incluye la anemia renal y la anemia inducida por cáncer que contiene anticuerpo anti-BMP9 como principio activo.

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-BMP9 (proteína morfogenética ósea 9) o a un fragmento de anticuerpo del mismo que se une a BMP9 humana, a un hibridoma que produce el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, a un ADN que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, a un vector que contiene el ADN, a un transformante obtenido mediante introducción del vector, a un método para preparar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo utilizando el hibridoma o el transformante, y a un agente terapéutico que incluye el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo como principio activo.

10

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo como principio activo para el tratamiento de la anemia, tal como anemia renal, anemia de cáncer o similares, y a un método para tratar la anemia, tal como anemia renal, anemia de cáncer o similares utilizando la composición.

15

**Técnica anterior**

20

BMP9 es una abreviatura para proteína morfogenética ósea 9, y se denomina asimismo GDF2. La BMP9 pertenece a una molécula de la familia de BMP (proteína morfogenética ósea) compuesta por aproximadamente 20 miembros, y BMP9 humana es una proteína secretora compuesta por 429 aminoácidos (documento no de patente 1).

25

Es conocido que BMP9 se expresa principalmente en la médula espinal o en el septo en la fase fetal y en el hígado en la fase adulta (documentos no de patente 2, 3 y 4) y que BMP9 humana es un factor en circulación en la sangre presente en la sangre en una concentración de 2-12 ng/ml (documento no de patente 5).

30

Hasta el momento no ha habido ningún informe sobre las funciones *in vivo* de BMP9 basado en ratones deficientes para BMP9 o en administración de anticuerpo anti-BMP9 a animales, pero se han realizado unos pocos informes basados en hallazgos de estudios *in vitro*. Tal informe incluye, por ejemplo, una acción de fomento de la generación de condrocitos hipertróficos o diferenciación condrogénica a partir de células mesenquimales (documentos no de patente 6, 7 y 8), o una acción de fomento de la producción o formación de colonias de células progenitoras de la sangre (documento no de patente 9). Sin embargo, a partir de estos informes era muy difícil predecir que el anticuerpo anti-BMP9 tuviera acción eritropoyética *in vivo*.

35

Además, se ha comercializado un anticuerpo monoclonal que presenta una actividad neutralizante de BMP9 como anticuerpo monoclonal anti-BMP9 por R&D Systems (clon nº 360107), pero no se conoce ningún otro anticuerpo.

40

Anemia se refiere a "un estado en el que se presenta una reducción del número de eritrocitos, la concentración de hemoglobina y el valor de hematocrito por unidad de volumen de sangre, en comparación con el estado normal" (documento no de patente 10). Hay muchos factores implicados en el control de la eritropoyesis, pero la eritropoyetina es el factor más importante y específico (denominada a continuación en la presente memoria EPO).

45

La EPO fomenta la proliferación y diferenciación de unidades formadoras de colonias eritroides en estadio tardío (CFU-E) y, por consiguiente, aumenta la producción de eritrocitos *in vivo* (documento no de patente 10). EPO es una hormona de glicoproteína que está compuesta por 165 aminoácidos, presenta un peso molecular de 30 kDa y se produce principalmente en el riñón (documento no de patente 10).

50

La anemia acompañada por enfermedad renal (anemia renal) es la complicación más frecuente de la enfermedad renal crónica (CKD), caracterizada por que una producción de EPO reducida y un número de eritrocitos reducido resultan de la insuficiencia del tejido productor de EPO: el riñón (documento no de patente 11). Se sabe que la anemia renal afecta al desarrollo y a la progresión de enfermedad cardiovascular, a la progresión de disfunción renal, así como a la QOL (documentos no de patente 11 y 12).

55

Una eritropoyetina humana recombinante que es un agente terapéutico para anemia renal y un agente de EPO de segunda generación se ha desarrollado recientemente para presentar una semivida en sangre prolongada y se denomina generalmente ESA (agente estimulador de eritropoyesis) (documento no de patente 13).

60

El ESA presenta una fuerte acción eritropoyética. Sin embargo, en algunos casos, la administración de ESA no muestra un efecto de mejora de la anemia satisfactorio en el 15-20% de los pacientes sometidos a diálisis con insuficiencia renal (lo que se denomina anemia resistente a ESA o anemia hiposensible a ESA) (documento no

65

de patente 13).

Los resultados de ensayos de intervención a gran escala (estudios CREATE y CHOIR) muestran que la administración excesiva de ESA a pacientes con resistencia a ESA provoca un mal pronóstico vital (documentos no de patente 11, 12 y 13). Con estos antecedentes, un problema significativo para el tratamiento de anemia renal es superar la resistencia a ESA, y hay una fuerte demanda para desarrollar un nuevo agente estimulador de eritropoyesis que presente un mecanismo diferente de EPO.

Mientras tanto, la anemia acompañada por tumor maligno (anemia de cáncer) es un síntoma observado en muchos cánceres y provocado por dos factores: uno está asociado con la progresión de la enfermedad incluyendo pérdida de sangre y el otro está relacionado con quimioterapia o radioterapia (documento no de patente 14).

Es conocido que ESA es eficaz en la anemia de cáncer, pero se señala la preocupación de que haya una posibilidad de fomentar la progresión tumoral o infarto trombotico mediante tratamiento con ESA (documento no de patente 14). Por tanto, con respecto a la anemia de cáncer, también hay una demanda para desarrollar un nuevo agente estimulador de eritropoyesis que presente un mecanismo diferente de EPO.

Tal como se describió anteriormente, se requiere desarrollar un agente estimulador de eritropoyesis que presente un mecanismo diferente de EPO para el tratamiento de anemia renal y anemia de cáncer. Además, deben tenerse en cuenta la eficacia y concentración del fármaco. Específicamente, los criterios japoneses para comenzar la administración de ESA son que en el caso de pacientes sometidos a diálisis, la concentración de hemoglobina sea menor de 10 g/dl, y el fármaco debe ser eficaz para controlar la concentración de hemoglobina entre 10-11 g/dl; y que en caso de pacientes con enfermedad renal crónica previa a la diálisis, la concentración de hemoglobina sea menor de 11 g/dl para comenzar la administración de ESA, y el fármaco debe ser eficaz para controlar la concentración de hemoglobina entre 11-13 g/dl (documento no de patente 15).

El documento US2009/304691 da a conocer anticuerpos anti-BMP9.

Dicho de otro modo, se requiere que los nuevos agentes estimuladores de eritropoyesis presenten dos características: eficacia para aumentar la concentración de hemoglobina en por lo menos 1-2 g/dl e independencia de EPO.

### Listado de referencias

#### Bibliografía no de patente

- [Documento no de patente 1] J. Biol. Chem., 280, 26, 25111(2005)
- [Documento no de patente 2] Nat. Biotechnology, 21, 294(2003)
- [Documento no de patente 3] J. Biol. Chem., 275, 24, 17937(2000)
- [Documento no de patente 4] J. Physiology-Paris, 96, 53(2002)
- [Documento no de patente 5] Circ. Res., 102, 8, 914(2008)
- [Documento no de patente 6] Gene Ther., 11, 17, 1312(2004)
- [Documento no de patente 7] J. Biol. Chem., 284, 1, 649(2009)
- [Documento no de patente 8] J. Boneminer. Res., 26, 6, 1166(2011)
- [Documento no de patente 9] Growth Factors, 21, 2, 71(2003)
- [Documento no de patente 10] Standard hematology (IGAKU-SHOIN Ltd.)(2000)
- [Documento no de patente 11] Blood Frontier, 18, 2, 17(2008)
- [Documento no de patente 12] Kidney and Dialysis, 71, 2, 247(2011)
- [Documento no de patente 13] Clinical Dialysis, 26, 2, 59(2010)
- [Documento no de patente 14] Clinical Dialysis, 26, 2, 276(2010)
- [Documento no de patente 15] Journal of Japanese Society for Dialysis Therapy, 41, 10, 661(2008)

### Divulgación de la invención

#### Problemas que van a resolverse mediante la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico que incluya un anticuerpo anti-BMP9 como principio activo para la mejora de anemia, tal como anemia renal, anemia de cáncer o similares.

#### Medios para resolver los problemas

En el contexto de la presente invención se ha intentado adquirir el anticuerpo anti-BMP9 utilizando ratones deficientes para BMP9 con el fin de aclarar la función *in vivo* del anticuerpo anti-BMP9 y, finalmente, lograron adquirir el anticuerpo anti-BMP9 que presenta una capacidad de unión a BMP9 notablemente mejorada, en comparación con los anticuerpos convencionales.

Además, se han realizado muchos esfuerzos para demostrar la función *in vivo* del anticuerpo anti-BMP9 utilizando el anticuerpo obtenido. Sorprendentemente, se descubre que el anticuerpo anti-BMP9 presenta actividad eritropoyética, y además, su actividad eritropoyética es superior a las de los anticuerpos convencionales, y el anticuerpo inhibe la unión de BMP9 humana y BMPRII humano.

Además, los resultados de analizar el mecanismo de acción mostraron que la actividad eritropoyética del anticuerpo obtenido no está mediada por un aumento de la concentración de EPO en sangre, es decir, se atribuye a un mecanismo diferente del de EPO. También se examinó la actividad de anticuerpo anti-BMP9 utilizando como modelo de anemia renal una rata con 5/6 de nefrectomía, y el resultado mostró que presenta un efecto de mejora de la anemia renal.

Basándose en estos hallazgos, en el contexto de la presente invención se ha considerado proporcionar un agente terapéutico que incluye el anticuerpo anti-BMP9 como principio activo para el tratamiento de anemia, tal como anemia renal, anemia de cáncer o similares, completando así la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a los siguientes (1) a (13).

(1) Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo, que es un anticuerpo seleccionado de los siguientes (a) y (b):

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 49, y comprende una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 52 y

(b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 128, y comprende una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 132.

(2) Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo descrito en el punto (1), en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo es un anticuerpo recombinante.

(3) Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo descrito en el punto (2), en el que el anticuerpo recombinante se selecciona de un anticuerpo quimérico humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.

(4) Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) a (3), que es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 128, y comprende una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 132.

(5) Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) a (4), en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo se une por lo menos a Lys en la posición 87, Asp en la posición 89, Met en la posición 90, y Pro en la posición 93 en la secuencia de aminoácidos de la región madura de BMP9 humana representada por SEC ID n°: 67.

(6) Fragmento de anticuerpo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) o (6), en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), una región V dimerizada (diacuerpo) y una región V estabilizada por disulfuro (dsFv).

(7) ADN que codifica para el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) a (6).

(8) Vector recombinante que comprende el ADN descrito en el punto (7).

(9) Transformante obtenido introduciendo el vector recombinante descrito en el punto (8) en una célula hospedadora.

(10) Método para preparar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) a (6), que comprende cultivar el transformante descrito en el punto (9) en un medio para formar y acumular el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) o (6) en el caldo de cultivo, y recoger el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo del caldo de cultivo.

(11) Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) a (6) para su utilización en el tratamiento de enfermedades tales como anemia.

5 (12) Método para detectar o medir de manera inmunológica BMP9 humana utilizando el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) a (6), en el que el método no es un método de diagnóstico puesto en práctica en el cuerpo humano o animal.

10 (13) Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo descrito en uno cualquiera de los puntos (1) a (6) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

### Efecto de la invención

15 El anticuerpo de la presente invención es el anticuerpo anti-BMP9 que presenta una capacidad de unión a BMP9 notablemente mejorada, en comparación con los anticuerpos convencionales, presenta una actividad eritropoyética más excelente que los anticuerpos convencionales e inhibe la unión de BMP9 humana y BMPRII humano. Además, la actividad eritropoyética del anticuerpo de la presente invención no está mediada mediante un aumento de la concentración de EPO en sangre. Además, el anticuerpo de la presente invención presenta un efecto de mejora de la anemia renal. El anticuerpo de la presente invención que presenta estas características se ofrece como principio activo, proporcionando así un agente terapéutico para anemia, tal como anemia renal, anemia de cáncer o similares.

### Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 representa la estructura de un vector para desactivación de gen de BMP9 de ratón, en el que el genoma en 5' de ratón es la región de homología en 5' del vector para desactivación del gen de BMP9, Neo<sup>r</sup> es un gen de resistencia a neomicina, genoma en 3' de ratón es la región de homología en 3' del vector para desactivación del gen de BMP9, DT-A es un gen de cadena A de toxina diftérica, T3 es un promotor de T3, T7 es un promotor de T7 y pBluescript es un vector de clonación.

30 La figura 2 representa los resultados del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para medir la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido a BMP9 humana, en la que el eje vertical representa la absorbancia (450-570 nm), y si el antígeno en fase sólida es BMP9 humana, se representa en negro, y si el antígeno en fase sólida es BMP10 humana, se representa en blanco.

35 La figura 3 representa los resultados del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para medir la propiedad de unión del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido a BMP9 humana, en la que el eje horizontal representa la concentración de anticuerpo (ng/ml), el eje vertical representa la absorbancia (450-570 nm) a cada concentración de anticuerpo, el anticuerpo 6D10-1-1 se representa mediante  $\Delta$ , el anticuerpo 10D5-2-3 se representa mediante  $\square$ , el anticuerpo 3B7-3-3 se representa mediante  $\blacksquare$  y el anticuerpo de R&D se representa mediante  $\bullet$ .

45 La figura 4 representa el efecto inhibitor del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido sobre la unión de BMP9 humana y anticuerpo de R&D marcado, en la que el eje horizontal representa la concentración (ng/ml) de anticuerpo no marcado, el eje vertical representa la actividad inhibitora (%), el anticuerpo 6D10-1-1 se representa mediante  $\Delta$ , el anticuerpo 10D5-2-3 se representa mediante  $\square$ , el anticuerpo 3B7-3-3 se representa mediante  $\blacksquare$  y el anticuerpo de R&D se representa mediante  $\bullet$ .

50 La figura 5 representa el efecto inhibitor del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre la unión de BMP9 humana y BMPRII, en la que el eje vertical representa la actividad inhibitora (%).

55 La figura 6A representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre la eritropoyesis de ratón, mediante administración a corto plazo (durante 2 semanas), y el gráfico de la figura 6A representa cambios en el número de eritrocitos, en el que el eje horizontal representa la dosis de administración de anticuerpo (mg/kg) y el eje vertical representa el número de eritrocitos ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ), el anticuerpo 6D10-1-1 se representa mediante  $\Delta$ , el anticuerpo 10D5-2-3 se representa mediante  $\square$  y el anticuerpo de R&D se representa mediante  $\bullet$ . En el dibujo, el valor de 0 mg/kg representa el del grupo tratado con vehículo, y la barra de error representa el error estándar de la media (EE, n=6).

60 La figura 6B representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre la eritropoyesis de ratón, mediante administración a corto plazo (durante 2 semanas), y el gráfico de la figura 6B representa cambios en la concentración de hemoglobina, en el que el eje horizontal representa la dosis de administración de anticuerpo (mg/kg) y el eje vertical representa la concentración de hemoglobina (g/dl), el anticuerpo 6D10-1-1 se representa mediante  $\Delta$ , el anticuerpo 10D5-2-3 se representa mediante  $\square$  y el anticuerpo de R&D se representa mediante  $\bullet$ . En el dibujo, el valor de 0 mg/kg representa el del grupo tratado con vehículo, y la barra de error representa el error estándar de la media (EE, n=6).

La figura 7A representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre la eritropoyesis de ratón, mediante administración a largo plazo (durante 2 meses), y el gráfico de la figura 7A representa cambios en el número de eritrocitos, en el que el eje vertical representa el número de eritrocitos ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ). En el dibujo, la barra de error representa el error estándar de la media (EE,  $n=8$ ). Se utiliza la prueba de la  $t$  de Student para someter a prueba una diferencia estadísticamente significativa en los valores medidos entre el grupo tratado con vehículo y diversos grupos tratados con anticuerpo. \*\* representa  $P < 0.01$ , y \*\*\* representa  $P < 0.001$ .

La figura 7B representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre la eritropoyesis de ratón, mediante administración a largo plazo (durante 2 meses), y el gráfico de la figura 7B representa cambios en la concentración de hemoglobina, en el que el eje vertical representa la concentración de hemoglobina (g/dl). En el dibujo, la barra de error representa el error estándar de la media (EE,  $n=8$ ). Se utiliza la prueba de la  $t$  de Student para someter a prueba una diferencia estadísticamente significativa en los valores medidos entre el grupo tratado con vehículo y diversos grupos tratados con anticuerpo. \*\* representa  $P < 0.01$ , y \*\*\* representa  $P < 0.001$ .

La figura 8 representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre la concentración de eritropoyetina (EPO) en sangre en ratones, mediante administración a largo plazo, en la que el eje vertical representa la concentración de EPO en ratón (pg/ml). En el dibujo, la barra de error representa el error estándar de la media (EE,  $n=8$ ).

La figura 9A representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre la eritropoyesis en rata, mediante administración a corto plazo (durante 2 semanas), y el gráfico de la figura 9A representa cambios en el número de eritrocitos, en el que el eje vertical representa el número de eritrocitos ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ). En el dibujo, la barra de error representa el error estándar de la media (EE,  $n=6$ ). Se utiliza la prueba de la  $t$  de Student para someter a prueba una diferencia estadísticamente significativa en los valores medidos entre el grupo tratado con vehículo y diversos grupos tratados con anticuerpo. \* representa  $P < 0.05$ , \*\* representa  $P < 0.01$ , y \*\*\* representa  $P < 0.001$ .

La figura 9B representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre la eritropoyesis en rata, mediante administración a corto plazo (durante 2 semanas), y el gráfico de la figura 9B representa cambios en la concentración de hemoglobina, en el que el eje vertical representa la concentración de hemoglobina (g/dl). En el dibujo, la barra de error representa el error estándar de la media (EE,  $n=6$ ). Se utiliza la prueba de la  $t$  de Student para someter a prueba una diferencia estadísticamente significativa en los valores medidos entre el grupo tratado con vehículo y diversos grupos tratados con anticuerpo. \* representa  $P < 0.05$ , \*\* representa  $P < 0.01$ , y \*\*\* representa  $P < 0.001$ .

La figura 10A representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre el modelo de rata de anemia renal, y el gráfico de la figura 10A representa cambios en el número de eritrocitos, en el que el eje horizontal representa el tiempo transcurrido (semana) tras la administración de anticuerpo y el eje vertical representa el número de eritrocitos ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ). El grupo de pseudooperación tratado con vehículo se representa mediante  $\circ$ , el grupo de 5/6 de nefrectomía tratado con vehículo se representa mediante  $\bullet$ , el grupo de 5/6 de nefrectomía tratado con anticuerpo 6D10-1-1 se representa mediante  $\Delta$  y el grupo de 5/6 de nefrectomía tratado con anticuerpo 10D5-2-3 se representa mediante  $\square$ . En el dibujo, el valor de 0 mg/kg representa el del grupo tratado con vehículo, y la barra de error representa el error estándar de la media (EE, grupo tratado con vehículo  $n=5$ , otros grupos  $n=8$ ).

La figura 10B representa el efecto del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido, sobre el modelo de rata de anemia renal, y el gráfico de la figura 10B representa cambios en la concentración de hemoglobina, en el que el eje horizontal representa el tiempo transcurrido (semana) tras la administración de anticuerpo y el eje vertical representa la concentración de hemoglobina (g/dl). El grupo de pseudooperación tratado con vehículo se representa mediante  $\circ$ , el grupo de 5/6 de nefrectomía tratado con vehículo se representa mediante  $\bullet$ , el grupo de 5/6 de nefrectomía tratado con anticuerpo 6D10-1-1 se representa mediante  $\Delta$ , y el grupo de 5/6 de nefrectomía tratado con anticuerpo 10D5-2-3 se representa mediante  $\square$ . En el dibujo, el valor de 0 mg/kg representa el del grupo tratado con vehículo, y la barra de error representa el error estándar de la media (EE, grupo tratado con vehículo  $n=5$ , otros grupos  $n=8$ ).

La figura 11A representa el efecto del complejo del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido y BMP9 humana, sobre la señalización de ALK1 humana dependiente de BMP10 humana, y el gráfico de la figura 11A representa el resultado del complejo de anticuerpo 6D10-1-1 y BMP9 humana, en el que el eje horizontal representa la concentración de BMP10 humana y el eje vertical representa la unidad de luciferasa relativa. El grupo de una única adición de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 (3  $\mu\text{g/ml}$ ) se representa mediante  $\blacksquare$ , el grupo de adición del complejo de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 (3  $\mu\text{g/ml}$ ) y BMP9 humana 2 ng/ml se representa mediante  $\Delta$  y el grupo de adición del complejo de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 (3  $\mu\text{g/ml}$ ) y BMP9 humana 10 ng/ml se representa mediante  $\circ$ .

La figura 11B representa el efecto del complejo del anticuerpo monoclonal anti-BMP9 obtenido y BMP9 humana, sobre la señalización de ALK1 humana dependiente de BMP10 humana, y el gráfico de la figura 11B representa el resultado del complejo de anticuerpo 10D5-2-3 y BMP9 humana, en el que el eje horizontal representa la concentración de BMP10 humana y el eje vertical representa la unidad de luciferasa relativa. El grupo de una única adición de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 (3 µg/ml) se representa mediante ■, el grupo de adición del complejo de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 (3 µg/ml) y BMP9 humana 2 ng/ml se representa mediante Δ, y el grupo de adición del complejo de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 (3 µg/ml) y BMP9 humana 10 ng/ml se representa mediante ○.

La figura 12 representa la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3 generado.

La figura 13 representa la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3 generado.

### Formas de realización para poner en práctica la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a BMP9 humana.

En la presente divulgación, el anticuerpo que compite con un anticuerpo por la unión a BMP9 humana se refiere a un anticuerpo que presenta un epítipo (también denominado determinante antigénico) en BMP9 humana, que es idéntico o parcialmente idéntico al epítipo del anticuerpo de la presente invención, y una actividad de unión al epítipo.

El anticuerpo que se une a un epítipo idéntico al epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une a una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos de BMP9 humana reconocida por el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

La BMP9 humana se sintetiza como proteína precursora de cadena sencilla (pre-pro-proteína), que presenta una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66. Esta pre-pro-proteína de cadena sencilla forma un dímero (dímero pro), resultante de la escisión de un péptido señal que comprende de 1 a 22 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66 en el aparato de Golgi y de la formación de un enlace disulfuro entre residuos de cisteína en la posición 392.

Mediante proteasa de tipo furina, se produce la escisión entre los residuos de aminoácido 319 y 320 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66, y por tanto la proteína se divide en el fragmento de propéptido N-terminal que no presenta ningún enlace disulfuro (péptido que contiene los aminoácidos 23 a 319 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66) y el fragmento C-terminal (región madura) que presenta una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 67.

La región madura forma un dímero (denominado a continuación en la presente memoria dímero maduro) mediante un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en la posición 73 de SEC ID n°: 67, tras la escisión de la región de propéptido. Las dos moléculas de la región de propéptido N-terminal escindida se unen con una molécula del dímero maduro mediante un enlace no covalente para formar un complejo, que se secreta a partir de las células [J. Biol. Chem., 280 (26), 25111 (2005)]. Tanto el dímero maduro como el complejo del dímero maduro y la región de propéptido N-terminal presentan la función de BMP9.

Por tanto, BMP9 humana incluye un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de 320 a 429 (SEC ID n°: 67) correspondiente a la región madura en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66 o n° de registro de GenBank NP\_057288 y presenta la función de BMP9 humana, un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que presenta una eliminación, sustitución o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de 320 a 429 (SEC ID n°: 67) correspondiente a la región madura y presenta la función de BMP9 humana, y un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que presenta el 60% o más de homología, preferentemente el 80% o más de homología, y más preferentemente el 90% o más de homología con respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 67, y lo más preferentemente un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que presenta el 95% o más de homología con respecto a la misma y presenta la función de BMP9 humana, el dímero maduro descrito anteriormente, y el complejo del dímero maduro y la región de propéptido N-terminal.

La función de BMP9 descrita anteriormente se refiere a la implicación de BMP9 en la transducción de señales intracelulares. En la transducción de señales intracelulares, BMP9 se une a dos receptores tipo I y tipo II que pertenecen a la superfamilia de TGFβ para activar estos receptores, seguido de la fosforilación de Smad1/5/8. La Smad1/5/8 activada, activada mediante fosforilación, forma un complejo con Smad4, que se transloca al núcleo y funciona como factor de transcripción.

El receptor tipo I puede mostrarse a título de ejemplo por ALK1 y ALK2. Además, el receptor tipo II puede mostrarse a título de ejemplo por receptor tipo II de BMP (BMPRII), receptor tipo IIa de activina (ActRIIa) y receptor tipo IIb de activina (ActRIIb).

5 El polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos con una eliminación, sustitución o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 67 puede obtenerse mediante mutación específica de sitio [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997), Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] o similares. Por ejemplo, puede introducirse una mutación específica de sitio en el gen que codifica para el polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 67.

15 El número de aminoácidos que se eliminan, sustituyen o añaden no está particularmente limitado, pero es preferentemente de uno a varias decenas de aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 20 aminoácidos, más preferentemente de uno a varios aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 5 aminoácidos.

20 El gen que codifica para BMP9 humana puede presentar la secuencia de bases representada por SEC ID n°: 68 o n° de registro de GenBank NM\_016204. El gen que codifica para BMP9 humana incluye un gen que está compuesto por la secuencia de bases que presenta una eliminación, sustitución o adición de una o más bases en la secuencia de bases representada por SEC ID n°: 69 correspondiente a la región madura y contiene ADN que codifica para el polipéptido que presenta la función de BMP9 humana, un gen que está compuesto por la secuencia de bases que presenta el 60% o más de homología, preferentemente el 80% o más de homología, y más preferentemente el 95% o más de homología con respecto a la secuencia de bases representada por SEC ID n°: 69 y contiene ADN que codifica para el polipéptido que presenta la función de BMP9 humana, y un gen que está compuesto por ADN que puede hibridarse con ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID n°: 69 en condiciones rigurosas y contiene ADN que codifica para el polipéptido que presenta la función de BMP9 humana, o similares.

30 El ADN que puede hibridarse en condiciones rigurosas significa un ADN que puede hibridarse que se obtiene mediante hibridación de colonias, hibridación de placas de lisis, hibridación por transferencia de tipo Southern, o micromatriz de ADN utilizando ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID n°: 69 como sonda.

35 En detalle, el ADN puede ser ADN que puede identificarse realizando hibridación [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997), ADN Cloning 1: Coretechniques, A Practical Approach, segunda edición, Oxford University (1995)] a 65°C en presencia de 0.7 a 1.0 mol/l de cloruro de sodio utilizando un filtro o un portaobjetos de vidrio con el ADN derivado de colonias o de placas de lisis hibridado, productos de PCR o ADN oligomérico que presenta la secuencia inmovilizada en el mismo, y después lavando el filtro o portaobjetos de vidrio a 65°C con una concentración de 0.1 a 2 veces de disolución de SSC (concentración de 1 vez de disolución de SSC que consiste en cloruro de sodio 150 mmol/l y citrato de sodio 15 mmol/l).

45 El ADN que puede hibridarse puede incluir ADN que presenta por lo menos el 60% o más de homología, preferentemente ADN que presenta el 80% o más de homología, y más preferentemente ADN que presenta el 95% o más de homología con respecto a la secuencia de bases representada por SEC ID n°: 69.

50 En la secuencia de bases del gen que codifica para una proteína de un eucariota, con frecuencia se observa polimorfismo genético. El gen que codifica para BMP9 también incluye un gen en el que se genera una pequeña modificación en la secuencia de bases mediante tal polimorfismo.

55 El valor numérico de la homología en la presente divulgación puede ser un valor numérico calculado utilizando un programa de búsqueda de homología conocido por los expertos en la materia, a menos que se indique lo contrario. Con respecto a la secuencia de bases, el valor numérico puede calcularse utilizando un parámetro por defecto en BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] o similares, y con respecto a la secuencia de aminoácidos, el valor numérico puede calcularse utilizando un parámetro por defecto en BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997), Genome Res., 7, 649 (1997), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information.html>] o similares.

60 Como parámetro por defecto, G (coste de apertura de hueco) es 5 para la secuencia de bases y 11 para la secuencia de aminoácidos; -E (coste de extensión de hueco) es 2 para la secuencia de bases y 1 para la secuencia de aminoácidos; -q (penalización por coincidencia errónea de nucleótido) es -3; -r (recompensa por coincidencia de nucleótido) es 1; -e (valor esperado) es 10; -W (tamaño de palabra) es 11 residuos para la secuencia de bases y 3 residuos para la secuencia de aminoácidos; -y (caída (X) para extensiones de blast en bits) es 20 para blastn y 7 para un programa distinto de blastn; -X (valor de caída de X para alineación con huecos en bits) es 15; y Z (valor de caída de X final para alineación con huecos en bits) es 50 para blastn y 25 para un programa distinto de blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>).

5 El polipéptido compuesto por una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66 o n° de registro de GenBank NP\_057288 puede prepararse según un método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede prepararse eliminando una parte de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66 y cultivando un transformante en el que se introduce un vector de expresión que incluye el ADN.

10 Además, basándose en el polipéptido o ADN así preparado mediante el método anterior, puede prepararse un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos se eliminan, sustituyen o añaden en una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66 o n° de registro de GenBank NP\_057288 de la misma manera que se describió anteriormente.

15 El polipéptido compuesto por una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66 o n° de registro de GenBank NP\_057288, o el polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos se eliminan, sustituyen o añaden en una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66 o n° de registro de GenBank NP\_057288 también puede producirse mediante un método de síntesis química, tal como el método de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), el método de t-butiloxicarbonilo (tBoc) o similares.

20 El anticuerpo monoclonal de la presente invención (denominado a continuación en la presente memoria anticuerpo de la presente invención) es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, seleccionado de los siguientes (a) y (b):

25 (a) un anticuerpo monoclonal y un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende VH de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 49, y comprende VL de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 52;

30 (b) un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende VH de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 128, y comprende VL de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 132.

35 El anticuerpo reconoce y se une a la secuencia de aminoácidos de BMP9 humana o a la estructura tridimensional de la misma, o presenta la propiedad de unirse a la secuencia de aminoácidos de BMP9 humana o a la estructura tridimensional de la misma, inhibir la unión de BMP9 y BMPRII, y no inhibir la unión de BMP9 y ALK1. El anticuerpo de la presente invención puede incluir un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo del mismo que se une a BMP9 humana y presenta una constante de disociación de  $1 \times 10^{-10}$  mol/l o menos para BMP9 humana.

40 El anticuerpo puede ser, específicamente, un anticuerpo que se une por lo menos a Val en la posición 84, Leu en la posición 95, Tyr en la posición 97, y His en la posición 98, o un anticuerpo que se une por lo menos a Lys en la posición 87, Asp en la posición 89, Met en la posición 90, y Pro en la posición 93, y más preferentemente, un anticuerpo que se une por lo menos a Lys en la posición 87, Asp en la posición 89, Met en la posición 90, y Pro en la posición 93, en la secuencia de aminoácidos de la región madura de BMP9 humana representada por SEC ID n°: 67.

45 Los ejemplos de la secuencia de aminoácidos de BMP9 humana pueden incluir los que contienen dos de la secuencia de aminoácidos de la región madura de BMP9 humana representada por SEC ID n°: 67 y que presentan un enlace disulfuro entre residuos de cisteína en la posición 73.

50 La estructura tridimensional de BMP9 humana puede ser cualquier estructura siempre que presente una estructura equivalente a la estructura que existe de manera natural de BMP9 humana que contiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 66, n° de registro de GenBank NP\_057288 o SEC ID n°: 67. La estructura que existe de manera natural de BMP9 humana se refiere a la estructura tridimensional natural de BMP9 humana.

55 El BMPRII puede ser un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 27 a 150 correspondiente a la región extracelular en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 70 o n° de registro de GenBank NP\_001195.

60 El ALK1 puede ser un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las posiciones 22 a 118 correspondiente a la región extracelular en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 71 o n° de registro de GenBank AAH42637.

65 La constante de disociación (valor de Kd) del anticuerpo de la presente invención puede calcularse mediante un método cinético de un único ciclo (software BIAevaluation ver. 3, fabricado por GE Healthcare) a partir del sensograma obtenido utilizando un sistema Biacore (fabricado por GE Healthcare).

5 Específicamente, las CDR del anticuerpo y de los fragmentos de anticuerpo del mismo son CDR 1 a 3 de cadena H que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 60 a 62, respectivamente, y CDR 1 a 3 de cadena L que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 63 a 65, respectivamente.

10 Otros ejemplos de anticuerpos monoclonales de la presente divulgación incluyen el siguiente anticuerpo monoclonal y los fragmentos de anticuerpo del mismo: un anticuerpo monoclonal y un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región variable de cadena pesada (denominada a continuación en la presente memoria VH) de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 48, y comprende una región variable de cadena ligera (denominada a continuación en la presente memoria VL) de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 51.

15 Además, los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación incluyen anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo de los mismos que se unen a un epítipo idéntico al epítipo presente en BMP9 humana al que se unen los anticuerpos monoclonales anteriores.

20 La unión de un anticuerpo, o del fragmento de anticuerpo del mismo, a la secuencia de aminoácidos de BMP9 humana, o a la estructura tridimensional de la misma, puede detectarse mediante un método de detección inmunológico conocido de manera convencional para BMP9 humana, o tejidos que expresan BMP9 humana, tal como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando un antígeno en fase sólida, o un método para examinar un antígeno específico y la capacidad de unión de un anticuerpo al antígeno específico.

25 Los ejemplos del mismo pueden incluir resonancia de plasmón superficial utilizando un sistema Biacore (fabricado por GE Healthcare) o similares, y calorimetría de titulación isotérmica utilizando ITC (fabricado por DKSH) o similares.

30 La constante de disociación (valor de Kd) del anticuerpo frente al antígeno puede determinarse realizando un análisis de gráfica de Scatchard o un análisis según el documento adjunto de cada dispositivo, utilizando cualquier método de ELISA, resonancia de plasmón superficial y calorimetría de titulación isotérmica.

35 Además, los inmunoensayos conocidos [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Manual for monoclonal antibody experiments, Kodansha Scientific (1987)] pueden utilizarse en combinación para la detección.

El tejido que expresa BMP9 humana puede ser cualquier tejido siempre que exprese BMP9, y por ejemplo, sangre, hígado o similares.

40 El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser un anticuerpo producido mediante un hibridoma o un anticuerpo recombinante producido mediante un transformante que se transforma con un vector de expresión que contiene un gen del anticuerpo.

45 El anticuerpo monoclonal se caracteriza por que es un anticuerpo secretado por una célula productora de un único clon de anticuerpo y sólo reconoce un epítipo (también denominado determinante antigénico) y presenta una secuencia de aminoácidos uniforme (estructura primaria) que constituye el anticuerpo monoclonal.

50 Los ejemplos del epítipo incluyen una única secuencia de aminoácidos reconocida por, y a la que se une, el anticuerpo monoclonal, una estructura tridimensional compuesta por la secuencia de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos unida a una cadena de azúcar, una estructura tridimensional compuesta por la secuencia de aminoácidos unida a una cadena de azúcar, o similares.

55 El anticuerpo monoclonal de la presente invención se une preferentemente a la secuencia de aminoácidos de BMP9 humana.

El epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de la presente invención está preferentemente incluido en la secuencia de aminoácidos de BMP9 humana.

60 El hibridoma puede obtenerse, por ejemplo, preparando la BMP9 humana anteriormente descrita como antígeno, induciendo células productoras de anticuerpo con la especificidad de antígeno, en un animal inmunizado con el antígeno, y realizando la fusión de las células productoras de anticuerpo con células de mieloma. Este hibridoma se cultiva o se inyecta en un animal para desarrollar cancerización del líquido ascítico, y el caldo de cultivo o líquido ascítico se cultiva y se purifica, obteniendo así un anticuerpo monoclonal anti-BMP9.

65 El animal inmunizado con el antígeno puede ser uno cualquiera siempre que pueda utilizarse para la generación del hibridoma, y preferentemente ratón, rata, hámster, pollo, conejo o similares. Además, los anticuerpos

producidos a partir del hibridoma que se prepara obteniendo células que presentan una capacidad de producción de anticuerpo a partir de los animales, realizando inmunización de estas células *in vitro*, y después realizando la fusión de las células con células de mieloma, también se incluyen en el anticuerpo de la presente invención.

5 El anticuerpo recombinante de la presente invención incluye anticuerpos generados mediante recombinación, tales como un anticuerpo quimérico humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un fragmento de anticuerpo de los mismos o similares. El anticuerpo recombinante que presenta las propiedades de anticuerpo monoclonal, baja antigenicidad y semivida en sangre prolongada, se prefiere como agente terapéutico. El ejemplo del anticuerpo recombinante puede incluir los generados modificando el anticuerpo monoclonal de la presente invención, utilizando una técnica de recombinación.

10 El anticuerpo quimérico humano se refiere a un anticuerpo que consiste en VH y VL de un anticuerpo de animal no humano, una región constante de cadena pesada (denominada a continuación en la presente memoria CH) y una región constante de cadena ligera (denominada a continuación en la presente memoria CL) de un anticuerpo humano. El anticuerpo quimérico humano de la presente invención se prepara obteniendo ADNc que codifica para VH y VL, a partir del hibridoma descrito anteriormente, insertando el ADNc en cada uno de los vectores de expresión para células de animal que presentan genes que codifican para CH y CL de un anticuerpo humano, para construir un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano e introducir este vector en células de animal para su expresión.

15 La CH del anticuerpo quimérico humano puede ser una cualquiera siempre que pertenezca a las inmunoglobulinas humanas (denominadas a continuación en la presente memoria hlg), preferentemente las que pertenecen a la clase hlgG, y también cualquiera de las subclases hlgG1, hlgG2, hlgG3 o hlgG4 que pertenecen a la clase hlgG. Además, la CL del anticuerpo quimérico humano puede ser una cualquiera siempre que pertenezca a hlg, y pueden utilizarse las que pertenecen a la clase  $\kappa$  o  $\lambda$ .

20 Un ejemplo específico del anticuerpo quimérico humano de la presente invención puede incluir un anticuerpo quimérico que comprende VH de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 49 y comprende VL de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 52.

25 El anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo que se genera injertando la secuencia de aminoácidos de CDR de VH y VL de un anticuerpo de animal no humano en la región apropiada de VH y VL de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado de la presente invención puede prepararse construyendo ADNc que codifica para la región variable (denominada a continuación en la presente memoria región V), obtenido injertando la secuencia de aminoácidos de CDR de VH y VL de un anticuerpo de animal no humano, que se produce a partir del hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de animal no humano que reconoce específicamente BMP9 humana y se une a la secuencia de aminoácidos de BMP9 humana, o a la estructura tridimensional de la misma, en el entramado (denominado a continuación en la presente memoria FR) de VH y VL de cualquier anticuerpo humano, insertando el ADNc en cada uno de los vectores de expresión para células de animal que presentan genes que codifican para CH y CL de un anticuerpo humano para construir un vector de expresión de anticuerpo humano con injerto de CDR, e introduciendo este vector en células de animal para su expresión.

35 La CH del anticuerpo humano con injerto de CDR puede ser una cualquiera siempre que pertenezca a hlg, preferentemente las que pertenecen a la clase hlgG, y también cualquiera de las subclases hlgG1, hlgG2, hlgG3 o hlgG4 que pertenecen a la clase hlgG. Además, CL del anticuerpo humano con injerto de CDR puede ser una cualquiera siempre que pertenezca a hlg, y pueden utilizarse las que pertenecen a la clase  $\kappa$  o  $\lambda$ .

40 Un ejemplo específico del anticuerpo humano con injerto de CDR de la presente invención puede incluir un anticuerpo humanizado que comprende VH de un anticuerpo en el que CDR1 a 3 comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 60 a 62 y comprende VL de un anticuerpo en el que CDR1 a 3 comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 63 a 65, y que presenta las secuencias de entramado de VH y VL mostradas en SEC ID n°: 128 y 132, respectivamente.

45 Un anticuerpo humano significa un anticuerpo que existe de manera natural en el cuerpo humano, y también incluye un anticuerpo obtenido a partir de una biblioteca de fagos de anticuerpo humano o un animal transgénico productor de anticuerpo humano, que se prepara basándose en las recientes técnicas avanzadas en ingeniería genética, ingeniería celular e ingeniería de desarrollo.

50 El anticuerpo que existe de manera natural en el cuerpo humano puede prepararse, por ejemplo, aislando un linfocito humano de sangre periférica, inmortalizándolo mediante infección con virus EB o similares, y después clonándolo de modo que pueden cultivarse linfocitos que pueden producir el anticuerpo y puede purificarse el anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo.

55 La biblioteca de fagos de anticuerpo humano es una biblioteca en la que los fragmentos de anticuerpo, tales como Fab y scFv se expresan en la superficie de fagos insertando un gen que codifica para un anticuerpo

preparado a partir de una célula B humana en un gen de fago. Puede recuperarse de la biblioteca un fago que expresa un fragmento de anticuerpo en la superficie de fago que presenta la actividad de unión a antígeno deseada, utilizando su actividad para unirse a un sustrato con antígeno inmovilizado como índice. El fragmento de anticuerpo puede convertirse adicionalmente en una molécula de anticuerpo humano que consiste en dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

Un animal transgénico productor de anticuerpo humano significa un animal en el que se integra un gen de anticuerpo humano en las células. Específicamente, un animal transgénico productor de anticuerpo humano puede prepararse introduciendo un gen que codifica para un anticuerpo humano en una célula ES de ratón, injertando la célula ES en un embrión en fase temprana de otro ratón y después desarrollándolo para dar un animal completo. Un anticuerpo humano derivado a partir del animal no humano transgénico productor de anticuerpo humano puede prepararse obteniendo un hibridoma productor de anticuerpo humano mediante un método de preparación de hibridoma habitualmente llevado a cabo en animales no humanos, cultivando el hibridoma obtenido y produciendo y acumulando el anticuerpo humano en el sobrenadante del cultivo.

También se da a conocer un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo en el que uno o más aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan o añaden en la secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo o fragmento de anticuerpo anterior, que presenta actividad similar al anticuerpo o fragmento de anticuerpo anterior.

El número de residuos de aminoácido que se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden es de uno o más, y no está específicamente limitado, pero está dentro del intervalo en el que es posible la eliminación, sustitución o adición mediante métodos conocidos, tales como la mutagénesis dirigida al sitio [Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997); Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982); Gene, 34, 315 (1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] o similares. Por ejemplo, el número es de 1 a docenas, preferentemente de 1 a 20, más preferentemente de 1 a 10, y lo más preferentemente de 1 a 5.

Eliminar, sustituir, insertar y/o añadir uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anterior significa lo siguiente. Es decir, significa que hay una eliminación, sustitución, inserción o adición de uno o varios residuos de aminoácido en cualquier posición en una o varias secuencias de aminoácidos en una única secuencia. Además, la eliminación, sustitución, inserción o adición puede existir en el mismo caso y el aminoácido que se sustituye, inserta o añade puede ser o bien de tipo natural o bien de tipo no natural.

El aminoácido de tipo natural incluye L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, L-cisteína y similares.

A continuación se muestran ejemplos preferidos de aminoácidos que pueden sustituirse mutuamente. Los aminoácidos en el mismo grupo pueden sustituirse mutuamente.

Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, O-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina, ciclohexilalanina

Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido 2-aminosubérico

Grupo C: asparagina, glutamina

Grupo D: lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico

Grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina

Grupo F: serina, treonina, homoserina

Grupo G: fenilalanina, tirosina

El fragmento de anticuerpo de la presente invención incluye Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), una región V dimerizada (diacuerpo), una región V estabilizada por disulfuro (dsFv) y similares.

Un Fab es un fragmento de anticuerpo que presenta un peso molecular de aproximadamente 50,000 y actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre los fragmentos obtenidos tratando una molécula de anticuerpo de IgG con una proteasa, papaína (escindida en un residuo de aminoácido en la posición 224 de la cadena H), se unen entre sí mediante un enlace disulfuro.

El Fab de la presente invención puede obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal de la presente invención con papaína. Además, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica para Fab del anticuerpo en un vector de expresión para procarionta, o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo el vector en un procarionta o un eucariota para expresar el Fab.

Un  $F(ab')_2$  es un fragmento de anticuerpo que presenta un peso molecular de aproximadamente 100,000, que presenta actividad de unión a antígeno y que comprende dos regiones de Fab que están unidas en la porción de bisagra, obtenido digiriendo la parte inferior de enlaces disulfuro en la región de bisagra de IgG con una enzima, pepsina.

El  $F(ab')_2$  de la presente invención puede obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal de la presente invención con pepsina. Además, el  $F(ab')_2$  puede producirse uniendo el Fab' descrito a continuación mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

Un Fab' es un fragmento de anticuerpo que presenta un peso molecular de aproximadamente 50,000 y actividad de unión a antígeno, en el que se escinde un enlace disulfuro en la región de bisagra del  $F(ab')_2$  anterior. El Fab' de la presente invención puede obtenerse tratando el  $F(ab')_2$  de la presente invención con un agente reductor, tal como ditioneol. Además, el Fab' puede producirse insertando ADN que codifica para fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procarionta, o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo el vector en un procarionta o eucariota para expresar el Fab'.

Un scFv es un polipéptido de VH-P-VL o VL-P-VH en el que una VH y una VL están unidas utilizando un ligador peptídico apropiado (denominado a continuación en la presente memoria "P") y es un fragmento de anticuerpo que presenta actividad de unión a antígeno.

El scFv de la presente invención puede producirse obteniendo los ADNc que codifican para VH y VL del anticuerpo monoclonal, construyendo un ADN que codifica para el scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procarionta, o un vector de expresión para eucariota, y después introduciendo el vector de expresión en un procarionta o eucariota para expresar el scFv.

Un diacuerpo es un fragmento de anticuerpo en el que se dimeriza scFv, es un fragmento de anticuerpo que presenta actividad de unión a antígeno divalente. En la actividad de unión a antígeno divalente, dos antígenos pueden ser iguales o diferentes.

El diacuerpo de la presente invención puede producirse obteniendo los ADNc que codifican para VH y VL del anticuerpo monoclonal de la presente invención, construyendo ADN que codifica para scFv de modo que la longitud de la secuencia de aminoácidos del ligador peptídico es de 8 o menos residuos, insertando el ADN en un vector de expresión para procarionta, o un vector de expresión para eucariota, y después introduciendo el vector de expresión en un procarionta o eucariota para expresar el diacuerpo.

Un dsFv se obtiene uniendo polipéptidos en los que un residuo de aminoácido de cada de VH y VL se sustituye por un residuo de cisteína mediante un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína. El residuo de aminoácido que va a sustituirse por un residuo de cisteína puede seleccionarse basándose en una predicción de conformación del anticuerpo según un método conocido [Protein Engineering, 7, 697 (1994)].

El dsFv de la presente invención puede producirse obteniendo los ADNc que codifican para VH y VL del anticuerpo monoclonal de la presente invención, construyendo ADN que codifica para dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procarionta, o un vector de expresión para eucariota, y después introduciendo el vector de expresión en un procarionta o eucariota para expresar el dsFv.

Un péptido que comprende CDR se constituye incluyendo una o más regiones de CDR de VH o VL. Pueden conectarse péptidos que comprenden varias CDR directamente o mediante un ligador peptídico apropiado.

El péptido que comprende CDR puede producirse construyendo los ADN que codifican para CDR de VH y VL del anticuerpo monoclonal de la presente invención, insertando los ADN en un vector de expresión para procarionta, o un vector de expresión para eucariota, y después introduciendo el vector de expresión en un procarionta o eucariota para expresar el péptido. El péptido que comprende las CDR también puede producirse mediante un método de síntesis química, tal como método de Fmoc o método de tBoc.

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención incluye un derivado de anticuerpo en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo de la presente invención se une química o genéticamente a un radioisótopo, un agente de bajo peso molecular, un agente de alto peso molecular, una proteína o similares. Cuando se utiliza el derivado de anticuerpo como método para la detección, método para cuantificación, agente para detección o agente para cuantificación, un agente que se une al anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención incluye un marcador que se utiliza para un método habitual para

la detección o determinación inmunológica.

El derivado de anticuerpo de la presente invención puede producirse conjugando un radioisótopo, un agente de bajo peso molecular, un agente de alto peso molecular, una proteína o similares al lado N-terminal o lado C-terminal de una cadena H o una cadena L, sustituyente adecuado o cadena lateral, cadena de azúcar, y similares del anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo o la presente invención utilizando métodos químicos [Kotai Kogaku Nyumon, publicado por Chijin Shokan (1994)].

Además, el derivado de anticuerpo de la presente invención puede producirse genéticamente uniendo un ADN que codifica para el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo de la presente invención a otro ADN que codifica para una proteína que va a conjugarse, insertando el ADN en un vector de expresión e introduciendo el vector de expresión en una célula hospedadora apropiada.

Los radioisótopos incluyen  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{199}\text{Tc}$ ,  $^{77}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  y similares. El radioisótopo puede conjugarse directamente con el anticuerpo mediante el método de cloramina-T o similares. Además, una sustancia quelante con el radioisótopo puede conjugarse con el anticuerpo. El agente quelante incluye ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminapentaacético (MX-DTPA) y similares.

El agente de bajo peso molecular incluye, por ejemplo, una sustancia luminiscente, tal como éster de acridinio, compuesto de Rofin o similares, o una sustancia fluorescente, tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (RITC) o similares.

El método para conjugar el agente de bajo peso molecular con el anticuerpo incluye un método en el que el agente y un grupo amino del anticuerpo se conjugan mediante glutaraldehído, un método en el que un grupo amino del agente y un grupo carboxilo del anticuerpo se conjugan mediante carbodiimida soluble en agua, y similares.

Los agentes de alto peso molecular incluyen polietilenglicol (denominado a continuación en la presente memoria "PEG"), albúmina, dextrano, polioxietileno, copolímero de estireno-ácido maleico, polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, hidroxipropilmetacrilamida y similares. Uniendo estos compuestos de alto peso molecular al anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se esperan los siguientes efectos: (1) mejora de la estabilidad frente a diversos factores químicos, físicos o biológicos, (2) prolongación notable de la semivida en sangre, (3) depleción de la inmunogenicidad o supresión de la producción de anticuerpo, y similares [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten (1993)]. Los ejemplos de los métodos para conjugar PEG al anticuerpo incluyen un método para hacer reaccionar un anticuerpo con un reactivo de modificación con PEG [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten (1993)]. Los reactivos de modificación con PEG incluyen un agente de modificación para grupo  $\epsilon$ -amino de lisina (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 178926/86), un agente de modificación para un grupo carboxilo de ácido aspártico y ácido glutámico (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 23587/81), un agente de modificación para un grupo guanidino de arginina (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 117920/90) y similares.

La proteína incluye, por ejemplo, una enzima, tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa, luciferasa o similares.

Además, la presente invención se refiere al anticuerpo monoclonal o al fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención para su utilización en el tratamiento de enfermedades, tales como anemia.

Las enfermedades que acompañan a anemia implicada con BMP9 pueden incluir anemia primaria provocada por trastornos en la sangre o funciones hematopoyéticas y anemia secundaria provocada por otras enfermedades. La anemia primaria incluye anemia por deficiencia del hierro, anemia megaloblástica, anemia hemolítica, anemia aplásica o similares, y la anemia secundaria incluye enfermedades renales, infecciones (tuberculosis, endocarditis infecciosa, absceso hepático, etc.), enfermedades del colágeno (artritis reumatoide crónica, enfermedad eritematosa sistémica, etc.), enfermedades malignas tales como cáncer, enfermedades hepáticas, enfermedades endocrinas, o similares.

Los ejemplos del cáncer pueden incluir neoplasia hematológica, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer rectal, cáncer de tiroides, cáncer de cuello uterino, cáncer del intestino delgado, cáncer de próstata, cáncer pancreático o similares, y preferentemente, neoplasia hematológica, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de hígado o cáncer de próstata.

Los ejemplos de la neoplasia hematológica pueden incluir leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), síndromes mielodisplásicos (MDS), mieloma múltiple, linfoma de células T cutáneo (CTCL), linfoma de células T periférico (PTCL), linfoma de células grandes anaplásico (ALCL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), otra leucemia linfoide, linfoma de células NK, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, tal como linfoma de Burkitt, o similares.

Los ejemplos de la enfermedad hepática pueden incluir hepatitis crónica, cirrosis, insuficiencia hepática o similares, y los ejemplos de enfermedad endocrina pueden incluir hipotiroidismo, hipoadrenocorticismos, hipopituitarismo, hiperparatiroidismo o similares.

5 El anticuerpo monoclonal, o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención, puede ser un principio activo de un agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades que acompañan a anemia implicada con BMP9.

10 El agente terapéutico que incluye el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención, o derivado del mismo, puede comprender sólo el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo, o el derivado del mismo, como principio activo. Es preferible que el agente terapéutico se proporcione como una preparación farmacéutica producida mezclándolo con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables según un método apropiado bien conocido en el campo técnico de la farmacia.

15 Preferentemente, el agente terapéutico se administra mediante una vía que es la más eficaz para el tratamiento. Los ejemplos de la vía pueden incluir administración oral y administración parenteral, tal como administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa, y se prefiere administración intravenosa o subcutánea.

20 Los ejemplos de la forma de dosificación incluyen pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, cintas o similares.

25 Aunque la dosis o la frecuencia de administración varían dependiendo del efecto terapéutico deseado, método de administración, periodo de tratamiento, edad, peso corporal o similares, habitualmente se administra a una dosis diaria de 10 mg/kg a 10 mg/kg por adulto.

30 Además, la presente invención se refiere a un método para detectar o medir de manera inmunológica BMP9, que incluye el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo que reconoce y se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de BMP9 o a una estructura tridimensional de la misma, como principio activo, en el que el método no es un método de diagnóstico puesto en práctica en el cuerpo humano o animal.

En la presente invención, el método para detectar o medir la cantidad de BMP9 puede ser cualquier método conocido, por ejemplo, un método de medición o detección inmunológico.

35 El método de medición o detección inmunológico es un método para detectar o determinar la cantidad de un anticuerpo o un antígeno, utilizando un anticuerpo o antígeno marcado. Los ejemplos del método de medición o detección inmunológico incluyen un método de inmunoanticuerpo marcado con sustancia radiactiva (RIA), un inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA), un inmunoensayo fluorescente (FIA), un inmunoensayo luminiscente, un método de inmunotransferencia de tipo Western, un método fisicoquímico o similares.

40 A continuación en la presente memoria, se describirán en detalle un método para preparar el anticuerpo de la presente invención, un método para tratar la enfermedad y un método para diagnosticar la enfermedad.

#### 45 1. Método de preparación de anticuerpo monoclonal

##### (1) Preparación de antígeno

50 Puede obtenerse BMP9 o tejidos que expresan BMP9 como antígeno, introduciendo un vector de expresión que comprende ADNc que codifica para una longitud completa de BMP9 o una longitud parcial de la misma en *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de animal o similares. Además, BMP9 puede purificarse y obtenerse a partir de tejidos humanos o similares que expresan una gran cantidad de BMP9, y puede permitirse utilizar tal tejido o similares directamente como antígenos. Además, puede prepararse un péptido sintético que presenta una secuencia parcial de la BMP9, mediante un método de síntesis química, tal como método de Fmoc o método de tBoc, y utilizarse como antígeno.

55 La BMP9 utilizada en la presente invención puede producirse, por ejemplo, expresando un ADN que codifica para BMP9 en una célula hospedadora, utilizando un método descrito en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) o Current Protocols in molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) o similares según el siguiente método.

60 En primer lugar, se prepara un vector recombinante insertando una longitud completa ADNc que comprende la región que codifica para BMP9 en el sentido 3' de un promotor de un vector de expresión apropiado. Puede utilizarse un fragmento de ADN que presenta una longitud apropiada que contiene una región que codifica para el polipéptido, preparado basándose en el ADNc de longitud completa, en lugar del ADNc de longitud completa anterior. Después de eso, puede obtenerse un transformante que produce el polipéptido, introduciendo el vector recombinante en una célula hospedadora adecuada para el vector de expresión.

65

El vector de expresión puede ser uno cualquiera, siempre que pueda replicarse de manera autónoma en la célula hospedadora que va a utilizarse, o pueda integrarse en un cromosoma que incluye un promotor apropiado en una posición tal que puede transcribirse el ADN que codifica para el polipéptido.

5

La célula hospedadora puede ser una cualquiera, siempre que pueda expresar el gen deseado, tal como un microorganismo que pertenece a los géneros *Escherichia*, incluyendo *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de animal o similares.

10

Cuando se utiliza un procarionta tal como *Escherichia coli* como la célula hospedadora, se prefiere que el vector recombinante pueda replicarse de manera autónoma en el procarionta y comprenda un promotor, una secuencia de unión a ribosoma, el ADN que codifica para BMP9, y una secuencia de terminación de la transcripción. No es necesario que el vector recombinante presente una secuencia de terminación de la transcripción, pero preferentemente se establece una secuencia de terminación de la transcripción justo después del gen estructural. El vector recombinante puede comprender además un gen que regula el promotor.

15

El vector recombinante es preferentemente un plásmido en el que el espacio entre la secuencia de Shine-Dalgarno (denominado a continuación en la presente memoria secuencia de SD), que es la secuencia de unión a ribosoma, y el codón de iniciación se ajusta a una distancia apropiada (por ejemplo, de 6 a 18 nucleótidos).

20

Además, la secuencia de bases del ADN que codifica para BMP9 puede sustituirse por otra base para ser un codón adecuado para su expresión en una célula hospedadora, mejorando así la productividad de la BMP9 deseada.

25

Puede utilizarse cualquier vector de expresión, siempre que pueda funcionar en la célula hospedadora que va a utilizarse, y se muestra a título de ejemplo por pBTrp2, pBTac1, pBTac2 (todos fabricados por Roche Diagnostics), pKK233-2 (fabricado por Pharmacia), pSE280 (fabricado por Invitrogen), pGEMEX-1 (fabricado por Promega), pQE-8 (fabricado por QIAGEN), pKYP10 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 110600/83), pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)], pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)], pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)], pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene), pTrs30 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs30 (FERM BP-5407)], pTrs32 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs32 (FERM BP-5408)], pGHA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGHA2 (FERM BP-400), solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 221091/85], pGKA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798), solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 221091/85], pTerm2 (US Patente Nos. 4686191, 4939094, 5160735), pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)], pGEX (fabricado por Pharmacia), sistema pET (fabricado por Novagen), pME18SFL3 o similares.

30

35

Puede utilizarse cualquier promotor, siempre que pueda funcionar en la célula hospedadora que va a utilizarse. Los ejemplos del mismo pueden incluir promotores derivados de *Escherichia coli*, fago o similares, tales como un promotor de trp (Ptrp), un promotor de lac, un promotor de PL, un promotor de PR, un promotor de T7 o similares. Además, pueden utilizarse promotores diseñados y modificados artificialmente, tales como un promotor en el que dos promotores de Ptrp se unen en tándem, un promotor de tac, un promotor de lacT7, un promotor de tetI o similares.

40

Los ejemplos de la célula hospedadora pueden incluir *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* No. 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  o similares.

50

Puede utilizarse cualquier método para introducir el vector recombinante en la célula hospedadora, siempre que sea un método para introducir ADN en la célula hospedadora, y los ejemplos del mismo pueden incluir un método que utiliza un ion de calcio [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972), Gene, 17, 107 (1982), Molecular&General Genetics, 168, 111 (1979)].

55

Cuando se utiliza una célula de animal como célula hospedadora, puede utilizarse cualquier vector de expresión, siempre que pueda funcionar en la célula de animal. Los ejemplos del mismo pueden incluir pcDNA1, pcDM8 (fabricado por Funakoshi), pAGE107 [solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 22979/91; Cytotechnology, 3, 133 (1990)], pAS3-3 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 227075/90), pCDM8 [Nature, 329, 840,(1987)], pcDNA1/Amp (fabricado por Invitrogen), pcDNA3.1 (fabricado por Invitrogen), pREP4 (fabricado por Invitrogen), pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)], pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93 (documento WO 97/10354) o similares.

60

65

Puede utilizarse cualquier promotor, siempre que pueda funcionar en una célula de animal. Los ejemplos del mismo pueden incluir un promotor de gen inmediato temprano (IE) de citomegalovirus (CMV), un promotor temprano de SV40, un promotor de retrovirus, un promotor de metalotioneína, un promotor de choque térmico,

un promotor de SR $\alpha$ , un promotor o potenciador de virus de leucemia murina de Molony, o similares. Además, puede utilizarse el potenciador del gen IE de CMV humano junto con el promotor.

Los ejemplos de la célula hospedadora pueden incluir célula de leucemia de Namalwa humana, célula de COS de mono, célula de ovario de hámster chino (CHO) (Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell genetics, Appendix I, II (págs. 883-900)), CHO/DG44, CHO-K1 (nº de registro de ATCC: CCL-61), DUKXB11 (nº de registro de ATCC: CCL-9096), Pro-5 (nº de registro de ATCC: CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, nº de cat. 11619), Pro-3, célula de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (también denominada YB2/0), célula de mieloma de ratón NSO, célula de mieloma de ratón SP2/0- Ag14, célula de hámster sirio BHK o HBT5637 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 299/88), o similares.

Puede utilizarse cualquier método de introducción del vector recombinante en la célula hospedadora, siempre que sea un método para introducir ADN en una célula de animal, y los ejemplos del mismo pueden incluir electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], un método de fosfato de calcio (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 227075/90), un método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], o similares.

Puede producirse BMP9 cultivando el transformante derivado a partir de un microorganismo, una célula de animal o similares que presenta un vector recombinante que incluye el ADN que codifica para BMP9 en un medio para formar y acumular BMP9 en el cultivo, y recuperándola del cultivo. El método para cultivar el transformante en el medio se lleva a cabo según el método habitual utilizado en el cultivo de huéspedes.

Cuando se expresa BMP9 en una célula derivada de eucariota, puede obtenerse BMP9 a la que se unen azúcares o cadenas de azúcar. Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante que contiene un promotor inducible, puede añadirse un inductor al medio, si es necesario. Por ejemplo, puede añadirse isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido o similares, al medio, cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante utilizando un promotor de lac; o puede añadirse ácido indoleacrilico o similares, al mismo, cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante utilizando un promotor de trp.

Cuando se cultiva un transformante obtenido utilizando una célula de animal como célula hospedadora, el medio incluye medio RPMI 1640 utilizado generalmente [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio MEM de Eagle [Science, 122, 501 (1952)], medio MEM modificado por Dulbecco [Virology, 8, 396 (1959)], medio 199 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)], medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), los medios complementados con suero bovino fetal (FBS), etc., o similares. El cultivo se lleva a cabo generalmente a un pH de 6 a 8 y a de 30 a 40°C durante de 1 a 7 días en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%. Si es necesario, puede añadirse un antibiótico, tal como kanamicina o penicilina, al medio durante el cultivo.

Con respecto al método de expresión del gen que codifica para BMP9, además de la expresión directa, puede llevarse a cabo producción secretora, expresión de proteína de fusión o similares [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)].

El procedimiento para producir BMP9 incluye un método de expresión intracelular en una célula hospedadora, un método de secreción extracelular a partir de una célula hospedadora, un método para producir la misma en una membrana exterior de célula hospedadora, o similares. El método apropiado puede seleccionarse cambiando la célula hospedadora utilizada o la estructura de la BMP9 producida.

Cuando se produce BMP9 en una célula hospedadora o en una membrana exterior de célula hospedadora, BMP9 puede secretarse positivamente de manera extracelular, según el método de Paulson *et al.* [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)], el método de Lowe *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989), Genes Develop., 4, 1288 (1990)], los métodos descritos en la solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 336963/93 y el documento WO 94/23021, o similares.

Además, la cantidad de producción de BMP9 puede aumentarse mediante un sistema de amplificación génica utilizando un gen de dihidrofolato reductasa (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 227075/90). La BMP9 resultante puede aislarse y purificarse, por ejemplo, de la siguiente manera. Cuando se expresa BMP9 de manera intracelular en un estado disuelto, las células tras el cultivo se recuperan mediante centrifugación, se suspenden en un tampón acuoso y después se rompen mediante un ultrasonicador, prensa francesa, homogeneizador de Manton Gaulin, dispositivo Dynomill o similares, para obtener un extracto libre de células.

El extracto libre de células se centrifuga para obtener un sobrenadante, y puede obtenerse una preparación purificada sometiendo el sobrenadante a técnicas generales de aislamiento y purificación de proteínas, tales como extracción por disolvente; separación por formación de sal con sulfato de amonio, etc.; separación de

sales; precipitación con un disolvente orgánico; cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina tal como dietilaminoetilo (DEAE)-Sephacrose, DIAION HPA-75 (fabricado por Mitsubishi Chemical); cromatografía de intercambio catiónico utilizando una resina tal como S-Sephacrose FF (fabricado por Pharmacia); cromatografía hidrófoba utilizando una resina tal como butil-Sephacrose o fenil-Sephacrose; filtración en gel utilizando un tamiz molecular; cromatografía de afinidad; cromatografía de exclusión; electroforesis, tal como isoelectroenfoque; o similares que pueden utilizarse solas o en combinación.

Cuando se expresa BMP9 de manera intracelular formando un cuerpo de inclusión, se recuperan las células, se rompen y se centrifugan de la misma manera y se recupera el cuerpo de inclusión de BMP9 como fracción de precipitación. El cuerpo de inclusión recuperado de la proteína BMP9 se solubiliza con un agente de desnaturalización de proteínas. Se convierte la proteína en una estructura tridimensional normal diluyendo o dializando la disolución solubilizada y después se obtiene una preparación purificada de polipéptido, mediante el mismo método de aislamiento y purificación que anteriormente.

Cuando BMP9 o el derivado tal como un producto glicosilado se secreta de manera extracelular, puede recuperarse BMP9 o el derivado tal como un producto glicosilado del cultivo sobrenadante. Se trata el cultivo mediante un método tal como centrifugación de la misma manera que anteriormente para obtener una fracción soluble, y puede obtenerse una preparación purificada a partir de la fracción soluble, mediante el mismo método de aislamiento y purificación que anteriormente.

Además, BMP9 utilizada en la presente invención puede producirse mediante un método de síntesis química, tal como método de Fmoc o método de tBoc. Además, puede sintetizarse químicamente utilizando un sintetizador de péptidos fabricado por Advanced ChemTech, Perkin-Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corporation o similares.

#### (2) Inmunización de animal y preparación de célula productora de anticuerpo para fusión

Se inmuniza un ratón, rata, hámster, o similar, que tiene de 3 a 20 semanas de edad, con el antígeno preparado en el punto (1) anterior y se recogen células productoras de anticuerpo dentro del bazo, ganglio linfático o sangre periférica del animal. Además, cuando no se reconoce el aumento de un título de anticuerpo suficiente en el animal anterior debido a baja inmunogenicidad, puede utilizarse un ratón deficiente para BMP9 como animal que va a inmunizarse.

La inmunización se lleva a cabo administrando el antígeno al animal mediante inyección subcutánea, intravenosa o intraperitoneal junto con un adyuvante apropiado, tal como adyuvante completo de Freund, combinación de gel de hidróxido de aluminio con vacuna contra la tosferina, o similares. Cuando el antígeno es un péptido parcial, se produce un conjugado con una proteína portadora, tal como BSA (albúmina sérica bovina), KLH (hemocianina de lapa californiana) o similares, que se utiliza como antígeno.

La administración del antígeno se lleva a cabo de 2 a 10 veces cada semana o cada dos semanas, tras la primera administración. En el 3<sup>er</sup> al 7<sup>o</sup> día tras cada administración, se extrae una muestra de sangre del plexo venoso en el fondo ocular, se somete a prueba el título de anticuerpo del suero, mediante inmunoensayo enzimático [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] o similar. Un animal que muestra un título de anticuerpo suficiente en su suero contra el antígeno utilizado para la inmunización se utiliza como fuente de células productoras de anticuerpo para fusión.

De tres a siete días tras la administración final del antígeno, se escinde tejido que contiene las células productoras de anticuerpo, tal como el bazo, del animal inmunizado, para recoger las células productoras de anticuerpo. Cuando se utilizan células del bazo, se corta el bazo y se extrae, seguido de centrifugación. Después, se obtienen células productoras de anticuerpo para fusión, retirando los eritrocitos.

#### (3) Preparación de célula de mieloma

Se utiliza una estirpe celular establecida obtenida a partir de ratón como células de mieloma. Los ejemplos de la misma pueden incluir estirpe de células de mieloma de ratón resistente a 8-azaguanina (derivada de Balb/C) P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1(1978)], P3-NS1/1Ag41(NS-1) [European J. Immunology, 6, 511(1976)], SP2/0-Ag14(SP- 2) [Nature, 276, 269 (1978)], P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)], P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] o similares.

Se subcultivan las células de mieloma en un medio normal [un medio RPMI1640 que contiene glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, FBS y 8-azaguanina] y se subcultivan en el medio normal, de 3 a 4 días antes de la fusión celular, para garantizar un número de células de  $2 \times 10^7$  o más en el día de la fusión.

#### (4) Fusión celular y preparación de hibridoma para la producción de anticuerpo monoclonal

Las células productoras de anticuerpo para fusión, obtenidas mediante el punto (2) anterior y las células de

mieloma obtenidas mediante el punto (3) anterior se lavan suficientemente con un medio mínimo esencial (MEM) o PBS (1.83 g de hidrogenofosfato de disodio, 0.21 g de dihidrogenofosfato de potasio, 7.65 g de cloruro de sodio, 1 litro de agua destilada, pH 7.2) y se mezclan para dar una razón de células productoras de anticuerpo:células de mieloma=5 a 10:1, seguido de centrifugación. Después, se descarta el sobrenadante.

Se separa suficientemente el grupo de células precipitadas. Se añade la mezcla de polietilenglicol-1000 (PEG-1000), MEM y dimetilsulfóxido a las células con agitación a 37°C. Además, se añaden de 1 a 2 ml de medio MEM varias veces, cada uno o dos minutos, y se añade MEM para dar un volumen total de 50 ml. Tras la centrifugación, se descarta el sobrenadante. Tras separar suavemente las células precipitadas, se suspenden suavemente las células productoras de anticuerpo para fusión en medio HAT [un medio normal que contiene hipoxantina, timidina y aminopterina]. Se cultiva la suspensión en un incubador con CO<sub>2</sub> al 5%, durante de 7 a 14 días a 37°C.

Tras el cultivo, se toma una muestra de una porción del sobrenadante de cultivo y se selecciona un grupo de células que son reactivas frente a un antígeno que contiene BMP9 y no son reactivas frente a un antígeno que no contiene BMP9, mediante un ensayo de unión tal como se describe a continuación. Después, se lleva a cabo la clonación dos veces mediante un método de dilución limitante [en primer lugar, se utiliza un medio HT (medio HAT del que se elimina la aminopterina), y en segundo lugar, se utiliza el medio normal], y se selecciona un hibridoma que muestra de manera estable un alto título de anticuerpo como hibridoma productor de anticuerpo monoclonal.

#### (5) Preparación de anticuerpo monoclonal purificado

Las células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales obtenidas mediante el punto (4) anterior se administran mediante inyección intraperitoneal en ratones de 8 a 10 semanas de edad o ratones desnudos tratados con pristano [se administran por vía intraperitoneal 0.5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano), seguido de alimentación durante 2 semanas]. El hibridoma desarrolla tumor de ascitis en de 10 a 21 días. Se extrae el líquido ascítico de los ratones, se centrifuga para retirar sólidos, se somete a separación por formación de sal con sulfato de amonio a del 40 al 50% y después se precipita mediante ácido caprílico, se hace pasar a través de una columna de DEAE-Sepharose, una columna de proteína A o una columna de filtración en gel para recoger una fracción de IgG o IgM como anticuerpo monoclonal purificado.

Además, se cultiva un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal, obtenido mediante el punto (4) anterior en medio RPMI1640 que contiene FBS al 10% o similar y se retira el sobrenadante mediante centrifugación, seguido de suspensión en medio de hibridoma-SFM y se cultiva durante de 3 a 7 días. El anticuerpo monoclonal purificado puede obtenerse centrifugando la suspensión de células obtenida, seguido de purificación del sobrenadante resultante con columna de proteína A o columna de proteína G para recoger las fracciones de IgG. Adicionalmente, el medio de hibridoma-SFM puede contener DIGO GF21 al 5%.

La subclase del anticuerpo puede determinarse utilizando un kit de tipado de subclase mediante inmunoensayo enzimático. La cantidad de la proteína puede determinarse mediante el método de Lowry o a partir de la absorbancia a 280 nm.

#### (6) Selección de anticuerpo monoclonal

Se lleva a cabo la selección de anticuerpo monoclonal mediante el siguiente ensayo de unión utilizando un método de inmunoensayo enzimático y análisis cinético con Biacore.

##### (6-a) Ensayo de unión

Como antígeno, se utiliza una célula con gen introducido, obtenida introduciendo un vector de expresión que comprende un ADNc que codifica para BMP9 obtenido en el punto (1) en *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de animal o similares, una proteína recombinante, o un polipéptido purificado o péptido parcial obtenido a partir de un tejido humano. Cuando el antígeno es un péptido parcial, se prepara un conjugado con una proteína portadora tal como BSA o KLH, que puede utilizarse.

Tras preparar estos antígenos en una capa sólida dispensándolos en una placa de 96 pocillos, se dispensa una sustancia que va a someterse a prueba tal como suero, un sobrenadante de cultivo de un hibridoma o un anticuerpo monoclonal purificado en los mismos como anticuerpo primario y se deja que reaccione. Tras lavar exhaustivamente con PBS, PBS-Tween o similares, se dispensa un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con biotina, una enzima, un material quimioluminiscente, un compuesto radiactivo o similares en los mismos como anticuerpo secundario y se deja que reaccione. Tras lavar exhaustivamente con PBS-Tween, se lleva a cabo la reacción apropiada para el marcador del anticuerpo secundario, para seleccionar un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con el antígeno.

Además, el anticuerpo monoclonal de la presente invención puede obtenerse añadiendo un anticuerpo objeto al

sistema de ensayo de unión anterior para dejar que reaccione. Concretamente, un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal obtenido en la unión de una secuencia de aminoácidos de BMP9, o una estructura tridimensional de la misma, puede obtenerse examinando un anticuerpo que inhibe la unión del anticuerpo monoclonal tras la adición del anticuerpo objeto.

Además, un anticuerpo que se une al mismo epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal de la presente invención puede obtenerse identificando un epítipo del anticuerpo obtenido mediante el sistema de ensayo de unión anterior, preparando un péptido sintético parcial del epítipo o un péptido sintético que imita la estructura tridimensional del epítipo, e inmunizando con el péptido.

#### (6-b) Análisis cinético con Biacore

La cinética entre un antígeno y una sustancia de prueba se mide utilizando un dispositivo Biacore T100, y después se analizan los resultados utilizando un software de análisis que acompaña al aparato. Tras inmovilizarse el anticuerpo anti-IgG de ratón sobre un chip sensor CM 5, mediante un método de acoplamiento de amina, se deja que una sustancia de prueba, tal como un sobrenadante de cultivo de un hibridoma, un anticuerpo monoclonal purificado o similares fluya y se una a una cantidad apropiada, y se deja adicionalmente que un antígeno fluya a diversas concentraciones conocidas. Después, se miden la asociación y disociación.

Utilizando los datos obtenidos y el software que acompaña al aparato, se lleva a cabo el análisis cinético utilizando el modelo de unión 1:1 para obtener diversos parámetros. De lo contrario, tras inmovilizarse BMP9 humana sobre el chip sensor mediante un método de acoplamiento de amina, se deja que un anticuerpo monoclonal purificado fluya a diversas concentraciones conocidas seguido de medir la asociación y disociación. Utilizando los datos obtenidos y el software que acompaña al aparato, se lleva a cabo el análisis cinético utilizando un modelo de unión bivalente para obtener diversos parámetros.

## 2. Preparación de anticuerpo recombinante

Como ejemplos de preparación de anticuerpos recombinantes, a continuación se muestran procedimientos para producir un anticuerpo quimérico humano y un anticuerpo humano con injerto de CDR.

### (1) Construcción de vector para expresión de anticuerpo recombinante

Un vector para expresión de anticuerpo recombinante es un vector de expresión para célula de animal en el que se han insertado los ADN que codifican para CH y CL de un anticuerpo humano, y se construye clonando cada uno de los ADN que codifican para CH y CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para célula de animal.

La región constante (denominada a continuación en la presente memoria región C) de un anticuerpo humano puede ser CH y CL de cualquier anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen CH de la subclase  $\gamma 1$  y CL de la clase  $\kappa$  de anticuerpo humano, o similares. Como ADN que codifican para CH y CL de un anticuerpo humano, puede utilizarse generalmente el ADNc y también puede utilizarse un ADN cromosómico compuesto por un exón y un intrón.

Como vector de expresión para célula de animal, puede utilizarse cualquier vector de expresión, siempre que pueda insertarse un gen que codifica para la región C de un anticuerpo humano en el mismo y expresarse en el mismo. Los ejemplos del mismo incluyen pAGE107 [Citotechnol., 3, 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)], pSG1bd2-4 [Citotechnol., 4, 173 (1990)], pSE1UK1Sed1-3 [Citotechnol., 13, 79 (1993)] o similares.

Los ejemplos de un promotor y un potenciador utilizados para un vector de expresión para célula de animal incluyen un promotor temprano de SV40 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], un LTR de virus de leucemia de ratón de Moloney [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)], un promotor de cadena H de inmunoglobulina [Cell, 41, 479 (1985)], un potenciador [Cell, 33, 717 (1983)] o similares.

Como vector para expresión de anticuerpo recombinante, puede utilizarse un tipo del vector para expresión de anticuerpo recombinante en el que las cadenas tanto H como L de anticuerpo existen en el mismo vector (tipo tándem) [J. Immunol. Methods, 167, 271(1994)], en cuanto a facilidad de construcción de un vector para expresión de anticuerpo recombinante, facilidad de introducción en células de animal y equilibrio entre los niveles de expresión de cadenas H y L de anticuerpo en células de animal, y también puede utilizarse un tipo en el que las cadenas H y L de anticuerpo existen en vectores separados. Los ejemplos del tipo tándem del vector para expresión de anticuerpo recombinante incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)], o similares.

(2) Adquisición de ADNc que codifica para región V de anticuerpo derivado de animal no humano y análisis de secuencia de aminoácidos

5 La adquisición de los ADNc que codifican para VH y VL de un anticuerpo no humano y el análisis de secuencia de aminoácidos pueden llevarse a cabo de la siguiente manera.

Se extrae ARNm de células de hibridoma que producen un anticuerpo no humano para sintetizar ADNc. Se clona el ADNc sintetizado en un vector, tal como un fago o un plásmido, para preparar una biblioteca de ADNc.

10 Cada uno de un fago recombinante o plásmido recombinante que contiene ADNc que codifica para VH o VL se aísla de la biblioteca utilizando ADN que codifica para la región C o región V de un anticuerpo de ratón como sonda. Se determina la longitud completa de las secuencias de bases de VH y VL de un anticuerpo de ratón de interés en el fago recombinante, o plásmido recombinante, y se deduce la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL a partir de las secuencias de bases, respectivamente.

15 Los ejemplos del animal no humano para preparar una célula de hibridoma que produce un anticuerpo no humano incluyen ratón, rata, hámster, conejo o similares. Puede utilizarse cualquier animal siempre que pueda producirse una célula de hibridoma a partir del mismo.

20 Puede prepararse ARN total a partir de una célula de hibridoma utilizando un método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)], o un kit tal como kit RNA easy (fabricado por Qiagen) o similares.

25 Puede prepararse ARNm a partir de ARN total utilizando un método de columna de celulosa con oligómeros (dT) inmovilizados [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], un método que utiliza un kit, tal como kit de purificación de ARNm Oligo-dT30 <Super> (fabricado por Takara Bio) o similares. Además, puede prepararse ARNm a partir de células de hibridoma utilizando un kit, tal como un kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen), un kit de purificación de ARNm QuickPrep (fabricado por Pharmacia) o similares.

30 Los ejemplos del método para sintetizar ADNc y preparar una biblioteca de ADNc incluyen métodos conocidos [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, suplemento 1, John Wiley & Sons (1987-1997)], un método que utiliza un kit, tal como un sistema de plásmido Super Script para síntesis de ADNc y clonación de plásmido (fabricado por Invitrogen), un kit de síntesis ZAP-cDNA (fabricado por Stratagene), o similares.

35 El vector para preparar una biblioteca de ADNc, en el que se inserta como molde ADNc sintetizado utilizando ARNm extraído a partir de una célula de hibridoma, puede ser cualquier vector, siempre que el ADNc pueda insertarse en el mismo. Los ejemplos del mismo incluyen ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], λZAPII (fabricado por Stratagene), λgt10 y λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell, pT7T3-18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)], o similares.

45 Puede utilizarse cualquier *Escherichia coli* para introducir la biblioteca de ADNc construida mediante un fago o vector de plásmido, siempre que la biblioteca de ADNc pueda introducirse, expresarse y mantenerse. Los ejemplos del mismo incluyen XL1-Blue MRF [Strategies, 5, 81 (1992)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], Y1088 y Y1090 [Science, 222: 778 (1983)], NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], JM105 [Gene, 38, 275 (1985)], o similares.

50 Puede utilizarse un método de hibridación de colonias, o hibridación de placas de lisis, que utiliza una sonda marcada con isótopo o con fluorescencia [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] para seleccionar clones de ADNc que codifican para VH o VL de un anticuerpo no humano o similares a partir de la biblioteca de ADNc.

55 Además, el ADNc que codifica VH o VL puede prepararse mediante reacción en cadena de la polimerasa [denominada a continuación en la presente memoria "PCR"; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in molecular Biology, suplemento 1, John Wiley & Sons (1987-1997)] preparando cebadores y utilizando ADNc preparado a partir de ARNm o una biblioteca de ADNc como molde.

60 La secuencia de bases del ADNc puede determinarse digiriendo el ADNc seleccionado con enzimas de restricción apropiadas o similares, clonando los fragmentos en un plásmido, tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), llevando a cabo un método de análisis de secuencia habitualmente utilizado. Por ejemplo, el método de análisis de secuencia se lleva a cabo utilizando un analizador automático de secuencia de nucleótidos, tal como el dispositivo ABI PRISM3700 (fabricado por PE Biosystems) o secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia) tras la reacción, tal como el método de didesoxi [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463

(1977)].

5 Puede confirmarse si los ADNc obtenidos codifican para las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL del anticuerpo que contiene una secuencia de señal secretora, estimando la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL a partir de la secuencia de nucleótidos determinada y comparándola con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [secuenciador de ADN A.L.F., US Dept. Health and Human Services (1991)].

10 Con respecto a las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL del anticuerpo que contiene una secuencia de señal secretora, la longitud de la secuencia de señal secretora y la secuencia de aminoácidos N-terminal pueden estimarse comparándolas con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [secuenciador de ADN A.L.F., US Dept. Health and Human Services (1991)], y además puede determinarse el subgrupo al que pertenecen. Además, la secuencia de aminoácidos de cada CDR de VH y VL puede determinarse comparándolas con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [secuenciador de ADN A.L.F., US Dept. Health and Human Services (1991)].

15 Además, puede examinarse la novedad de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de VH y VL, llevando a cabo una búsqueda de homología con secuencias en cualquier base de datos, por ejemplo, SWISS-PROT, PIR-Protein o similares, utilizando la longitud completa obtenida de las secuencias de aminoácidos de VH y VL, por ejemplo, según el método de BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] o similares.

(3) Construcción de vector para expresión de anticuerpo quimérico humano

25 Se clona el ADNc que codifica para cada una de VH y VL de anticuerpo de animal no humano en el sentido 5' de genes que codifican para CH o CL de anticuerpo humano del vector para expresión de anticuerpo recombinante mencionado en el punto (1) anterior, construyendo así un vector para expresión de anticuerpo quimérico humano.

30 Con el fin de ligar el extremo 3'-terminal de ADNc que codifica para VH o VL de anticuerpo de animal no humano y el extremo 5'-terminal de CH o CL de anticuerpo humano, cada ADNc que codifica para VH y VL se prepara de modo que codifica para aminoácidos apropiados codificados por una secuencia de bases de una porción de unión y se diseña para presentar una secuencia de reconocimiento apropiada de una enzima de restricción.

35 Los ADNc preparados de VH y VL se clonan respectivamente de modo que cada uno de ellos se expresa en una forma apropiada en el sentido 5' del gen que codifica para CH o CL del anticuerpo humano del vector para la expresión de anticuerpo humano con injerto de CDR mencionado en el punto (1) anterior, para construir un vector para expresión de anticuerpo quimérico humano.

40 Además, el ADNc que codifica para VH o VL de un anticuerpo de animal no humano se amplifica mediante PCR utilizando un ADN sintético que presenta una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en ambos extremos, y cada uno de ellos se clona en el vector obtenido en el punto (1) anterior, para expresión de anticuerpo recombinante.

(4) Construcción de ADNc que codifica para región V de anticuerpo humano con injerto de CDR

45 Los ADNc que codifican para VH o VL de un anticuerpo humano con injerto de CDR pueden obtenerse de la siguiente manera.

50 Se seleccionan, respectivamente, secuencias de aminoácidos de FR en VH o VL de un anticuerpo humano en el que se injertan secuencias de aminoácidos de CDR en VH o VL de un anticuerpo no humano. Puede utilizarse cualquier secuencia de aminoácidos de FR, siempre que se derive de ser humano.

55 Los ejemplos del mismo incluyen secuencias de aminoácidos de FR de anticuerpos humanos registrados en una base de datos, tal como Protein Data Bank o similares, o secuencias de aminoácidos comunes para subgrupos de FR de anticuerpos humanos [A.L.F. ADN, US Dept. Health and Human Services (1991)] o similares. Con el fin de inhibir la disminución en la actividad de unión del anticuerpo, se seleccionan secuencias de aminoácidos de FR que presentan una alta homología (al menos el 60% o más) con la secuencia de aminoácidos de FR en VH o VL del anticuerpo original.

60 Después, se injertan secuencias de aminoácidos de CDR del anticuerpo original en la secuencia de aminoácidos de FR seleccionada en VH o VL del anticuerpo humano, respectivamente, para diseñar cada secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humano con injerto de CDR. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN teniendo en cuenta la frecuencia de utilización de codones encontrada en secuencias de nucleótidos de genes de anticuerpos [A.L.F. ADN, US Dept. Health and Human Services (1991)], y se diseña la secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humano con injerto de CDR.

5 Basándose en las secuencias de ADN diseñadas, se sintetizan varios ADN sintéticos que presentan una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos, y se lleva a cabo PCR utilizándolos. En este caso, se prefiere que se diseñen 6 ADN sintéticos por cada una de la cadena H y la cadena L, en vista de la eficiencia de reacción de PCR y las longitudes de ADN que pueden sintetizarse.

10 Además, el ADNc que codifica VH o VL de un anticuerpo humano con injerto de CDR puede clonarse fácilmente en el vector para expresar el anticuerpo humano con injerto de CDR construido en el punto (1), introduciendo la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en el extremo 5'-terminal de los ADN sintéticos que existen en ambos extremos.

15 De lo contrario, puede llevarse a cabo utilizando un ADN sintético como un único ADN que codifica para cada una de la cadena H de longitud completa y la cadena L de longitud completa, basándose en la secuencia de ADN diseñada.

20 Tras la PCR, se clona un producto amplificado en un plásmido, tal como pBluescript SK (-) (fabricado por Stratagene) o similares, y se determina la secuencia de bases según un método similar al método descrito en el punto (2), para obtener un plásmido que presenta una secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humano con injerto de CDR deseado.

(5) Modificación de secuencia de aminoácidos de región V de anticuerpo humano con injerto de CDR

25 Es conocido que cuando se produce un anticuerpo humano con injerto de CDR, simplemente injertando sólo CDR en VH y VL de un anticuerpo no humano en FR de VH y VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión a antígeno es menor que la del anticuerpo no humano original [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)].

30 En anticuerpos humanos con injerto de CDR, entre las secuencias de aminoácidos de FR en VH y VL de un anticuerpo humano, se identifican un residuo de aminoácido que está directamente relacionado con una unión a un antígeno, un residuo de aminoácido que interacciona con un residuo de aminoácido en CDR, y un residuo de aminoácido que mantiene la estructura tridimensional de un anticuerpo y está indirectamente relacionado con una unión a un antígeno, y se sustituyen por un residuo de aminoácido que se encuentra en el anticuerpo no humano original, aumentando así la actividad de unión a antígeno que se ha reducido.

35 Para identificar los residuos de aminoácido relacionados con la actividad de unión a antígeno en FR, puede construirse la estructura tridimensional de un anticuerpo y analizarse mediante cristalografía de rayos X [J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)], modelado por ordenador [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)] o similares. Además, puede obtenerse un anticuerpo humano con injerto de CDR modificado que presenta suficiente actividad de unión frente a antígeno, mediante ensayo y error, tal como produciendo varios anticuerpos modificados de cada anticuerpo y examinando sus actividades de unión a antígeno.

40 La modificación de la secuencia de aminoácidos de FR en VH y VL de un anticuerpo humano puede lograrse utilizando diversos ADN sintéticos para modificación según PCR, tal como se describe en el punto (4). Con respecto al producto amplificado obtenido mediante PCR, la secuencia de bases se determina según el método, tal como se describe en el punto (2), para examinar si se ha llevado a cabo la modificación deseada.

45 (6) Construcción de vector para expresión de anticuerpo humano con injerto de CDR

50 Puede construirse un vector para expresión de anticuerpo humano con injerto de CDR, clonando cada ADNc que codifica para VH o VL de un anticuerpo recombinante construido en el sentido 5' de cada gen que codifica para CH o CL del anticuerpo humano en el vector para expresión de anticuerpo recombinante, tal como se describe en el punto (1).

55 Por ejemplo, se introducen secuencias de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en el extremo 5'-terminal de los ADN sintéticos posicionados en ambos extremos de entre los ADN sintéticos utilizados en la construcción de VH o VL del anticuerpo humano con injerto de CDR en los puntos (4) y (5), y puede llevarse a cabo la clonación de modo que se expresan en una forma apropiada en el sentido 5' de cada gen que codifica para CH o CL del anticuerpo humano en el vector para una expresión de anticuerpo humano con injerto de CDR, tal como se describe en el punto (1).

60 (7) Expresión transitoria de anticuerpo recombinante

Los anticuerpos recombinantes pueden expresarse de manera transitoria utilizando el vector para expresión de anticuerpo recombinante obtenido en los puntos (3) y (6) o el vector de expresión modificado del mismo, para evaluar eficazmente la actividad de unión a antígeno de diversos anticuerpos humanos con injerto de CDR.

65 Puede utilizarse cualquier célula como célula hospedadora, siempre que la célula hospedadora pueda expresar

un anticuerpo recombinante. Por ejemplo, se utiliza célula COS-7 (ATCC CRL1651) [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283 (1991)]. La introducción del vector de expresión en la célula COS-7 se realiza utilizando un método de DEAE-dextrano [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283 (1991)], un método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], o similares.

Tras la introducción del vector de expresión, puede determinarse el nivel de expresión y la actividad de unión a antígeno del anticuerpo recombinante en el sobrenadante de cultivo mediante el inmunoensayo enzimático [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Monoclonal Antibody Experiment Manual, Kodansha Scientific (1987)] o similares.

#### (8) Adquisición de transformante que expresa de manera estable anticuerpo recombinante y preparación de anticuerpo recombinante

Puede obtenerse un transformante que expresa de manera estable un anticuerpo recombinante introduciendo el vector para expresión de anticuerpo recombinante obtenido en los puntos (3) y (6) en una célula hospedadora apropiada.

La introducción del vector de expresión en una célula hospedadora se realiza mediante electroporación [solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 257891/90, Citotechnology, 3, 133 (1990)] o similares. Como célula hospedadora en la que se introduce un vector para expresión de anticuerpo recombinante, puede utilizarse cualquier célula, siempre que sea una célula hospedadora que puede producir el anticuerpo recombinante.

Los ejemplos del mismo incluyen CHO-K1 (ATCC CCL-61), DUKXB11 (ATCC CCL-9096), Pro-5 (ATCC CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, nº de cat. 11619), célula de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (también denominada YB2/0), célula de mieloma de ratón NSO, célula de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 (nº de ATCC CRL1581), célula de ratón P3-X63-Ag8653 (nº de ATCC CRL1580), célula CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa es defectuoso [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4216 (1980)], Lec13 con resistencia a lectina adquirida [Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)], célula CHO en la que el gen de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa es defectuoso (documentos WO 2005/35586, WO 02/31140), célula de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (nº de ATCC CRL1662), o similares.

Tras la introducción del vector de expresión, se seleccionan transformantes que expresan de manera estable un anticuerpo recombinante cultivándolos en un medio para cultivo de células de animal que contiene un agente tal como sulfato de G418 o similares (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 257891/90).

Los ejemplos del medio para cultivo de células de animal incluyen medio RPMI1640 (fabricado por Invitrogen), medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical), medio EX-CELL301 (fabricado por JRH), medio IMDM (fabricado por Invitrogen), medio de hibridoma-SFM (fabricado por Invitrogen), medios obtenidos añadiendo diversos aditivos tales como FBS a estos medios, o similares.

El anticuerpo recombinante puede producirse y acumularse en un sobrenadante de cultivo, cultivando los transformantes obtenidos en un medio. El nivel de expresión y la actividad de unión a antígeno del anticuerpo recombinante en el sobrenadante de cultivo pueden medirse mediante ELISA o similares. Además, en el transformante, puede aumentarse el nivel de expresión del anticuerpo recombinante utilizando el sistema de amplificación de DHFR (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 257891/90) o similares.

El anticuerpo recombinante puede purificarse a partir del sobrenadante de cultivo del transformante utilizando una columna de proteína A [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. Además, el anticuerpo recombinante puede purificarse combinando los métodos de purificación de proteínas, tales como filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración o similares.

El peso molecular de la cadena H o la cadena L del anticuerpo recombinante purificado o la molécula de anticuerpo en su conjunto se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida [Nature, 227, 680 (1970)], inmunotransferencia de tipo Western [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)], o similares.

#### 3. Evaluación de la actividad de anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo

La actividad del anticuerpo monoclonal purificado o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención puede evaluarse de la siguiente manera.

La actividad de unión a BMP9 y tejido que expresa BMP9 se evalúa mediante el ensayo de unión descrito en los puntos 1-(6-a) anteriores y un método de resonancia de plasmón superficial que utiliza un sistema tal como el sistema Biacore descrito en el punto (6-b) anterior. Además, puede medirse mediante una técnica de anticuerpo

fluorescente [Cancer Immunol. Immunother, 36, 373 (1993)] o similares.

4. Método para tratar enfermedad utilizando anticuerpo monoclonal anti-BMP9 o fragmento de anticuerpo de la presente invención

5 El anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención pueden utilizarse para tratar enfermedades que acompañan a anemia implicada con BMP9.

10 El agente terapéutico que comprende el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención o el derivado del mismo puede comprender sólo el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo o el derivado del mismo como principio activo, y se suministra preferentemente como preparación farmacéutica producida mezclándolo con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, según un método apropiado bien conocido en el campo técnico de la farmacia.

15 Los ejemplos de vía de administración pueden incluir administración oral y administración parenteral, tal como administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los ejemplos de la forma de dosificación pueden incluir pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, polvo, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, cintas o similares.

20 Los ejemplos de la preparación farmacéutica adecuada para administración oral pueden incluir emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos o similares.

25 Pueden producirse preparaciones líquidas, tales como emulsiones y jarabes utilizando, como aditivos, agua; azúcares, tales como sacarosa, sorbitol o fructosa; glicoles tales como polietilenglicol o propilenglicol; aceites, tales como aceite de sésamo, aceite de oliva o aceite de soja; antisépticos, tales como ésteres de ácido p-hidroxibenzoico; aromatizantes tales como aromatizante de fresa o menta; o similares.

30 Pueden producirse cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos o similares utilizando, como aditivos, excipientes, tales como lactosa, glucosa, sacarosa o manitol; agentes disgregantes, tales como almidón o alginato de sodio; lubricantes, tales como estearato de magnesio o talco; aglutinantes, tales como poli(alcohol vinílico), hidroxipropilcelulosa o gelatina; tensioactivos, tales como éster de ácido graso; plastificantes, tales como glicerina; o similares.

35 Los ejemplos de la preparación farmacéutica adecuada para administración parenteral pueden incluir inyecciones, supositorios, pulverizaciones o similares.

40 Pueden prepararse inyecciones utilizando un excipiente, tal como una disolución de sal, una disolución de glucosa o una mezcla de ambas de las mismas. Pueden prepararse supositorios utilizando un excipiente, tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada, ácido carboxílico o similares.

45 Pueden prepararse pulverizaciones utilizando un excipiente que no estimula la membrana mucosa bucal o de las vías respiratorias del paciente y puede facilitar la absorción del anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo dispersándolo como partículas finas. Los ejemplos del excipiente incluyen lactosa, glicerol o similares. Es posible producir preparaciones farmacéuticas como aerosoles o polvos secos.

Además, los componentes mostrados a título de ejemplo como aditivos para preparaciones orales también pueden añadirse a las preparaciones parenterales.

50 A continuación en la presente memoria, se describirá la presente invención en detalle haciendo referencia a unos ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos. A menos que se especifique lo contrario, todos los reactivos se utilizan según los documentos adjuntos.

**Ejemplos**

55 **[Ejemplos]**

**[Ejemplo 1]**

Construcción de vector de direccionamiento para desactivación de gen de BMP9 de ratón

60 1-1) Construcción de vector de casete pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A

65 Un vector de casete pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A como vector básico para la construcción de un vector de direccionamiento deficiente (KO) es un vector que se prepara añadiendo un sitio de enzima de restricción a pBluescript y después insertando LoxP-Neo que presenta secuencias de LoxP en ambos extremos de unidad de expresión de gen marcador de resistencia a la neomicina y gen de cadena A de toxina diftérica (DT-A), y es el

mismo que el vector descrito en el ejemplo 7 del documento WO 2006/078072. A continuación en la presente memoria, se describirá una estrategia para la construcción de vector.

5 Para añadir nuevos sitios de enzima de restricción al vector pBluescript II SK(-) (fabricado por TOYOBO), se sintetizaron los siguientes oligoADN (LinkA1: SEC ID n°: 1, LinkA2: SEC ID n°: 2, LinkB1: SEC ID n°: 3 y LinkB2: SEC ID n°: 4).

10 Se trató pBluescript II SK(-) con enzimas de restricción, Sall y XhoI, y después se extrajeron fragmentos de plásmido de la mezcla de reacción utilizando fenol/cloroformo, seguido de precipitación en etanol. Para añadir los nuevos sitios de enzima de restricción para NruI, SgrAI y AscI a este fragmento de plásmido, se insertó un ligador que consistía en LinkA1 y LinkA2 en el mismo y se introdujo en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se adquirió un plásmido pBlueLA a partir del transformante obtenido.

15 Se trató pBlueLA con enzimas de restricción, NotI y EcoRI, y después se extrajeron los fragmentos de plásmido de la mezcla de reacción utilizando fenol/cloroformo, seguido de precipitación en etanol. Para añadir los nuevos sitios de enzima de restricción para PaeI, FseI y Sall a este fragmento de plásmido, se insertó un ligador que consistía en LinkB1 y LinkB2 en el mismo y se introdujo en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se adquirió un plásmido pBlueLAB a partir del transformante obtenido.

20 Se digirió un plásmido pLoxP-STneo descrito en el documento WO 00/10383 con XhoI para obtener el gen de resistencia a Neo (LoxP-Neo) que presentaba una secuencia de LoxP en ambos extremos. Se convirtieron ambos extremos de LoxP-Neo en extremos romos utilizando ADN polimerasa de T4 para obtener LoxP-Neo-B.

25 Se digirió pBlueLAB con EcoRV, y después se extrajeron fragmentos de plásmido de la mezcla de reacción utilizando fenol/cloroformo, seguido de precipitación en etanol. Se insertó LoxP-Neo-B en el fragmento de plásmido obtenido y se introdujo en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se adquirió un plásmido pBlueLAB-LoxP-Neo a partir del transformante obtenido.

30 Se digirió pMC1DT-A (fabricado por Lifetech Oriental) con XhoI y Sall, y se recuperó un fragmento que contenía gen de DT-A utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por Qiagen).

35 Se digirió pBlueLAB-LoxP-Neo con XhoI, y después se extrajeron fragmentos de plásmido de la mezcla de reacción utilizando fenol/cloroformo, seguido de precipitación en etanol. Se insertó el fragmento que contenía gen de DT-A en el fragmento de plásmido obtenido y se introdujo en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se adquirió un vector de casete pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A a partir del transformante obtenido.

#### 1-2) Adquisición de fragmento de región genómica en 3' del gen de BMP9 de ratón

40 Basándose en la secuencia de ADN genómico (n° de registro ENSMUSG00000072625) que incluye el gen de BMP9 (GDF2) de ratón, obtenida de Ensemble Genome Browser, se diseñaron cebadores (SEC ID n°: 5 y 6).

45 Se añadieron ADN derivado del clon RP23-181N8 que comprende gen de BMP9 de ratón C57BL/6J en cromosoma artificial bacteriano (BAC) como molde, 10 pmol de cada uno de los cebadores de SEC ID n°: 5 y 6, y KOD-plus- (fabricado por TOYOBO), para preparar 50  $\mu$ l de una mezcla de reacción. Se incubó la mezcla de reacción a 94°C durante 3 minutos y se llevaron a cabo 35 ciclos de PCR que consistían en 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 5 minutos.

50 Se sometió el fragmento amplificado por PCR a electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron 2.1 kpb de un fragmento utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por Qiagen). Se digirió el fragmento amplificado por PCR así recuperado, con ClaI y AscI, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se recuperó el fragmento digerido con enzima (fragmento ClaI-AscI) utilizando el kit de extracción en gel QIAquick.

55 Se digirió pBlueLAB con ClaI y AscI, y se trató con fosfatasa alcalina de camarón (SAP). Después, se extrajo el fragmento ClaI-AscI utilizando fenol/cloroformo, seguido de precipitación en etanol. Se insertó el fragmento ClaI-AscI así recuperado y se introdujo en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

60 Se seleccionaron clones que presentaban un inserto génico sin mutación debida a PCR a partir de los transformantes obtenidos, se digirió el ADN de plásmido con ClaI y AscI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se recuperaron 2.1 kpb del fragmento tratado con enzima que incluía la región genómica en 3' del gen de BMP9 de ratón utilizando el kit de extracción en gel QIAquick.

#### 1-3) Adquisición de fragmento de región genómica en 5' del gen de BMP9 de ratón

65 Basándose en la secuencia de ADN genómico (n° de registro ENSMUSG00000072625) que incluye el gen de BMP9 de ratón obtenida de Ensemble Genome Browser, se diseñaron cebadores (SEC ID n°: 7 y 8).

5 Se añadieron ADN derivado del clon de BAC RP23-181N8 como molde, 10 pmol de cada uno de los cebadores de SEC ID n°: 7 y 8 y KOD-plus- (fabricado por TOYOBO), para preparar 50 µl de una mezcla de reacción. Se incubó la mezcla de reacción a 94°C durante 3 minutos, y se llevaron a cabo 35 ciclos de PCR que consistían en 98°C durante 10 segundos y 68°C durante 5 minutos.

10 Se sometió el fragmento amplificado por PCR a electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron 5.1 kpb de un fragmento utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por Qiagen). Se digirió el fragmento amplificado por PCR así recuperado, con PaeI y FseI, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se recuperó el fragmento digerido con enzima (fragmento PaeI-FseI) utilizando el kit de extracción en gel QIAquick.

15 Se digirió pBlueLAB con PaeI y FseI, y se trató con SAP. Después, se extrajo el fragmento PaeI-FseI utilizando fenol/cloroformo, seguido de precipitación en etanol. Se insertó el fragmento PaeI-FseI así recuperado y se introdujo en *E. coli* DH5α.

20 Se seleccionaron clones que presentaban un inserto génico sin mutación debida a PCR a partir de los transformantes obtenidos, se digirió el ADN de plásmido con PaeI y FseI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se recuperaron 5.1 kpb del fragmento tratado con enzima que comprendía la región genómica en 5' del gen de BMP9 de ratón utilizando el kit de extracción en gel QIAquick.

1-4) Inserción del fragmento de región genómica en 3' del gen de BMP9 de ratón en vector de casete

25 Se digirió pBlueLAB-Lox-Neo-DT-A obtenido en el ejemplo 1-1 con ClaI y AseI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Después, se recuperó el fragmento de ADN utilizando el kit de extracción en gel QIAquick. Se insertó el fragmento tratado con enzima obtenido en el ejemplo 1-2 en aproximadamente 7.6 kpb del fragmento de ADN recuperado, que se introdujo en *E. coli* DH5α. Se seleccionaron los clones con fragmento de ADN insertado a partir del transformante obtenido. Se confirmó la secuencia de bases de la porción de ligación.

30 1-5) Inserción de fragmento de región genómica en 5' del gen de BMP9 de ratón en vector de casete que presenta un fragmento de región genómica en 3' del gen de BMP9 de ratón

35 Se digirió el plásmido obtenido en el ejemplo 1-4 con PaeI y FseI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Se recuperó el fragmento tratado con enzima utilizando el kit de extracción en gel QIAquick. Se insertó el fragmento tratado con enzima, preparado en el ejemplo 1-3, en 9.7 kpb del fragmento de ADN recuperado, que se introdujo en *E. coli* DH5α.

40 Se seleccionaron los clones con fragmento de ADN insertado, a partir de los transformantes obtenidos, y se confirmó la precisión de la secuencia de bases de la porción de ligación, para obtener pBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KO, que es un vector de direccionamiento para desactivación de gen de BMP9 de ratón (figura 1).

**[Ejemplo 2]**

Preparación de vector de direccionamiento de gen de BMP9 de ratón

45 Se digirieron 60 µg de pBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KO obtenido en el ejemplo 1-5, con NotI en un tampón H para enzima de restricción preparado a pH 7.0 (fabricado por Roche Diagnostics) que se añadió a una concentración final de 1 mmol/l de espermidina (fabricado por SIGMA).

50 Se extrajo el fragmento de vector de la mezcla de reacción utilizando fenol/cloroformo, seguido de precipitación en etanol. Se añadió una disolución de HBS a pH 7.05 [que contenía 5 g de HEPES, 8 g de NaCl, 0.37 g de KCl, 0.125 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, y 1 g de dextrosa(D-glucosa) por 1 litro] para preparar una disolución de ADN 0.5 µg/µl y se almacenó a temperatura ambiente durante 1 hora. De esta manera, se preparó el vector de direccionamiento de gen de BMP9 de ratón, pBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO- 5'KONotI para electroporación.

55 **[Ejemplo 3]**

Preparación de sonda para análisis por transferencia de tipo Southern del genoma

60 3-1) Preparación de sonda para región genómica en 5' del gen de BMP9 de ratón

Se diseñaron los cebadores (SEC ID n°: 9 y 10) con el fin de obtener una sonda que contenía aproximadamente 500 pb de la región genómica en 5' del gen de BMP9 de ratón, basándose en la información de secuencia de nucleótidos del clon de BAC RP23-181N8.

65 Se prepararon 50 µl de una mezcla de reacción añadiendo ADN derivado del clon de BAC RP23-181N8 como molde, 10 pmol de cada uno de los cebadores de SEC ID n°: 9 y 10, y Takara Z Taq (fabricado por Takara

Shuzo). Tras incubarse la mezcla de reacción a 94°C durante 2 minutos, se llevaron a cabo 25 ciclos de PCR que consistían en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 20 segundos y 72°C durante 1 minuto. Se sometió el fragmento de PCR amplificado a electroforesis en gel de agarosa y se recuperaron aproximadamente 500 pb de una sonda (sonda 5'KO) para análisis por transferencia de tipo Southern de la región genómica en 5' utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por Qiagen).

### 3-2) Preparación de sonda para región genómica en 3' del gen de BMP9 de ratón

Se diseñaron los cebadores (SEC ID n°: 11 y 12) con el fin de obtener una sonda que contenía aproximadamente 500 pb de la región genómica en 3' del gen de BMP9 de ratón, basándose en la información de secuencia de nucleótidos del clon de BAC RP23-181N8.

Se prepararon 50 µl de una mezcla de reacción añadiendo ADN derivado del clon de BAC RP23-181N8 como molde, 10 pmol de cada uno de los cebadores de SEC ID n°: 11 y 12, y Takara Z Taq (fabricado por Takara Shuzo). Tras incubarse la mezcla de reacción a 94°C durante 2 minutos, se llevaron a cabo 25 ciclos de PCR que consistían en 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 20 segundos, y 72°C durante 1 minuto. Se sometió el fragmento de PCR amplificado a electroforesis en gel de agarosa y se recuperaron aproximadamente 500 pb de una sonda (sonda 3'KO) para análisis por transferencia de tipo Southern de la región genómica en 3' utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por Qiagen).

### **[Ejemplo 4]**

#### Adquisición de estirpe celular ES deficiente para BMP9 de ratón

Para obtener células ES deficientes para BMP9 de ratón mediante recombinación homóloga, se introdujo pBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KONotI preparado en el ejemplo 2 en células ES de ratón TT2 (Yagi *et al.*, Analytical Biochem., 214:70, 1993), según el método establecido (Shinichi Aizawa, Gene Targeting, en Bio-Manual Series 8, YODOSHA CO., LTD., 1995). A continuación se facilitará una descripción detallada del método.

Se cultivaron células TT2 en condiciones de 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% utilizando, como célula alimentadora, la célula cultivada primaria resistente a G418 (fabricada por Invitrogen), que se trató con mitomicina C (fabricada por SIGMA). Se trataron las células TT2 con tripsina y se suspendieron en la disolución de HBS descrita en el ejemplo 2, a una densidad de 3x10<sup>7</sup> células/ml. Después de eso, se mezclaron 0.5 ml de la suspensión de células con 10 µg de pBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KO-NotI, se colocaron en una cubeta Gene Pulser (distancia entre electrodos: 0.4 cm; fabricado por Bio-Rad) y se sometió a electroporación (capacidad: 960 µF, tensión: 240 V, temperatura ambiente).

Tras la electroporación, se suspendieron las células en 10 ml de medio ES [que contenía 180 ml de suero bovino fetal (FBS), 3.5 g de D-glucosa, 10 g de medio de Eagle modificado por Dulbecco en polvo (fabricado por Invitrogen), 10 ml de disolución de aminoácidos no esenciales (concentrado 100 veces; fabricado por Invitrogen), y 1.9 g de hidrogenocarbonato de sodio por 1 litro] y se sembraron en una placa Petri de cultivo tisular de plástico de 100 mm (fabricado por Falcon) que presentaba células alimentadoras anteriormente sembradas en la misma. Tras 24 horas, se substituyó el medio por medio ES reciente que contenía neomicina 200 µg/ml (fabricada por Sigma). Se recogieron las colonias generadas tras 7 días y se transfirieron individualmente a placas de 24 pocillos.

Tras hacerse crecer las células hasta estado de confluencia, se sembró un tercio de las células en una placa recubierta con gelatina de 12 pocillos y se cultivaron durante 2 días. A partir de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> células, se preparó ADN genómico utilizando kits de aislamiento de ADN Puregene (fabricados por Gentra System). Se digirió el ADN genómico de las células TT2 resistentes a neomicina con la enzima de restricción EcoRI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Después de eso, se realizó la transferencia de tipo Southern utilizando la sonda 3'KO obtenida en el ejemplo 3-2. En la célula TT2 de tipo natural, se detectó una única banda (aproximadamente 15.5 kpb). En el recombinante homólogo, se detectaron dos bandas (aproximadamente 11.5 kpb y aproximadamente 15.5 kpb).

Se digirió adicionalmente el ADN genómico de clones, que se confirmó que eran recombinantes homólogos, con NcoI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. Después de eso, se realizó un análisis de tipo Southern utilizando la sonda 5'KO obtenida en el ejemplo 3-1. En la célula TT2 de tipo natural, se detectó una única banda (aproximadamente 13.4 kpb). En el recombinante homólogo, se detectaron dos bandas (aproximadamente 8.5 kpb y aproximadamente 13.4 kpb).

Como resultado, se detectaron 7 recombinantes homólogos que se espera que presenten la desactivación del gen de BMP9 de ratón. Después de eso, se realizó el cariotipado de los recombinantes homólogos, según el método tal como se describe en Bio-Manual Series 8, Gene Targeting (de Shinichi Aizawa, YODOSHA CO., LTD., 1995). Como resultado, se confirmó que 5 de los 7 eran células ES deficientes para gen de BMP9 de ratón que presentaban un cariotipo normal.

**[Ejemplo 5]**Preparación de ratón heterocigótico deficiente para BMP9

Las células ES obtenidas en el ejemplo 4 son células TT2 derivadas de ratón CBA3C57BL/6 F1 con pelo marrón oscuro (Yagi *et al.*, Analytical Biochemistry, 214: 70-76, 1993). En la presente memoria, simplemente para distinguir un ratón quimérico que presenta un gen derivado de células ES y un ratón huésped que no presenta ningún gen derivado de células ES, se seleccionó ratón ICR con pelo blanco como ratón huésped.

En primer lugar, 4 de las estirpes celulares ES deficientes para gen de BMP9 de ratón que se confirmó que presentaban un cariotipo normal en el ejemplo 4 se inyectaron a 8 embriones en estadio celular recogidos de ratones ICR hembra apareadas con machos ICR a una densidad de 8 a 10 células por embrión, respectivamente. Después de eso, se incubaron los embriones en medios ES durante la noche para desarrollar los embriones inyectados para dar blastocistos. Aproximadamente 10 embriones con inyección que se desarrollaron para dar blastocistos se trasplantaron en cada uno de los dos úteros de ratón ICR sustitutos (CLEA Japan) 2.5 días tras el tratamiento de pseudoembarazo.

Cuando se trasplantaron en total 260 embriones con inyección que se desarrollaron para dar blastocistos, nacieron 102 crías de ratones quiméricos. 89 de las 102 crías nacidas eran ratones quiméricos con el pelo marrón oscuro, en los que se observó la contribución de células ES. 40 de las 89 crías eran ratones quiméricos derivados de células ES con una alta tasa quimérica que tenían el pelo marrón oscuro y no tenían nada de pelo blanco.

Después de eso, cuando se cruzaron ratones quiméricos macho, con una alta tasa quimérica, con C57BL/6 hembra, nacieron crías de ratones con pelo marrón oscuro, indicando la transferencia del genoma de célula ES al linaje de células reproductoras.

Se realizó el examen del ratón heterocigótico con direccionamiento de gen de BMP9 mediante PCR utilizando ADN de la biopsia de cola de ratón como molde. Para ello, se prepararon mBMP9\_FW5915 (SEC ID n°: 13) y mBMP9\_RV17165 (SEC ID n°: 14), que son los cebadores específicos para la región de gen de resistencia a neomicina en el vector para desactivación de gen de BMP9 de ratón, pBluemBmp9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KO preparado en el ejemplo 1.

Se obtuvieron colas de ratones a las 3 semanas o más tras el nacimiento (editado por Motoya Katsuki, A Laboratory Manual of Embryological Engineering, Kodansha Scientific, 1987) y se extrajeron ADN genómicos utilizando un kit de aislamiento de ADN Puregene. Se prepararon 50 µl de una mezcla de reacción utilizando el ADN genómico como molde y 10 pmol de cada uno de los cebadores de SEC ID n°: 13 y 14, y EX Taq (fabricado por TAKARA SHUZO), y se llevaron a cabo 35 ciclos de PCR que consistían en 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos.

El resultado de electroforesis en gel de agarosa mostró que se detectaron aproximadamente 1.3 kpb del producto de PCR en una pluralidad de individuos. Este resultado indica que se obtuvo una pluralidad de ratones heterocigóticos [BMP9KO(+/-)], en los que se produjo recombinación homóloga de gen de BMP9 endógeno y se insertó el gen de resistencia a neomicina.

**[Ejemplo 6]**Preparación de ratón homocigótico deficiente para BMP9

Se aparearon ratones BMP9KO(+/-) hembras y machos, preparados en el ejemplo 5, para obtener crías. De la misma manera que en el ejemplo 5, se extrajo ADN genómico de la cola de ratón utilizando el kit de aislamiento de ADN Puregene. Se llevó a cabo PCR de la misma manera que en el ejemplo 5, utilizando este ADN genómico como molde. Además, se llevó a cabo electroforesis en agarosa para seleccionar ratones heterocigóticos [BMP9KO(+/-)] y homocigóticos [BMP9KO(-/-)] deficientes para BMP9.

Se prepararon 50 µl de una mezcla de reacción utilizando los ADN genómicos de los individuos seleccionados como molde y 10 pmol de cada uno de los cebadores de SEC ID n°: 15 y 16, y EX Taq (fabricado por TAKARA SHUZO), y se llevaron a cabo 35 ciclos de PCR que consistían en 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. El resultado de electroforesis en gel de agarosa mostró que había individuos con detección de aproximadamente 200 pb de producto de PCR e individuos sin detección.

Se detectaron aproximadamente 200 pb de producto de PCR en BMP9KO(+/-) que presentaban el alelo de tipo natural, pero no en BMP9KO(-/-). Por tanto, el resultado indica la adquisición de BMP9KO(-/-). Se utilizaron 10 ratones hembra de los ratones [BMP9KO(-/-)] homocigóticos hembra y macho para la adquisición de anticuerpo monoclonal anti-BMP9.

**[Ejemplo 7]**Preparación de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 humana

5

7-1) Preparación de inmunógeno

Se preparó la proteína recombinante BMP9 humana utilizada como inmunógeno, según el método descrito en el ejemplo 12 del documento WO 2010/126169.

10

7-2) Inmunización de animal y preparación de célula productora de anticuerpo

Se inmunizaron los ratones BMP9 KO(-/-), obtenidos en el ejemplo 6, con la proteína recombinante BMP9 humana preparada en el ejemplo 7-1 utilizando adyuvante RIBI (fabricado por Corixa) o Titer Max Gold (fabricado por Titermax) como adyuvante. En detalle, se preparó una suspensión de la proteína recombinante BMP9 humana, según el documento adjunto de adyuvante RIBI, y se administró a ratones KO mediante inyección intraperitoneal de modo que se administraron 25 µg de la proteína recombinante BMP9 humana por ratón.

15

En el caso de utilizar Titer Max Gold, también se preparó una suspensión de la proteína recombinante BMP9 humana, según el documento adjunto, y se administró a ratones KO mediante inyección subcutánea, de modo que se administraron 25 µg de la proteína recombinante BMP9 humana por ratón. Se realizó la inmunización tres veces en total, incluyendo el refuerzo final. 3 días tras la administración final, se escindieron los bazos.

20

Se trituraron los bazos escindidos en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y después se recogieron esplenocitos mediante centrifugación (1500 rpm, 3 minutos). Dado que había eritrocitos incluidos en los esplenocitos así obtenidos, se trataron los esplenocitos con tampón de lisado de glóbulos rojos (fabricado por SIGMA) en hielo, para retirar los eritrocitos. Se lavaron los esplenocitos así obtenidos con DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco; Invitrogen) dos veces y se proporcionaron para fusión celular.

25

7-3) Preparación de células de mieloma de ratón

Se cultivó la estirpe celular de mieloma de ratón (Sp2/0, ATCC: CRL1581) en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% y se utilizó como cepa parental para la fusión celular.

30

7-4) Preparación de hibridoma

Se mezclaron los esplenocitos de ratón obtenidos en el ejemplo 7-2 y las células de mieloma obtenidas en el ejemplo 7-3 a una razón de 5:1, seguido de centrifugación (1500 rpm, 3 minutos). Se añadió lentamente 1 ml de polietilenglicol 1500 (fabricado por Roche Diagnostics) a la fracción precipitada (grupos de células) así obtenida, mientras se agitaba suavemente la disolución. Después de eso, se añadieron 5 ml de DMEM a la disolución de células mientras se agitaba suavemente la disolución. Se añadieron adicionalmente 10 ml de medio DMEM a la misma. Después de eso, se incubó el tubo que contenía la disolución de células a 37°C durante 5 minutos, seguido de centrifugación (1500 rpm, 3 minutos).

40

Se suspendió la fracción precipitada (grupos de células) así obtenida en un medio completo (medio DMEM que contenía FCS al 10% v/v, 50 µmol/l de β-mercaptoetanol, 50 µg/ml de insulina y 10 ng/ml de IL-6] a una densidad de  $1 \times 10^6$  esplenocitos/ml, y se sembraron 100 µl de la misma en una placa de 96 pocillos.

45

Tras 1.5 horas, se añadieron 100 µl del medio completo, que contenía complemento de medios HAT (fabricado por SIGMA, nº de cat. H0262-10VL) a una concentración dos veces mayor que la concentración final recomendada por el fabricante, a cada pocillo, seguido de incubación en las condiciones de 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizó la sustitución de medio utilizando el medio completo, que contenía complemento de medios HAT a la concentración final recomendada por el fabricante, tres veces por semana, hasta que el número de células en el pocillo se volvió adecuado para el examen.

50

55

7-5) Construcción de ELISA de tipo sándwich de ALK1/BMP9

Se construyó un ELISA de tipo sándwich de ALK1/BMP9 utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-BMP9 humana (fabricada por R&D Systems, clon nº 360107, denominado a continuación en la presente memoria anticuerpo de R&D), y una proteína de fusión (hsALK1-Fc) de dominio extracelular de ALK1 humana conocido como receptor tipo I de BMP9 humana y región Fc de IgG1 humana, de la siguiente manera.

60

En primer lugar, se añadieron 0.05 µg/ml de hsALK1-Fc, preparado según el método descrito en el ejemplo 1 del documento WO 2010/126169 en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol/l (fabricado por Wako, nº de cat. 191-01305), a una placa de 96 pocillos para ELISA (F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE, fabricada por Thermo Fisher Scientific, nº de cat. 439454) en una cantidad de 100 µl/pocillo y se dejó a 4°C durante la noche para la

65

adsorción.

Tras la retirada del reactivo en fase sólida, se añadieron 250 µl/pocillo de SuperBlock (fabricado por Thermo SCIENTIFIC, nº de cat. 37535) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo, y se llevó a cabo el lavado utilizando PBS que contenía Tween-20 al 0.1% (PBS-T), tres veces.

Después de eso, 1 ng/ml de proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana (fabricada por R&D, nº de cat. 3209- BP) en SuperBlock al 10% en PBS-T, que se preparó mezclando SuperBlock y PBS-T a una razón de 1:9, se tomó como alícuota en una cantidad de 100 µl/pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de lavado utilizando PBS-T, cuatro veces.

Después de eso, se preparó anticuerpo de R&D marcado con biotina utilizando un kit de marcaje con biotina cromóforo SureLINK (fabricado por KPL) a una concentración de 30 ng/ml utilizando SuperBlock al 10% en PBS-T, y se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo del mismo y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T cuatro veces, y después se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de Streptavidin-polyHRP80 (fabricado por Stereospecific Detection Technologies, nº de cat. SP80D50) que era una dilución de 500 veces en SuperBlock al 10% en PBS-T y se dejó a temperatura ambiente durante de 30 minutos a 1 hora.

Se lavó la placa con PBS-T cuatro veces y se añadieron 100 µl/pocillo de un reactivo cromógeno de TMB (TMB+ Substrate-Chromogen, fabricado por Dako, nº de cat. S1599) para el desarrollo de color. Cuando se desarrolló un color apropiado, se añadieron 100 µl/pocillo de la disolución de ácido sulfúrico 1 N (fabricada por Wako, nº de cat. 192-04755), y se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un dispositivo ARVO (fabricado por PerkinElmer).

#### 7-6) Examen de hibridoma productor de anticuerpo anti-BMP9 humana utilizando ELISA de tipo sándwich de ALK1/BMP9

Cuando se añadió la proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana al ELISA de tipo sándwich construido en el ejemplo 7-5, se tomó como alícuota una disolución de SuperBlock al 10% en PBS-T que se preparó para contener 1 ng/ml de proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana, y sobrenadante de cultivo de hibridoma al 50% preparado en el ejemplo 7-4, en una cantidad de 100 µl/pocillo.

Se utilizó un medio para hibridoma como control negativo. Se consideró que los pocillos cuya coloración se suprimió en comparación con los pocillos a los que se añadió el medio para hibridoma como positivos, y se seleccionaron los hibridomas que produjeron anticuerpos que inhibían la interacción de hsALK1-Fc y proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana, o la interacción de proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana y anticuerpo de R&D.

Se realizó la dilución limitante de los hibridomas seleccionados utilizando el medio completo que contenía HT (fabricado por SIGMA, nº de cat. H0137-10VL) y se sembraron los hibridomas en una placa de 96 pocillos para clonación. Los hibridomas derivados del pocillo que se determinó como positivo en la primera ronda se sometieron a clonación tres veces en total. Mediante la manipulación anterior, se aislaron hibridomas que producían anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 y anticuerpo 3B7-3-3.

#### 7-7) Adaptación de hibridoma a medio eRDF

Para obtener una gran cantidad de anticuerpos, el medio completo para hibridomas se sustituyó en serie por medio eRDF [medio e-RDF (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd) que contenía el 1% v/v de Ultra-Low IgG FBS (fabricado por GIBCO), 5 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de insulina, 10 µmol/l de etanolamina, y 25 nmol/l de selenito de sodio], y se realizó la adaptación de células de hibridoma a medio eRDF.

#### 7-8) Producción en masa de anticuerpo a partir de hibridoma

Se sembraron los hibridomas adaptados en el ejemplo 7-8 en 100 frascos rotativos (850 cm<sup>2</sup>, fabricados por BD Biosciences) a una densidad de 1 a 2x10<sup>5</sup> células/ml. Se utilizó medio eRDF como medio. Se incubaron los frascos rotativos con agitación, utilizando un incubador rotatorio para frascos rotativos a 37°C durante 6-8 días, y después se recuperó el medio que contenía células. Se centrifugó el medio recuperado, y se filtró el sobrenadante de cultivo resultante utilizando un filtro de 0.22 µm.

Se purificaron anticuerpos anti-BMP9 humana a partir del sobrenadante de cultivo filtrado utilizando una columna abierta empaquetada con Sepharose 4 Fast Flow para proteínas (fabricada por GE Healthcare). Se esterilizaron los anticuerpos así obtenidos, utilizando un filtro de 0.22 µm, y se proporcionaron para la prueba *in vivo*.

**[Ejemplo 8]**Evaluación de la especificidad de anticuerpos obtenidos mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando antígeno inmovilizado

5 Para examinar la especificidad de los anticuerpos obtenidos frente a BMP9 humana, se sometió a prueba su capacidad de unión a BMP9 humana y a BMP10 humana que presenta la homología más alta con respecto a BMP9 humana mediante comparación. En primer lugar, se añadieron 100 ng/ml de proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana (fabricada por R&D Systems, nº de cat. 3209-BP) o proteína recombinante BMP10 de dímero maduro humana (fabricada por R&D Systems, nº de cat. 2926-BP), preparadas en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 10

15 Tras la retirada del reactivo para inmovilización, se añadieron 200 µl/pocillo de SuperBlock (fabricado por Thermo SCIENTIFIC, nº de cat. 37535), se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo, y se llevó a cabo el lavado utilizando TBST (solución salina tamponada con Tris con Tween 20; fabricada por SANTA CRUZ, SC-24953) tres veces.

20 Después de eso, se prepararon anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3, anticuerpo 3B7-3-3, anticuerpo de R&D o anticuerpo anti-BMP10 (fabricado por R&D, nº de cat. MAB2926) que se marcó con biotina, utilizando un kit de marcaje con biotina NH2 (fabricado por COSMO BIO, nº de cat. LK03), a una concentración de 100 ng/ml utilizando Super Block al 10% en TBST, que se preparó mezclando SuperBlock y TBST a una razón de 1:9. Se tomaron como alícuota 50 µl/pocillo del mismo como un anticuerpo primario y se dejó a temperatura ambiente

25 durante 1 hora.

30 Se lavó la placa con TBST tres veces y después se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de Streptavidin-polyHRP80 (fabricado por Stereospecific Detection Technologies, nº de cat. SP80D50), que era una dilución de 500 veces en Super Block al 10% en TBST, y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora.

35 Se lavó la placa con TBST cinco veces y se añadieron 50 µl/pocillo del reactivo de sustrato de TMB (TMB+ Substrate-Chromogen, fabricado por Dako, nº de cat. S1599) para el desarrollo de color. Cuando se desarrolló un color apropiado, se añadieron 50 µl/pocillo de la disolución de ácido sulfúrico 1 N (fabricada por Wako, nº de cat. 192-04755) y se determinó la absorbancia (450 nm – 570 nm) a una longitud de onda de muestra de 450 nm y a una longitud de onda de referencia de 570 nm utilizando un lector de placas (fabricado por Spectra Max, Molecular Devices).

40 Los resultados se muestran en la figura 2. Tal como se muestra en la figura 2, el anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 y anticuerpo 3B7-3-3 mostraron una fuerte unión a BMP9 humana y ninguna unión a BMP10 humana, como anticuerpo de R&D, lo que indica que el anticuerpo 6D10-1-1, el anticuerpo 10D5-2-3 y el anticuerpo 3B7-3-3 son anticuerpos que se unen específicamente a BMP9 humana.

**[Ejemplo 9]**Evaluación de la propiedad de unión de anticuerpos obtenidos a proteína recombinante BMP9 humana

45 Para determinar la actividad de unión del anticuerpo anti-BMP9 humana obtenido a BMP9 humana, se realizó el siguiente experimento.

50 En primer lugar, se añadieron 100 ng/ml de proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana (fabricada por R&D Systems, nº de cat. 3209- BP), preparada en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol/l, a una placa de 96 pocillos para ELISA (F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE, fabricada por Thermo Fisher Scientific, nº de cat. 439454) en una cantidad de 50 µl/pocillo y se dejó a 4°C durante la noche para la adsorción.

55 Tras la retirada del reactivo para inmovilización, se añadieron 200 µl/pocillo de SuperBlock (fabricado por Thermo SCIENTIFIC, nº de cat. 37535), se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo y se llevó a cabo el lavado utilizando TBST tres veces. Después de eso, se preparó anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3, anticuerpo 3B7-3-3 o anticuerpo de R&D, marcados con biotina, a una concentración de 1, 5, 20, 100 ó 300 ng/ml utilizando Super Block al 10% en TBST. Se tomaron como alícuota 50 µl/pocillo de cada uno de los

60 mismos y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora.

65 Se lavó la placa con TBST tres veces y después se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de Streptavidin-polyHRP80, que era una dilución de 500 veces en Super Block al 10% en TBST, y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora.

Se lavó la placa con TBST cinco veces y se añadieron 50 µl/pocillo del reactivo de sustrato de TMB (TMB+

5 Sustrate-Chromogen, fabricado por Dako, nº de cat. S1599) para el desarrollo de color. Cuando se desarrolló un color apropiado, se añadieron 50 µl/pocillo de la disolución de ácido sulfúrico 1 N (fabricada por Wako, nº de cat. 192-04755) y se determinó la absorbancia (450 nm – 570 nm) a una longitud de onda de muestra de 450 nm y a una longitud de onda de referencia de 570 nm, utilizando un lector de placas (fabricado por Spectra Max, Molecular Devices).

10 Los resultados se muestran en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, el anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 y anticuerpo 3B7-3-3 se unieron a BMP9 humana a medida que aumentó la concentración de anticuerpo, al igual que el anticuerpo de R&D. También se reveló que la actividad de unión del anticuerpo 6D10-1-1 y del anticuerpo 10D5-2-3 a BMP9 humana era mayor que la del anticuerpo de R&D.

### [Ejemplo 10]

#### Efecto del anticuerpo obtenido sobre la unión de BMP9 humana y anticuerpo de R&D

15 Basándose en las características del sistema utilizado en el ejemplo 7, se considera que los anticuerpos obtenidos inhiben una cualquiera de la interacción de hsALK1-Fc y proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana o la interacción de proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana y anticuerpo de R&D. Por tanto, en primer lugar se construyó un sistema de ensayo de unión de BMP9 humana y anticuerpo de R&D.

20 Se añadieron 100 ng/ml de la proteína recombinante BMP9 humana del ejemplo 7-1, preparada en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol/l, a una placa de 96 pocillos para ELISA (F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE, fabricada por Thermo Fisher Scientific, nº de cat. 439454) en una cantidad de 100 µl/pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para la adsorción. Tras la retirada del reactivo para inmovilización, se añadieron 250 µl/pocillo de Super Block, se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo y se llevó a cabo el lavado utilizando PBS-T tres veces.

25 Después de eso, se prepararon de 100 a 3000 ng/ml del anticuerpo obtenido y 50 ng/ml de anticuerpo de R&D marcado con biotina, utilizando Super Block al 10% en PBS-T. Se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de cada uno de los mismos y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T cuatro veces y después se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de Streptavidin-polyHRP80 (fabricado por Stereospecific Detection Technologies, nº de cat. SP80D50), que era una dilución de 500 veces en Super Block al 10% en PBS-T, y se dejó a temperatura ambiente durante de 30 minutos a 1 hora.

30 Se lavó la placa con PBS-T cuatro veces y se añadieron 100 µl/pocillo del reactivo cromógeno de TMB (TMB+ Sustrate-Chromogen, fabricado por Dako, nº de cat. S1599) para el desarrollo de color. Cuando se desarrolló un color apropiado, se añadieron 100 µl/pocillo de la disolución de ácido sulfúrico 1 N (fabricada por Wako, nº de cat. 192-04755) y se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un dispositivo ARVO (fabricado por PerkinElmer). Los resultados se muestran en la figura 4.

35 Tal como se muestra en la figura 4, la unión de BMP9 humana y anticuerpo de R&D marcado con biotina se inhibió mediante adición de anticuerpo de R&D no marcado y también mediante adición de anticuerpo 10D5-2-3 o anticuerpo 6D10-1-1. Mientras tanto, no se observó la inhibición mediante adición de anticuerpo 3B7-3-3.

40 Estos resultados indican que los sitios de reconocimiento de BMP9 humana (epítomos) del anticuerpo 10D5-2-3 y del anticuerpo 6D10-1-1 son idénticos o próximos al del anticuerpo de R&D, pero el sitio de reconocimiento de BMP9 humana (epítomos) del anticuerpo 3B7-3-3 es diferente al del anticuerpo de R&D.

45 Dado que mostraron actividad inhibitora a una concentración inferior a la del anticuerpo de R&D, las actividades de unión (afinidad) del anticuerpo 10D5-2-3 y el anticuerpo 6D10-1-1 a BMP9 humana son superiores a la del anticuerpo de R&D.

### [Ejemplo 11]

#### Efecto de los anticuerpos obtenidos sobre la unión de BMP9 humana y ALK1 humana

50 Después de eso, se construyó un sistema de ensayo de unión de BMP9 humana y ALK1 humana. Se añadieron 100 ng/ml de la proteína recombinante BMP9 humana del ejemplo 7-1, preparada en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol/l, a una placa de 96 pocillos para ELISA (F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE, fabricada por Thermo Fisher Scientific, nº de cat. 439454) en una cantidad de 100 µl/pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para la adsorción.

55 Tras la retirada del reactivo para inmovilización, se añadieron 250 µl/pocillo de Super Block, se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo y se llevó a cabo el lavado utilizando PBS-T tres veces. Después de eso, se prepararon 100, 1000 o 10000 ng/ml del anticuerpo obtenido o anticuerpo de R&D, y

100 ng/ml de la proteína hsALK1-Fc marcada con biotina utilizando Super Block al 10% en PBS-T. Se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de cada uno de los mismos y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora.

5 Se lavó la placa con PBS-T cuatro veces y después se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de Streptavidin-polyHRP80 (fabricado por Stereospecific Detection Technologies, nº de cat. SP80D50), que era una dilución de 500 veces en Super Block al 10% en PBS-T, y se dejó a temperatura ambiente durante de 30 minutos a 1 hora.

10 Se lavó la placa con PBS-T cuatro veces, y se añadieron 100 µl/pocillo del reactivo cromógeno de TMB (TMB+ Substrate-Chromogen, fabricado por Dako, nº de cat. S1599) para el desarrollo de color. Cuando se desarrolló un color apropiado, se añadieron 100 µl/pocillo de la disolución de ácido sulfúrico 1 N (fabricada por Wako, nº de cat. 192-04755) y se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un dispositivo ARVO (fabricado por PerkinElmer).

15 Mostraron 100, 1000 o 10000 ng/ml de anticuerpo 3B7-3-3 una inhibición del 10.3%, del 29.2% o del 64% sobre la unión de BMP9 humana y ALK1 humana, respectivamente. No se observó la inhibición, aunque se añadieron anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 y anticuerpo de R&D a la dosis máxima de 10000 ng/ml.

20 Estos resultados revelaron que el anticuerpo 3B7-3-3 es un anticuerpo anti-BMP9 que inhibe la unión de BMP9 humana y ALK1 humana, mientras que el anticuerpo 6D10-1-1, el anticuerpo 10D5-2-3 o el anticuerpo de R&D son un anticuerpo anti-BMP9 que no inhibe la unión de BMP9 humana y ALK1 humana.

### [Ejemplo 12]

#### Efecto del anticuerpo obtenido sobre la unión de BMP9 humana y BMPRII humano

25 Es conocido que el receptor de BMP9 consiste en receptor tipo I de BMP y receptor tipo II de BMP, y que BMP9 se une a ambos tipos del receptor. El ejemplo 11 reveló que el anticuerpo 10D5-2-3, el anticuerpo 6D10-1-1 y el anticuerpo de R&D no inhiben la unión de BMP9 humana y ALK1 humana, lo que sugiere que estos anticuerpos no inhiben la unión de BMP9 y receptor tipo I de BMP.

30 A continuación para examinar si estos anticuerpos inhiben la unión de BMP9 y receptor tipo II de BMP, se construyó un sistema de ensayo de unión de BMP9 humana y BMPRII humano que se conoce como un Receptor tipo II de BMP9 humana.

35 Se añadieron 3 µg/ml de la proteína recombinante BMP9 humana del ejemplo 7-1, preparada en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol/l, a una placa de 96 pocillos para ELISA (F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE, fabricada por Thermo Fisher Scientific, nº de cat. 439454) en una cantidad de 100 µl/pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para la adsorción. Tras la retirada del reactivo para inmovilización, se añadieron 260 µl/pocillo de Super Block, se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo, y se llevó a cabo el lavado utilizando TBST cuatro veces.

45 A continuación, se prepararon 1000 ng/ml de los anticuerpos obtenidos, anticuerpo de R&D o un anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón de control negativo (fabricado por DAKO, X0931) y 3 µg/ml de BMPRII-Fc (proteína recombinante de fusión de dominio extracelular de BMPRII humano y región de IgGIFc humana, fabricada por R&D Systems), utilizando Block al 10% en TBST. Se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de cada uno de los mismos y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora.

50 Se lavó la placa con TBST cuatro veces, y después se tomaron como alícuota 100 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG humana con HRP (fabricado por Thermo Scientific), que era una dilución de 20000 veces en SuperBlock al 10% en TBST, y se dejó a temperatura ambiente durante de 30 minutos a 1 hora.

55 Se lavó la placa con TBST cuatro veces, y se añadieron 100 µl/pocillo del reactivo cromógeno de TMB (TMB+ Substrate-Chromogen, fabricado por Dako, nº de cat. S1599) para el desarrollo de color. Cuando se desarrolló un color apropiado, se añadieron 100 µl/pocillo de la disolución de ácido sulfúrico 1 N (fabricada por Wako, nº de cat. 192-04755) y se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un dispositivo Multiskan Ascent (fabricado por Thermo Labsystems). Los resultados se muestran en la figura 5.

60 Tal como se muestra en la figura 5, la unión de BMP9 humana y BMPRII humano se inhibió mediante anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 y anticuerpo de R&D, lo que indica que estos anticuerpos son anticuerpos anti-BMP9 humana que inhiben la unión de BMP9 y receptor BMPRII.

### [Ejemplo 13]

#### Actividad de unión de anticuerpos obtenidos a proteína recombinante BMP9 humana (análisis Biacore)

65 Se examinó la actividad de unión (afinidad) de los anticuerpos obtenidos a proteína recombinante BMP9 humana

utilizando un dispositivo BIAcore 2000 (fabricado por GE Healthcare). Tras inmovilizarse anticuerpo anti-IgG de ratón sobre un chip sensor CM5 utilizando un kit de captura de anticuerpo de ratón (fabricado por GE Healthcare), se acopló anticuerpo anti-BMP9 humana a un valor de UR de 700-1100.

5 A continuación, se prepararon 0.152 nmol/l, 0.457 nmol/l, 1.37 nmol/l, 4.1 nmol/l, 12.3 nmol/l, 36.89 nmol/l, 110.67 nmol/l y 322 nmol/l de la proteína recombinante BMP9 humana preparada en el ejemplo 7-1, utilizando una disolución de HBS-EP (fabricada por GE Healthcare) y se añadieron como analitos y se midió la afinidad de unión.

10 Basándose en los valores obtenidos, se calculó la constante de disociación (valor de Kd) mediante cinética de un único ciclo (software BIAevaluation ver. 3, fabricado por GE Healthcare). Los resultados se facilitan en la tabla 1.

[Tabla 1]

Nombre de anticuerpo	Kd (M)	Afinidad de unión relativa (con respecto al anticuerpo de R&D)
Anticuerpo de R&D	$6.16 \times 10^{-10}$	1 vez
Anticuerpo 6D10-1-1	$2.97 \times 10^{-11}$	20.7 veces
Anticuerpo 10D5-2-3	$9.69 \times 10^{-12}$	63.6 veces

15 Tal como se muestra en la tabla 1, el valor de Kd del anticuerpo de R&D era de  $6.16 \times 10^{-10}$  mol/l, mientras que los valores de Kd del anticuerpo 6D10-1-1 y del anticuerpo 10D5-2-3 eran de  $2.97 \times 10^{-11}$  mol/l y  $9.69 \times 10^{-12}$  mol/l, respectivamente. Las actividades de unión del anticuerpo 6D10-1-1 y del anticuerpo 10D5-2-3 a BMP9 humana mostraron ser de 20.7 veces y 63.6 veces, respectivamente, lo cual es notablemente superior a la del anticuerpo de R&D. Estos resultados son compatibles con los de los ejemplos 9 y 10.

#### [Ejemplo 14]

##### Actividad de anticuerpos obtenidos sobre la eritropoyesis en ratón Balb/c normal (administración a corto plazo)

25 Tal como se reveló en el ejemplo 9, el anticuerpo 6D10-1-1 y anticuerpo 10D5-2-3 son anticuerpos que se unen a dímero maduro de BMP9 humana. 106 aminoácidos de BMP9 de ratón y 104 aminoácidos de BMP9 de rata correspondían completamente con la región madura de BMP9 humana compuesta por 110 aminoácidos, representada por SEC ID n°: 67, lo que indica que BMP9 está muy altamente conservada entre especies. Por tanto, se deduce que estos anticuerpos se unen a BMP9 de roedor, al igual que a BMP9 humana.

30 Por tanto, se evaluó la actividad eritropoyética del anticuerpo 6D10-1-1 y el anticuerpo 10D5-2-3, utilizando ratón BALB/c. Se adquirieron ratones BALB/c macho de 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan Inc.) y se proporcionaron para el experimento. Se utilizó agua corriente estéril como agua potable y se proporcionó pienso sólido FR-2 (fabricado por Funabashi Farm) como dieta con acceso libre.

35 Tras la cría previa, se dividieron los ratones en 7 grupos (n=6 por grupo), basándose en el peso corporal, y se administró anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 o anticuerpo de R&D en una dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg mediante inyección subcutánea. En detalle, se preparó cada anticuerpo en una concentración de 0.1 mg/ml o 0.3 mg/ml, utilizando solución salina fisiológica, y se administraron cada uno en una dosis de 10 ml/kg. Al grupo de vehículo se le administró solución salina fisiológica en una dosis de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea.

40 El anticuerpo o vehículo se administró una vez por semana, en total dos veces. 2 semanas tras la primera administración, se realizó laparotomía con anestesia con isoflurano y se extrajo sangre de la vena poscava, se puso en un tubo que contenía EDTA y se utilizó como muestra de sangre.

45 Se determinaron el número de células sanguíneas y la concentración de hemoglobina en las muestras de sangre así obtenidas, utilizando un contador automatizado de células sanguíneas Celltac  $\alpha$  (fabricado por Nihon Kohden Corporation). Los resultados se muestran en las figuras 6A y 6B.

50 Tal como se muestra en las figuras 6A y 6B, el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina aumentaron mediante la administración de cualquiera de los anticuerpos anti-BMP9 humana, lo que indica que el anticuerpo anti-BMP9 humana presenta la actividad eritropoyética. Cuando se administró anticuerpo de R&D en una dosis de 1 mg/kg o 3 mg/kg, el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina aumentaron en un nivel similar, lo que indica que el anticuerpo de R&D muestra la máxima actividad a una dosis de 1 mg/kg o menos. Mientras tanto, cuando se administró el anticuerpo en la dosis de actividad máxima de 1 mg/kg, el aumento de la concentración de hemoglobina fue de aproximadamente 0.7 g/dl.

60 Mientras tanto, las actividades máximas del anticuerpo 6D10-1-1 y el anticuerpo 10D5-2-3 fueron aproximadamente 2 veces mayores que la del anticuerpo de R&D. En particular, el aumento de la concentración de hemoglobina fue de aproximadamente 1.5 a 2 g/dl. Estos resultados sugieren que el anticuerpo 6D10-1-1 y el

anticuerpo 10D5-2-3 son más excelentes en la actividad de unión a BMP9 y la actividad eritropoyética que el anticuerpo de R&D.

**[Ejemplo 15]**

5

Actividad del anticuerpo obtenido sobre la eritropoyesis en ratón BALB/c normal (administración a largo plazo)

10 Se evaluaron los efectos de administración a largo plazo de anticuerpo 6D10-1-1 y anticuerpo 10D5-2-3 sobre la eritropoyesis utilizando ratón BALB/c. Se adquirieron ratones BALB/c macho de 6 semanas de edad de Charles River Laboratories Japan Inc., y se proporcionaron para el experimento. Se utilizó agua corriente estéril como agua potable y se proporcionó pienso sólido FR-2 (fabricado por Funabashi Farm) como dieta con acceso libre.

15 Tras la cría previa, se dividieron los ratones en 3 grupos (n=8 por grupo), basándose en el peso corporal, y se permitió acceso libre a una dieta con alto contenido en grasa (HFD-32; fabricado por CLEA Japan). Después, se administró anticuerpo 6D10-1-1 o anticuerpo 10D5-2-3 en una dosis de 1 mg/kg mediante inyección subcutánea. En detalle, se preparó cada anticuerpo en una concentración de 0.1 mg/ml, utilizando solución salina fisiológica, y se administró cada uno en una dosis de 10 ml/kg. Al grupo de vehículo se le administró solución salina fisiológica en una dosis de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea.

20 El anticuerpo o vehículo se administró una vez por semana, en total 8 veces. 8 semanas tras la primera administración, se realizó laparotomía con anestesia con isoflurano y se extrajo sangre de la vena poscava, una parte de la misma se puso en un tubo que contenía EDTA y se utilizó como muestra de sangre. La muestra de sangre restante se utilizó como muestra de suero.

25 Se determinaron el número de células sanguíneas y la concentración de hemoglobina en las muestras de sangre así obtenidas, utilizando un contador automatizado de células sanguíneas Celltac  $\alpha$  (fabricado por Nihon Kohden Corporation). Los resultados se muestran en las figuras 7A y 7B.

30 Tal como se muestra en las figuras 7A y 7B, el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina aumentaron significativamente mediante la administración de anticuerpo 6D10-1-1 o anticuerpo 10D5-2-3, y el anticuerpo 6D10-1-1 y el anticuerpo 10D5-2-3 mostraron actividades eritropoyéticas persistentes mediante administración a largo plazo (durante dos meses), así como administración a corto plazo. Ninguno de los anticuerpos afectó al peso corporal.

35 A continuación, con el fin de examinar si la actividad eritropoyética del anticuerpo anti-BMP9 humana está o no mediada por la eritropoyetina en sangre (EPO) como factor estimulante de la eritropoyesis, se determinó la concentración de EPO en sangre en la muestra de suero, utilizando un kit de ELISA de eritropoyetina de ratón/rata Quantikine (fabricado por R&D Systems). Los resultados se muestran en la figura 8.

40 Tal como se muestra en la figura 8, la concentración de EPO en sangre tendió a disminuir mediante la administración de anticuerpo anti-BMP9 humana y no se observó ningún cambio significativo, lo que sugiere que la actividad eritropoyética del anticuerpo anti-BMP9 humana no está mediada por el aumento de la producción de EPO.

**[Ejemplo 16]**

Actividad del anticuerpo anti-BMP9 humana sobre la eritropoyesis en diferentes razas de ratón

50 Se evaluó la actividad eritropoyética de anticuerpo 10D5-2-3 utilizando ratones distintos de ratón BALB/c. Se utilizaron ratones CBA/J e ICR como ratones distintos de ratón BALB/c. Se adquirieron ratones macho de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories Japan Inc., y se proporcionaron para el experimento. Se utilizó agua corriente estéril como agua potable y se proporcionó pienso sólido FR-2 (fabricado por Funabashi Farm) como dieta con acceso libre.

55 Tras la cría previa, se dividieron los ratones en 2 grupos (n=6 por grupo), basándose en el peso corporal, y se administró anticuerpo 10D5-2-3 en una dosis de 1 mg/kg mediante inyección subcutánea. En detalle, se preparó anticuerpo 10D5-2-3 en una concentración de 0.1 mg/ml utilizando solución salina fisiológica, y se administró en una dosis de 10 ml/kg. Al grupo de vehículo se le administró solución salina fisiológica en una dosis de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea.

60

El anticuerpo o vehículo se administró una vez por semana, en total dos veces. 14 días tras la primera administración, se realizó laparotomía con anestesia con isoflurano y se extrajo sangre de la vena poscava, una parte de la misma se puso en un tubo que contenía EDTA y se utilizó como muestra de sangre. La muestra de sangre restante se utilizó como muestra de suero.

65

Se determinaron el número de células sanguíneas y la concentración de hemoglobina en las muestras de sangre

así obtenidas, utilizando el contador automatizado de células sanguíneas Celltac  $\alpha$  (fabricado por Nihon Kohden Corporation). Como resultado, con respecto a BALB/c, CBA/J e ICR, el grupo de vehículo mostró el número de eritrocitos ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ) de  $958 \pm 8.0$ ,  $789 \pm 25.3$  y  $717 \pm 22.9$  (media  $\pm$  error estándar), respectivamente, mientras que el grupo tratado con anticuerpo 10D5-2-3 mostró el número de eritrocitos ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ) de  $1028 \pm 18.1$ ,  $853 \pm 8.1$  y  $777 \pm 13.2$  (media  $\pm$  error estándar), respectivamente. El aumento del número de eritrocitos mediante tratamiento de anticuerpo 10D5-2-3 fue de 70, 64 y 60, respectivamente.

Con respecto a BALB/c, CBA/J e ICR, el grupo de vehículo mostró la concentración de hemoglobina (g/dl) de  $15.4 \pm 0.16$ ,  $12.9 \pm 0.13$  y  $13.1 \pm 0.50$  (media  $\pm$  error estándar), respectivamente, mientras que el grupo tratado con anticuerpo 10D5-2-3 mostró la concentración de hemoglobina (g/dl) de  $16.6 \pm 0.26$ ,  $13.6 \pm 0.13$  y  $13.7 \pm 0.25$  (media  $\pm$  error estándar), respectivamente. El aumento de la concentración de hemoglobina mediante tratamiento de anticuerpo 10D5-2-3 fue de 1.2, 0.7 y 0.6, respectivamente.

En todos los ratones, se reconoció que el anticuerpo 10D5-2-3 presentaba la actividad eritropoyética, lo que sugiere que el anticuerpo anti-BMP9 humana muestra la actividad eritropoyética independientemente de las razas de ratón.

Después de eso, con el fin de examinar si la actividad eritropoyética de anticuerpo 10D5-2-3 está o no mediada por un aumento de EPO, se determinó la concentración de EPO en sangre en la muestra de suero obtenida utilizando un kit de ELISA de eritropoyetina de ratón/rata Quantikine (fabricado por R&D Systems).

Con respecto a BALB/c, CBA/J e ICR, el grupo de vehículo mostró la concentración de EPO en sangre (pg/ml) de  $88.5 \pm 8.7$ ,  $181.2 \pm 28.5$  y  $291.5 \pm 106.4$  (media  $\pm$  error estándar), respectivamente, mientras que el grupo tratado con anticuerpo 10D5-2-3 mostró la concentración de EPO en sangre (pg/ml) de  $77.6 \pm 5.7$ ,  $126.1 \pm 20.1$  y  $236.2 \pm 46.1$  (media  $\pm$  error estándar), respectivamente. La disminución de la concentración de EPO en sangre mediante tratamiento de anticuerpo 10D5-2-3 fue de 10.9, 55.1 y 55.3, respectivamente.

Estos resultados sugieren que la actividad eritropoyética del anticuerpo 10D5-2-3 no está mediada por el aumento de la producción de EPO, lo cual concuerda con los resultados del ejemplo 15.

### [Ejemplo 17]

#### Actividad de los anticuerpos obtenidos sobre la eritropoyesis en rata normal

Se evaluaron las actividades eritropoyéticas del anticuerpo 6D10-1-1 y del anticuerpo 10D5-2-3 en ratas utilizando rata Wistar. Se adquirieron ratas Wistar macho de 5 semanas de edad (CLEA (Japan)) y se proporcionaron para el experimento. Se utilizó agua corriente estéril como agua potable y se proporcionó pienso sólido FR-2 (fabricado por Funabashi Farm) como dieta con acceso libre.

Tras la cría previa, se dividieron las ratas en 4 grupos ( $n=6$  por grupo), basándose en el peso corporal, y se administró anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 o anticuerpo de R&D, en una dosis de 1 mg/kg mediante inyección subcutánea. En detalle, se preparó cada anticuerpo en una concentración de 0.5 mg/ml, utilizando solución salina fisiológica, y se administró en una dosis de 2 ml/kg. Al grupo de vehículo se le administró solución salina fisiológica en una dosis de 2 mg/kg mediante inyección subcutánea.

El anticuerpo o vehículo se administró una vez por semana, en total dos veces. 2 semanas tras la primera administración, se realizó laparotomía con anestesia con isofurano y se extrajo sangre de la aorta abdominal, una parte de la misma se puso en un tubo que contenía EDTA y se utilizó como muestra de sangre. La muestra de sangre restante se utilizó como muestra de suero.

Se determinaron el número de células sanguíneas y la concentración de hemoglobina en las muestras de sangre así obtenidas, utilizando el contador automatizado de células sanguíneas Celltac  $\alpha$  (fabricado por Nihon Kohden Corporation). Los resultados se muestran en las figuras 9A y 9B.

Tal como se muestra en las figuras 9A y 9B, el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina aumentaron mediante la administración de cualquiera de los anticuerpos anti-BMP9 humana, lo que indica que el anticuerpo anti-BMP9 humana muestra la actividad eritropoyética en ratas al igual que en ratones. También se reconoció que el anticuerpo 6D10-1-1 y el anticuerpo 10D5-2-3 muestran una actividad eritropoyética más fuerte que el anticuerpo de R&D en ratas al igual que en ratones.

### [Ejemplo 18]

#### Actividad de anticuerpo contra BMP9 humana sobre anemia en rata con insuficiencia renal

Se evaluó la actividad del anticuerpo 6D10-1-1 y anticuerpo 10D5-2-3 sobre anemia renal, utilizando ratas Wistar con insuficiencia renal, que se habían sometido a 5/6 de nefrectomía. Se adquirieron ratas Wistar macho de 5

semanas de edad (CLEA (Japan)) y se proporcionaron para el experimento. Se utilizó agua corriente estéril como agua potable y se proporcionó pienso sólido FR-2 (fabricado por Funabashi Farm) como dieta con acceso libre.

5 Tras la cría previa, en primer lugar se expuso el riñón izquierdo mediante incisión dorsal izquierda con anestesia con pentobarbital y se escindieron 2/3 del riñón. Tras el cese de la hemorragia, se suturó el sitio de escisión. 1 semana después, se suturó el riñón derecho y se escindió mediante incisión dorsal derecha con anestesia con pentobarbital de la rata, para preparar ratas con 5/6 de nefrectomía. Un grupo de control normal se sometió únicamente a incisión y sutura como seudooperación.

10 Tras 2 semanas los 5/6 de nefrectomía, se extrajo sangre de la vena de la cola de cada rata sin anestésicar, y una parte de la misma se puso en un tubo que contenía EDTA y se utilizó como muestra de sangre. La muestra de sangre restante se utilizó como muestra de suero.

15 Se determinaron el número de células sanguíneas y la concentración de hemoglobina en las muestras de sangre así obtenidas, utilizando el contador automatizado de células sanguíneas Celltac  $\alpha$  (fabricado por Nihon Kohden Corporation).

20 Después de eso, se determinaron las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina, en las muestras de suero así obtenidas, utilizando un dispositivo HITACHI Auto Analyzer 7170 (fabricado por Hitachi).

25 Basándose en el número de eritrocitos, la concentración de hemoglobina, las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina, se dividieron las ratas en 3 grupos (n=8 por grupo), de modo que la diferencia en el valor medio entre los grupos fue lo más pequeña posible, y se administraron anticuerpo 6D10-1-1 o anticuerpo 10D5-2-3 en una dosis de 1 mg/kg mediante inyección subcutánea.

30 En detalle, se preparó cada anticuerpo en una concentración de 0.5 mg/ml, utilizando solución salina fisiológica, y se administró en una dosis de 2 ml/kg. Al grupo de vehículo se le administró solución salina fisiológica en una dosis de 2 ml/kg mediante inyección subcutánea. Como grupo de control normal, al grupo de seudooperación (n=5) se le administró el vehículo, solución salina fisiológica en una dosis de 2 ml/kg.

El anticuerpo o vehículo se administró una vez por semana. 2, 4, 6 y 8 semanas tras la primera administración, se extrajo sangre de la vena de la cola, y una parte de la misma se puso en un tubo que contenía EDTA y se utilizó como muestra de sangre. La muestra de sangre restante se utilizó como muestra de suero.

35 Se determinaron el número de células sanguíneas y la concentración de hemoglobina, en las muestras de sangre así obtenidas, utilizando el contador automatizado de células sanguíneas Celltac  $\alpha$  (fabricado por Nihon Kohden Corporation). Los resultados se muestran en las figuras 10A y 10B. Además, se utilizó la prueba de la t de Student para someter a prueba una diferencia estadísticamente significativa en los valores medidos entre ratas con 5/6 de nefrectomía, a las que se les administró el vehículo, y aquellas a las que se les administraron diversos anticuerpos. Se consideró que  $P < 0.05$  era significativo.

45 Tal como se muestra en las figuras 10A y 10B, el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina disminuyeron en las ratas con 5/6 de nefrectomía a las que se les administró el vehículo, en comparación con el grupo de seudooperación al que se le administró el vehículo, a lo largo de todo el periodo de experimento de desde 0 hasta 8 semanas. Desde 2 semanas hasta 8 semanas tras la administración de anticuerpo, el número de eritrocitos y la concentración de hemoglobina aumentaron significativamente en las ratas con 5/6 de nefrectomía a las que se les administró anticuerpo 6D10-1-1 o anticuerpo 10D5-2-3, excluyendo en la muestra a la que se le administró anticuerpo 610D-1-1 6 semanas tras la administración de anticuerpo, en comparación con las ratas con 5/6 de nefrectomía a las que se les administró el vehículo. Ninguno de los anticuerpos afectó al peso corporal.

50 Estos resultados revelaron que el anticuerpo 6D10-1-1 y el anticuerpo 10D5-2-3 presentan la actividad de mejorar la anemia renal.

## 55 [Ejemplo 19]

### Aislamiento de secuencias génicas que codifican para VH y VL de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 humana

#### 60 19-1) Preparación de ARN totales a partir de células de hibridoma productoras de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 humana

Se prepararon ARN totales a partir de  $1 \times 10^6$  hibridomas que producían anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 y anticuerpo 3B7-3-3, descritos en el ejemplo 7, utilizando un kit RNAeasy Mini (fabricado por QIAGEN, nº de cat. 74104) y un dispositivo QIAshredder (fabricado por QIAGEN, nº de cat. 79654).

65

19-2) Clonación de genes que codifican para VH y VL de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 humana

Se sintetizó ADNc a partir de 1 µg del ARN total de cada hibridoma obtenido en el ejemplo 19-1, utilizando un kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE (fabricado por Clontech, nº de cat. 634924). Se determinó la secuencia de ADNc de VH utilizando el ADNc obtenido como molde, una mezcla de cebador A universal (que contiene cebadores directos) en el kit y dos cebadores inversos diferentes, específicos para las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c de ratón en combinaciones.

En detalle, se realizó la PCR utilizando cebadores específicos para IgG1 de ratón (SEC ID nº: 17 y 18), cebadores específicos para IgG2a de ratón (SEC ID nº: 19 y 20), cebadores específicos para IgG2b de ratón (SEC ID nº: 21 y 22), cebadores específicos para IgG2c de ratón (SEC ID nº: 23), o cebadores específicos para IgG3 de ratón (SEC ID nº: 24 y 25), y el cebador A universal en combinaciones, para amplificar el fragmento de ADNc de VH de cada anticuerpo.

Además, se realizó la PCR utilizando cebadores específicos para Ig(κ) de ratón (SEC ID nº: 26 y 27) o cebadores específicos para Ig(λ) de ratón (SEC ID nº: 28 y 29) y el cebador A universal en combinaciones, para amplificar el fragmento de ADNc de VL de cada anticuerpo.

Se realizó la PCR durante 5 ciclos que consistían en 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos, 5 ciclos que consistían en 94°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos, y 72°C durante 3 minutos, y 25 ciclos que consistían en 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos, y 72°C durante 3 minutos.

Como resultado de la electroforesis en gel de agarosa, se obtuvieron productos de PCR de ADNc derivados de hibridomas que producían anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3 y anticuerpo 3B7-3-3, cuando se utilizaron los cebadores específicos para región constante de cadena pesada de IgG1.

También se obtuvieron productos de PCR de ADNc derivados de ambos hibridomas cuando se utilizaron los cebadores específicos para Ig(κ) de ratón. Cada producto de PCR se purificó utilizando un kit de extracción en gel (fabricado por QIAEX II, QIAGEN, nº de cat. 20021).

Cada uno de los fragmentos génicos así obtenidos se insertó en un vector pCR4 (fabricado por Invitrogen) utilizando un kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO para secuenciación (fabricado por Invitrogen, nº de cat. K287540SP).

Se introdujo el plásmido así obtenido en *E. coli* DH5α. Se extrajeron plásmidos de los transformantes utilizando un dispositivo de aislamiento de plásmidos automático (fabricado por KURABO), seguido de análisis por secuenciación. Como resultado, se encontró que se obtuvieron ADNc de VH de longitud completa y ADNc de VL incluyendo el supuesto codón de iniciación ATG en el extremo 5'-terminal.

19-3) Análisis de la secuencia de región V de anticuerpo monoclonal anti-BMP9 humana

Las secuencias de bases completas de VH del anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3, anticuerpo 3B7-3-3, obtenidas en el ejemplo 19-2, se representan por SEC ID nº: 30, 31, y 32, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos completas de las mismas, incluyendo la secuencia señal, deducidas a partir de estas secuencias de bases, se representan por SEC ID nº: 33, 34 y 35, respectivamente. Las secuencias de bases completas de VL de los mismos se representan por SEC ID nº: 36, 37 y 38, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos completas de los mismos, incluyendo la secuencia señal, deducidas a partir de estas secuencias de bases, se representan por SEC ID nº: 39, 40 y 41, respectivamente.

Las secuencias de bases excluyendo la secuencia señal de SEC ID nº: 30, 31, y 32 se representan por SEC ID nº: 42, 43, y 44, respectivamente. Las secuencias de bases excluyendo la secuencia señal de SEC ID nº: 36, 37, y 38 se representan por SEC ID nº: 45, 46, y 47, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos excluyendo la secuencia señal de SEC ID nº: 33, 34, y 35 se representan por SEC ID nº: 48, 49, y 50, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos excluyendo la secuencia señal de SEC ID nº: 39, 40, y 41 se representan por SEC ID nº: 51, 52, y 53, respectivamente.

En comparación con los datos de secuencia conocida de anticuerpo ratón [SECUENCIAS of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], se encontró que los ADNc aislados eran ADNc de longitud completa que incluían la secuencia señal secretora, que codifican para anticuerpo 6D10-1-1, anticuerpo 10D5-2-3, y anticuerpo 3B7-3-3, respectivamente.

Se identificaron CDR de VH y VL de cada anticuerpo monoclonal mediante comparación con la secuencia de aminoácidos de anticuerpo conocida. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH de anticuerpo 6D10-1-1 se representan por SEC ID nº: 54, 55 y 56, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de los mismos se representan por SEC ID nº: 57, 58 y 59, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH de anticuerpo 10D5-2-3 se representan por SEC ID n°: 60, 61 y 62, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL de los mismos se representan por SEC ID n°: 63, 64 y 65, respectivamente.

## [Ejemplo 20]

### Análisis del epítipo del anticuerpo obtenido

#### 20-1) Expresión recombinante del anticuerpo obtenido

Se unieron las secuencias de bases de regiones variables de cadena ligera y cadena pesada (que contienen la secuencia señal), de anticuerpo 6D10-1-1 y anticuerpo 10D5-2-3, a las secuencias de bases de regiones constantes de cadena ligera (cadena  $\kappa$ ) y cadena pesada (IgG1) de ratón, respectivamente. Se subclonó cada uno de los resultantes en un vector de expresión de anticuerpo. Se realizó la amplificación de la secuencia de bases de región variable de anticuerpo frente a BMP9 mediante PCR, utilizando el plásmido del ejemplo 19 como molde y los cebadores representados por SEC ID n°: 72 a 79, respectivamente.

Se realizó la amplificación de las secuencias de bases de regiones constantes de cadena ligera (cadena  $\kappa$ ) y cadena pesada (IgG1) de ratón mediante PCR, utilizando las secuencias sintéticas artificiales representadas por SEC ID n°: 80 y 81 (fabricado por TakaraBio) como molde y los cebadores representados por SEC ID n°: 82 a 85, respectivamente.

Para todas las PCR, se utilizó PrimeSTAR HS (premezcla) (fabricado por TakaraBio, R040A) y se realizó la incubación a 96°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos que consistían en 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos, y 72°C durante de 1 a 2 minutos (dependiendo del tamaño de producto). Se sometieron los productos de PCR así obtenidos a electroforesis en gel de agarosa, se purificaron utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por Qiagen) y se utilizaron como inserto.

Se digirió un vector N5KG1 (fabricado por Biogen IDEC) con BglII y EcoRI, se purificó de la misma manera que anteriormente y se utilizó como vector para inserción.

Se insertaron la región variable de cadena ligera de anticuerpo 6D10-1-1 y la región constante de cadena ligera de ratón en el vector N5KG1 tratado con enzima, utilizando el kit de clonación por PCR In-fusion Advantage (fabricado por TakaraBio) y se transformaron en *E. coli*.

Se seleccionaron clones que presentaban la secuencia de inserto exacta a partir de los transformantes obtenidos. Se digirió el ADN de plásmido con Sall y BamHI y se purificó de la misma manera que anteriormente. Se insertaron la región variable de cadena pesada de anticuerpo 6D10-1-1 y la región constante de cadena pesada de ratón en el vector anterior, al que se le habían insertado previamente las cadenas ligeras, y se transformaron en *E. coli*.

Se seleccionaron clones que presentaban la secuencia de inserto exacta, a partir de los transformantes obtenidos. También se preparó vector de expresión de anticuerpo 10D5-2-3 de la misma manera que en el vector de expresión de anticuerpo 6D10-1-1. Se insertó la región variable de cadena ligera entre los sitios de restricción BglII y BsiWI, y se insertó la región variable de cadena pesada entre los sitios de restricción Sall y NheI.

Se transformó *E. coli* con vector de expresión de anticuerpo 6D10-1-1 o anticuerpo 10D5-2-3, y se prepararon esos vectores utilizando un dispositivo NucleoBond Xtra Maxi (fabricado por TakaraBio). Se realizó la expresión transitoria utilizando el sistema de expresión FreeStyle 293 (fabricado por Life Technologies) para expresar los anticuerpos recombinantes. Se obtuvo el sobrenadante de cultivo a partir del caldo de cultivo, mediante centrifugación y filtración utilizando un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

A continuación, se purificaron los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad utilizando Sepharose 4 Fast Flow para proteínas (fabricado por GE Healthcare). Se utilizó una columna NAP-25 (fabricada por GE Healthcare) para sustituir el tampón por tampón de citrato (ácido cítrico 10 mM - NaOH (pH 6.0), NaCl 150 mM). Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración. El coeficiente de absorción era de 1.4 ml/(mg·cm).

#### 20-2) Preparación de proteína quimérica BMP9/BMP10 humana

La secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 86 en la región madura de BMP9 humana se define como región C de BMP9 humana, y la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 139 en la región madura de BMP10 humana se define como región C de BMP10 humana.

BMP10 humana es una molécula que presenta la homología más alta con BMP9 humana, pero el anticuerpo

- 5 6D10-1-1, el anticuerpo 10D5-2-3 y el anticuerpo de R&D no presentan reactividad cruzada con BMP10. De los residuos de aminoácido incluidos en la región C de BMP9 humana, los diferentes de la región C de BMP10 humana son Ser en la posición 80, Val en la posición 84, Lys en la posición 87, Asp en la posición 89, Met en la posición 90, Pro en la posición 93, Leu en la posición 95, Tyr en la posición 97, His en la posición 98, Ser en la posición 103, y Ala en la posición 105 en la región madura de BMP9 humana representada por SEC ID n°: 67.
- Basándose en la diferencia en la región C, se sustituyeron los residuos de aminoácido de BMP9 por los residuos de aminoácido correspondientes de BMP 10 para diseñar las proteínas quiméricas 1 a 5 de BMP9/10 humana.
- 10 La proteína quimérica 1 se preparó sustituyendo los residuos de aminoácido en las posiciones 87, 89, y 93 por Leu, Lys, y Val, respectivamente, y eliminando el residuo de aminoácido en la posición 90 en la región madura de BMP9 humana. La proteína quimérica 2 se preparó sustituyendo los residuos de aminoácido en las posiciones 84, 95, 97 y 98 por Ile, Tyr, Phe y Lys, respectivamente, en la región madura de BMP9 humana.
- 15 La proteína quimérica 3 se preparó sustituyendo los residuos de aminoácido en las posiciones 80, 103 y 105 por Glu, Ala y Ser, respectivamente, en la región madura de BMP9 humana. La proteína quimérica 4 se preparó sustituyendo los residuos de aminoácido en las posiciones 84, 87, 89, 93, 95, 97 y 98 por Ile, Leu, Lys, Val, Tyr, Phe y Lys, respectivamente, y eliminando el residuo de aminoácido en la posición 90 en la región madura de BMP9 humana.
- 20 La proteína quimérica 5 se preparó sustituyendo los residuos de aminoácido en las posiciones 80, 84, 95, 97, 98, 103 y 105 por Glu, Ile, Tyr, Phe, Lys, Ala y Ser, respectivamente, en la región madura de BMP9 humana. En las proteínas quiméricas 1 a 5, las secuencias de aminoácidos correspondientes a la región C de BMP9 humana y región C de BMP10 humana se representan por SEC ID n°: 78 a 91.
- 25 Se digirió un vector de expresión recombinante de complejo hBMP9 marcado con His N-terminal (denominado a continuación en la presente memoria vector pLN1V5\_BMP9 humana), descrito en el ejemplo 12 y la figura 7 del documento WO 2010/126169, con *Stu*I y *Xho*I, se sometió a electroforesis en gel de agarosa y después se purificó utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).
- 30 Para preparar las proteínas quiméricas 1 a 5 de región C de BMP9/10 humana, se mezclaron los cebadores directo e inverso, para construcción de proteínas quiméricas, representados por SEC ID n°: 92 a 101 y se hibridaron en combinaciones de 1/6, 2/7, 3/8, 4/9 y 5/10, y después se insertaron en el vector purificado utilizando un kit de clonación In-fusion HD (fabricado por TakaraBio, Z9649N).
- 35 Además, se preparó un vector pLN1V5\_BMP 10 humana mediante el siguiente procedimiento. Se digirió el vector pLN1V5\_BMP9 humana con *Nhe*I y *Xho*I, se sometió a electroforesis en gel de agarosa y después se purificó utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por QIAGEN).
- 40 Se realizó la PCR utilizando ADNc listo para PCR de corazón humano (fabricado por Ambion, 3326) como molde y cebadores Fwd-1/Rv-1 y Fwd-2/Rv-2 representados por SEC ID n°: 102 a 105.
- 45 Para PCR, se utilizó PrimeSTAR HS (premezcla) (fabricado por TakaraBio, R040A) y se realizó la incubación a 96°C durante 2 minutos, seguida de 32 ciclos que consistían en 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 2 minutos.
- 50 Se sometieron los dos productos de PCR así obtenidos a electroforesis en gel de agarosa, y después se purificaron utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (fabricado por Qiagen) y se utilizaron como insertos. Se realizó la subclonación insertando los insertos en el vector pLN1V5 anteriormente purificado, utilizando un kit de clonación In-fusion HD, para dar un vector pLN1V5\_BMP10 humana.
- 55 Las secuencias de aminoácidos y secuencias de bases de BMP10 humana y la región madura de la misma se representan por SEC ID n°: 106 a 109. La secuencia de aminoácidos y secuencia de bases de la BMP10 marcada con His N-terminal expresada por el vector pLN1V5\_BMP10 humana se representan por SEC ID n°: 110 y 111.
- 60 Se transformó *E. coli* con el vector pLN1V5\_BMP10 humana preparado en la sección anterior y el vector pLN1V5\_BMP9 humana, y se prepararon los vectores utilizando el dispositivo NucleoBond Xtra Maxi (fabricado por TakaraBio).
- 65 Se realizó la expresión transitoria utilizando el sistema de expresión FreeStyle 293 (fabricado por Life Technologies) para expresar BMP9 humana, BMP10 humana, y las proteínas quiméricas 1 a 5 de región C de BMP9/10 humana.
- Se obtuvo el sobrenadante de cultivo a partir del caldo de cultivo, mediante centrifugación y filtración, utilizando un filtro de 0.22 µm. Después de eso, se purificó cada proteína utilizando Ni-NTA agarosa (fabricado por

QIAGEN). Se utilizó HEPES 20 mM-NaOH (pH 7.4), NaCl 500 mM e imidazol 40 mM como tampón de unión, y se utilizó HEPES 20 mM-NaOH (pH 7.4), NaCl 500 mM e imidazol 200 mM como tampón de elución. Se utilizó la columna NAP-25 (fabricada por GE Healthcare, 17-0852-02) para sustituir al tampón con PBS.

- 5 Se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de cada disolución de proteína. Los coeficientes de absorción para BMP9 humana y BMP10 humana fueron de 1.05 y 0.96 ml/(mg·cm), respectivamente. El coeficiente de absorción para las quimeras 1 a 5 fue de 1.055 ml/(mg·cm).

### 20-3) Propiedades de unión específica de anticuerpos obtenidos a proteínas quiméricas

- 10 Se realizó ELISA con antígeno inmovilizado de los anticuerpos obtenidos, utilizando la proteína quimérica. Se añadieron 3 µg/ml de la BMP9 humana recombinante, BMP10 y proteínas quiméricas BMP9/10 del ejemplo 20-2, en tampón de NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol/l, a una placa de 96 pocillos para ELISA (F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE, fabricada por Thermo Fisher Scientific, n° de cat. 442404) en una cantidad de 50 µl/pocillo y se dejó a 15 4°C durante la noche para la adsorción.

- Tras la retirada del reactivo para inmovilización, se añadieron 200 µl/pocillo de BSA al 1%-PBS, se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para el bloqueo y se llevó a cabo el lavado utilizando PBST cinco veces. Después de eso, se añadieron 1000 ng/ml del anticuerpo obtenido (preparado en el ejemplo 20-1), anticuerpo de R&D, anticuerpo frente a BMP10 (fabricado por R&D, MAB2926), anticuerpo policlonal de cabra frente a BMP9 (fabricado por R&D, AF3209), o el anticuerpo monoclonal IgG1 o IgG2b de ratón de control negativo (MAB002, MAB004 (ambos fabricados por R&D)) preparados en BSA al 1%-PBS en una cantidad de 50 µl/pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora.

- 25 Se lavó esta placa con PBST 5 veces y después se tomaron como alícuota 50 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con HRP (fabricado por DAKO, P0447) o anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra con HRP (fabricado por DAKO, P0160) que era una dilución de 2000 veces en BSA al 1%-PBS y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora.

- 30 Se lavó la placa con PBST diez veces, y se añadió 50 µl/pocillo del reactivo cromógeno de TMB (TMB+ Substrate-Chromogen, fabricado por Dako, n° de cat. S1599) para la reacción cromogénica. Cuando la intensidad de la reacción cromogénica se volvió lo suficientemente fuerte, se añadieron 50 µl/pocillo de una disolución de ácido sulfúrico 1 N (fabricada por Wako, n° de cat. 192-04755) y se determinó la absorbancia a 450 nm y 570 nm utilizando un dispositivo Multiskan Spectrum (fabricado por Thermo Labsystems).

- 35 Los resultados se presentan en la tabla 2. Con respecto a + y - en la tabla, la absorbancia de 1 o más se indicó como + y la absorbancia de menos de 1 se indicó como -.

[Tabla 2]

Anticuerpo	BMP9 humana	BMP10 humana	Quimera 1	Quimera 2	Quimera 3	Quimera 4	Quimera 5
Anticuerpo de control de IgG1 de ratón	-	-	-	-	-	-	-
Anticuerpo de control de IgG2b de ratón	-	-	-	-	-	-	-
Anticuerpo policlonal de cabra frente a BMP9	+	-	+	+	+	+	+
Anticuerpo 6D10-1-1	+	-	+	-	+	-	-
Anticuerpo 10D5-2-3	+	-	-	+	+	-	+
Anticuerpo de R&D	+	-	+	-	+	-	-
Anticuerpo frente a BMP10	-	+	-	-	-	-	-

- 45 Tal como se muestra en la tabla 2, el anticuerpo policlonal de cabra frente a BMP9 que se utilizó para confirmar la presencia de una cantidad apropiada de antígeno inmovilizado se unió a BMP9 humana y a todas las proteínas quiméricas 1 a 5, lo cual indica que había una cantidad suficiente de antígeno inmovilizado en la placa.

- Mientras tanto, se encontró que el anticuerpo 6D10-1-1 y el anticuerpo de R&D se unían específicamente a la proteína quimérica 1 y la proteína quimérica 3, mientras que anticuerpo 10D5-2-3 se unía específicamente a la proteína quimérica 2, la proteína quimérica 3 y la proteína quimérica 5.

- 50 Estos resultados indican que el anticuerpo 6D10-1-1 y el anticuerpo de R&D se unen por lo menos a Val en la posición 84, Leu en la posición 95, Tyr en la posición 97 e His en la posición 98, en la región madura de BMP9 humana, y el anticuerpo 10D5-2-3 se une por lo menos a Lys en la posición 87, Asp en la posición 89, Met en la posición 90 y Pro en la posición 93, en la región madura de BMP9 humana. Tomado en conjunto, se reveló que el

anticuerpo 10D5-2-3 es un anticuerpo que reconoce un epítipo de BMP9 diferente del reconocido por el anticuerpo de R&D convencional.

### [Ejemplo 21]

Efecto inhibitor del complejo de BMP9 y el anticuerpo obtenido sobre la señalización de BMP10

Los resultados de los ejemplos 11 y 12 mostraron que el anticuerpo 10D5-2-3 y el anticuerpo 6D10-1-1 no inhiben la unión de BMP9 humana y ALK1 humana, pero inhiben específicamente la unión de BMP9 humana y BMPRII humano.

Además, el resultado del ejemplo 20 mostró que los epítipos de BMP9 del anticuerpo 10D5-2-3 y el anticuerpo 6D10-1-1 son diferentes unos de otros. Además de BMP9, también se conoce BMP10 como ligando del receptor de ALK1. Se supuso que un complejo de BMP9 y anticuerpo 6D10-1-1 o anticuerpo 10D5-2-3 se unía a ALK1 para inhibir la unión de BMP10 a ALK1, conduciendo a la atenuación de la señalización de BMP10-ALK1.

Con el fin de investigar esta suposición, se preparó una estirpe de células indicadoras que expresaban ALK1 humana y se evaluó el efecto inhibitor del complejo de BMP9 y el anticuerpo obtenido, sobre la señalización de ALK1 humana dependiente de BMP10 humana. De este modo también se investigó una diferencia en las acciones entre los anticuerpos atribuida a la diferencia en sus epítipos reconocidos.

#### 21-1) Preparación de estirpe de células indicadoras que expresaban ALK1 humana

Se preparó la célula indicadora de expresión de ALK1 mediante expresión forzada [ALK1/p(GCCG)12-Luc/HepG2(38.5)] del gen de ALK1 humana de longitud completa en la célula de detección de señal de BMP [p(GCCG)12-Luc/HepG2(38.5)], descrita en el ejemplo 2 del documento WO 2010/126169.

Se digirió el ADNc de longitud completa de ALK1 humana, con sitios de restricción EcoRI y NotI en ambos extremos, con EcoRI y NotI y después se integró en el vector de expresión pEAK8 (fabricado por Edgebiosystems) para preparar el vector de expresión de ALK1 humana. Se preparó el ADNc de longitud completa de ALK1 humana (ADNc n° de registro de Genbank BC042637.1, SEC ID n°: 112, secuencia de aminoácidos n° de registro de GenBank AAH42637, SEC ID n°: 71) mediante PCR, utilizando una biblioteca de ADNc de pulmón humano y cebadores (SEC ID n°: 113 y 114).

#### 21-2) Efecto del complejo de BMP9 humana y anticuerpos obtenidos sobre la señalización de ALK1 dependiente de BMP10

Se suspendió la estirpe de células indicadoras de ALK1 humana [ALK1/p(GCCG)12-Luc/HepG2(38.5)], preparada mediante el método anterior, en un medio de proliferación DMEM [DMEM (fabricado por Invitrogen) complementado con FCS al 10%] que contenía 1 µg/ml de hsALK1-Fc, y se sembró en una placa blanca de 96 pocillos (fabricada por PerkinElmer) a una densidad de  $1.5 \times 10^4$ /pocillo.

Al día siguiente, se lavaron los pocillos con 200 µl de DMEM libre de suero y después se añadieron 100 µl de medio DMEM que contenía BSA al 0.1% (albúmina de suero bovino) con 2 ng/ml o 10 ng/ml de proteína recombinante BMP9 de dímero maduro humana (fabricada por R&D Systems, n° de cat. 3209-BP) y se añadieron 3 µg/ml de anticuerpo 6D10-1-1 o anticuerpo 10D5-2-3 a los mismos.

Después de 30 minutos, se añadieron 5 µl de cada proteína recombinante BMP10 de dímero maduro humana (fabricada por R&D Systems, n° de cat. 2926-BP-0255) que se preparó en una concentración final de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 ó 10 ng/ml utilizando BSA al 0.1% (albúmina de suero bovino) y se incubó la placa durante 6 horas. 6 horas después, se añadieron 50 µl de un reactivo quimioluminiscente [sistema de ensayo de luciferasa Steadyglo, fabricado por Promega] para determinar la actividad luciferasa. Se añadió DMEM que contenía BSA al 0.1% como pocillo de control negativo. Los resultados se muestran en la figura 11.

Tal como se muestra en la figura 11, se reveló que el complejo de BMP9 humana y anticuerpo 6D10-1-1 inhibe la señalización de ALK1 dependiente de BMP10, mientras que el complejo de BMP9 humana y anticuerpo 10D5-2-3 no inhibe la señalización de ALK1 dependiente de BMP10. La prueba con animales deficientes para BMP10 mostró que BMP10 es una molécula importante en el desarrollo del corazón [Development, 131(9), 2219(2004)], y en cuanto a los efectos secundarios, se requiere que el anticuerpo anti-BMP9 no afecte a la señalización de BMP10 que es importante en el desarrollo del corazón.

Por tanto, se sugirió que el anticuerpo 10D5-2-3 es un anticuerpo anti-BMP9 más preferido que el anticuerpo 6D10-1-1 o el anticuerpo de R&D, en cuanto a los efectos secundarios.

**[Ejemplo 22]**Preparación de anticuerpo quimérico 10D5-2-3 (anticuerpo c10D5-2-3) y anticuerpo humanizado5 22-1) Diseño de secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado 10D5-2-3

La secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo humanizado 10D5-2-3 se diseñó de la siguiente manera. Las secuencias de aminoácidos de FR en VH de anticuerpo humano, adecuadas para el injerto de las secuencias de aminoácidos de CDR1 a 3 de VH de 10D5-2-3 (SEC ID n°: 60, 61 y 62) se seleccionaron de la siguiente manera.

10 En primer lugar, con respecto a la secuencia de región variable de cadena pesada de anticuerpo humano anteriormente conocida, se buscó una secuencia de anticuerpo humano que tuviera una alta homología con la secuencia de FR en VH del anticuerpo 10D5-2-3, utilizando una base de datos de genes de línea germinal de Ig proporcionada por The National Center for Biotechnology Information. Como resultado, se seleccionó FR de IGVH3-72, porque IGVH3-72 es una secuencia de anticuerpo humano que presenta la homología más alta. Las secuencias de aminoácidos de CDR1 a 3 de VH del anticuerpo 10D5-2-3, representadas por SEC ID n°: 60, 61 y 62, se injertaron en la región apropiada de la secuencia de FR del anticuerpo humano así determinado, para diseñar HV0 (SEC ID n°: 116).

20 Después de eso, la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3 se diseñó de la siguiente manera. Las secuencias de aminoácidos de FR en VL del anticuerpo humano, adecuadas para el injerto de las secuencias de aminoácidos (SEC ID n°: 63, 64 y 65) de CDR1 a 3 de VL del anticuerpo 10D5-2-3 se seleccionaron de la siguiente manera.

25 Kabat *et al.*, han clasificado la VL de los diversos anticuerpos humanos conocidos de manera convencional en subgrupos (HSGI a IV), basándose en la homología de sus secuencias de aminoácidos y han notificado las secuencias consenso para cada uno de los subgrupos [SECuencias of Proteins of Immunological Interest, US Dept Health and Human Services (1991)]. Por tanto, se llevó a cabo la búsqueda de homología de las secuencias consenso de aminoácidos de FR de subgrupos de VL I a IV de anticuerpos humanos con la secuencia amino de FR de VL del anticuerpo 10D5-2-3.

30 Como resultado de la búsqueda de homología, las homologías de HSGI, HSGII, HSGIII y HSGIV fueron del 67.1%, el 67.1%, el 68.4% y el 75.9%, respectivamente. Por tanto, la secuencia de aminoácidos de FR de VL del anticuerpo 10D5-2-3 presentaba la homología más alta con el subgrupo IV.

35 Basándose en los resultados anteriores, se injertaron las secuencias de aminoácidos de CDR1 a 3 de la VL del anticuerpo 10D5-2-3 (SEC ID n°: 63, 64 y 65) en una posición apropiada de la secuencia de aminoácidos de FR de la secuencia consenso del subgrupo IV de VL de anticuerpo humano. Sin embargo, dado que Leu en la posición 108, en la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 10D5-2-3 (SEC ID n°: 52), es un residuo de aminoácido que no se utiliza con la frecuencia más alta, pero se utiliza con la frecuencia relativamente alta en la región correspondiente de la secuencia de aminoácidos de FR de anticuerpo humano sugerida por Kabat *et al.*, se decidió utilizar un residuo de aminoácido existente en la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 10D5-2-3. De esta manera, se diseñó el anticuerpo 10D5-2-3 LV0 (SEC ID n°: 118), es decir, la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3.

45 La secuencia de aminoácidos del anticuerpo 10D5-2-3 HV0, que era VH del anticuerpo 10D5-2-3; y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 10D5-2-3 LV0, que era VL del anticuerpo 10D5-2-3, diseñada anteriormente fueron las secuencias en las que sólo se injertaron las secuencias de aminoácidos de CDR derivadas del anticuerpo monoclonal de ratón 10D5-2-3 en la secuencia de aminoácidos de la FR seleccionada de anticuerpo humano.

50 Sin embargo, en general, es conocido que un anticuerpo humanizado preparado simplemente injertando CDR de un anticuerpo de ratón en FR de un anticuerpo humano presenta una actividad de unión inferior. Con el fin de evitar la disminución de la actividad de unión, se han realizado intentos para modificar los residuos de aminoácido que se consideró que tenían influencia sobre la actividad de unión entre las secuencias de aminoácidos de FR de un anticuerpo humano que son diferentes de un anticuerpo de ratón así como mediante injerto de secuencias de aminoácidos de CDR. Por tanto, en los ejemplos, los inventores decidieron identificar y modificar los residuos de aminoácido de FR que se consideró que tenían influencia sobre la actividad de unión de la siguiente manera.

60 En primer lugar, se construyó la estructura tridimensional de la región V de anticuerpo diseñada anteriormente (denominada a continuación en la presente memoria HV0LV0), incluyendo la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 10D5-2-3 HV0, que era VH del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3, y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 10D5-2-3 LV0, que era VL del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3, utilizando una técnica de modelado por ordenador. Se utilizó Discovery Studio (fabricado por Accelrys) para la preparación de las coordenadas de estructura tridimensional y visualización de la estructura tridimensional.

65

Además, se construyó un modelo informático de la estructura tridimensional de la región V del anticuerpo 10D5-2-3 de la misma manera. Además, se seleccionaron residuos de aminoácido que eran diferentes de los del anticuerpo 10D5-2-3, en la secuencia de aminoácidos de FR de VH y VL de HV0LV0, y se modificaron con los residuos de aminoácido correspondientes del anticuerpo 10D5-2-3, y después se construyó un modelo de estructura tridimensional de la misma manera.

Se identificaron los residuos de aminoácido que se consideró que tenían influencia sobre la actividad de unión, comparando las estructuras tridimensionales de las regiones V del anticuerpo 10D5-2-3 y HV0LV0 y el producto modificado.

Como resultado, como residuos de aminoácido de FR en HV0LV0 que se consideró que cambiaban la estructura tridimensional de la región de unión a antígeno y tenían influencia sobre la actividad de unión, se seleccionaron Gly en la posición 8, Leu en la posición 18, Gly en la posición 49, Asn en la posición 79, Leu en la posición 81, Ala en la posición 94, Val en la posición 95, Ala en la posición 99 y Arg en la posición 100, en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 116 en el anticuerpo 10D5-2-3 HV0; y se seleccionaron Met en la posición 4, Tyr en la posición 40, Ser en la posición 81, Leu en la posición 82, Val en la posición 89 y Tyr en la posición 91, en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 118 en el anticuerpo 10D5-2-3LV0.

Entre los residuos de aminoácido seleccionados, se modificó por lo menos una o más secuencias de aminoácidos con residuos de aminoácido que estaban presentes en los sitios correspondientes del anticuerpo 10D5-2-3, y se construyeron VH y VL del anticuerpo humanizado que presentaban diversas modificaciones.

Específicamente, en cuanto a VH, se introdujo por lo menos una modificación entre las modificaciones de aminoácidos de sustitución de Gly por Arg en la posición 8, sustitución de Leu por Met en la posición 18, sustitución de Gly por Ala en la posición 49, sustitución de Asn por Ser en la posición 79, sustitución de Leu por Val en la posición 81, sustitución de Ala por Gly en la posición 94, sustitución de Val por Ile en la posición 95, sustitución de Ala por Thr en la posición 99, y sustitución de Arg por Gly en la posición 100, en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 116.

Además, en cuanto a VL, se introdujo por lo menos una modificación entre las modificaciones de aminoácidos de sustitución de Met por Leu en la posición 4, sustitución de Tyr por Phe en la posición 40, sustitución de Ser por Pro en la posición 81, sustitución de Leu por Met en la posición 82, sustitución de Val por Met en la posición 89, y sustitución de Tyr por Phe, en la posición 91 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 118.

Como región V de anticuerpo del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3, en la que se modificó por lo menos un aminoácido existente en FR de HV0LV0, se diseñaron HV0LV0, HV0LV2, HV0LV3, HV0LV4, HV0LV6, HV9LV0, HV9LV2, HV9LV3, HV9LV4, HV9LV6, HV3LV0, HV4aLV0, HV4bLV0, HV7aLV0, HV3LV2, HV3LV3, HV3LV6, HV4bLV2, HV4bLV3, HV4bLV6, HV7aLV2, y HV7bLV2.

En la siguiente descripción, los anticuerpos humanizados de anticuerpo 10D5-2-3 anteriormente mencionados que incluyen la región V se abrevian como HV0LV0, HV0LV2, HV0LV3, HV0LV4, HV0LV6, HV9LV0, HV9LV2, HV9LV3, HV9LV4, HV9LV6, HV3LV0, HV4aLV0, HV4bLV0, HV7aLV0, HV3LV2, HV3LV3, HV3LV6, HV4bLV2, HV4bLV3, HV4bLV6, HV7aLV2 y HV7bLV2.

Las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena H, HV3 (SEC ID n°: 120), HV4a (SEC ID n°: 122), HV4b (SEC ID n°: 124), HV7a (SEC ID n°: 126), HV7b (SEC ID n°: 128), y HV9 (SEC ID n°: 130), y las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena L, LV2 (SEC ID n°: 132), LV3 (SEC ID n°: 134), LV4 (SEC ID n°: 136) y LV6 (SEC ID n°: 138) se muestran en las figuras 12 y 13, respectivamente.

#### 22-2) Diseño de gen de región variable de anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3

Se diseñó ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo humanizado utilizando codones utilizados en los ADN (SEC ID n°: 31 y 37) que codifican para las secuencias de aminoácidos de VH del anticuerpo 10D5-2-3 y VL del anticuerpo 10D5-2-3, respectivamente. Cuando se introdujo la modificación de aminoácidos, se diseñó ADN utilizando un codón que se utiliza en una célula de mamífero con una alta frecuencia. Utilizando estas secuencias de ADN, se construyeron vectores de expresión de anticuerpo y se expresaron anticuerpos humanizados.

#### 22-3) Construcción de ADNc que codifican para VH de anticuerpo c10D5-2-3 y anticuerpo humanizado

Se sintetizaron mediante síntesis génica ADNc que codifican para VH del anticuerpo 10D5-2-3 representado por SEC ID n°: 49, la secuencia de aminoácidos HV0 de VH del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3 diseñado en el ejemplo 22-1) (SEC ID n°: 116), y HV3, HV4a, HV4b, HV7a, HV7b y HV9 diseñados mediante el método del ejemplo 22-1).

22-4) Construcción de ADNc que codifican para VL de anticuerpo c10D5-2-3 y anticuerpo humanizado

5 Se sintetizaron mediante síntesis génica ADNc que codifican para VL del anticuerpo 10D5-2-3 representado por SEC ID n°: 52, la secuencia de aminoácidos LV0 de VL del anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3 diseñado en el ejemplo 22-1) (SEC ID n°: 118), y LV2, LV3, LV4 y LV6 diseñados mediante el método del ejemplo 22-1).

22-5) Construcción de vectores que expresan anticuerpo c10D5-2-3 y anticuerpo humanizado

10 Se insertaron VH del anticuerpo 10D5-2-3, ADNc que codifica para uno cualquiera de HV0, HV3, HV4a, HV4b, HV7a, HV7b, y HV9 obtenido en el ejemplo 22-3), y VL del anticuerpo 10D5-2-3, ADNc que codifica para uno cualquiera de LV0, LV2, LV3, LV4 y LV6 obtenido en el ejemplo 22-4), en una posición apropiada del vector de expresión de anticuerpo humanizado pKANTEX93 descrito en el documento WO 97/10354, para construir diversos vectores de expresión de anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3.

22-6) Expresión de anticuerpo c10D5-2-3 y anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3 en células de animal

20 Se utilizó la estirpe celular CHO-S (fabricada por Invitrogen) para la transfección génica de los vectores de expresión de anticuerpo para células de animal, que se construyeron en el ejemplo 22-5).

25 Se utilizó CHO-S como célula hospedadora para realizar la transfección transitoria según las instrucciones del sistema de expresión Free-Style™ MAX CHO (fabricado por Invitrogen). Se mezclaron 312.5 µl de reactivo de transfección FreeStyle™ MAX (fabricado por Invitrogen) con OptiPro™ SFM hasta un volumen final de 5 ml. Se mezclaron la disolución de plásmido de vector de expresión y la disolución de reactivo de transfección FreeStyle™ MAX y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se añadió esta mezcla a 250 ml de CHO-S cultivadas a una densidad de  $1.0 \times 10^6$  células/ml, en medio de expresión FreeStyle™ CHO (fabricado por Invitrogen), y se cultivaron adicionalmente las células en las condiciones de 37°C, CO<sub>2</sub> al 8% y 135 rpm durante de 5 días a 7 días.

30 Tras el cultivo, se recuperó una suspensión de células y se centrifugó en las condiciones de 3000 rpm y 4°C durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante de cultivo y después se esterilizó mediante filtración utilizando un filtro Millex GV con un tamaño de poro de 0.22 µm (fabricado por MILLIPORE).

22-7) Adquisición de anticuerpo c10D5-2-3 purificado y anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3

35 Una columna con un diámetro de 0.8 cm se empaquetó con 0.5 ml de MabSelect SuRe (fabricado por GE Healthcare) y se cargaron en serie 3.0 ml de agua purificada, 2.0 ml de tampón de citrato 0.1 M (pH 3.5), y 1.5 ml de NaCl 150 mM y tampón de borato de sodio 0.2 M (pH 7.5) en la misma para la equilibración.

40 Después de eso, se cargó el sobrenadante de cultivo recuperado en el ejemplo 22-6) en la columna y se lavó la columna con 5.0 ml de NaCl 150 mM y tampón de borato de sodio 0.2 M (pH 7.5). Tras lavar, se utilizaron 2.0 ml de tampón de citrato 0.1 M (pH 3.5) para eluir los anticuerpos adsorbidos sobre la columna. Se realizó la elución para obtener 4 fracciones de 500 µl cada una.

45 Después de eso, se sometieron las fracciones purificadas obtenidas, a SDS-PAGE, se mezclaron las fracciones que incluían la proteína deseada y se sometieron a diálisis utilizando NaCl 150 mM y disolución de citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) a 4°C durante la noche.

50 Tras la diálisis, se recuperaron disoluciones de anticuerpo c10D5-2-3 y anticuerpo humanizado y se esterilizaron mediante filtración, utilizando un dispositivo MillexGV (fabricado por MILLIPORE) con un tamaño de poro de 0.22 µm. Se determinó la absorbancia a 280 nm (DO280nm), utilizando un espectrofotómetro (SHIMADZU UV-1700), y se calcularon las concentraciones del anticuerpo c10D5-2-3 y anticuerpo humanizado purificados.

55 Como resultado, se encontró que se prepararon un tipo de anticuerpo c10D5-2-3 químico, que estaba compuesto por VH del anticuerpo 10D5-2-3 y VL del anticuerpo 10D5-2-3, y 22 tipos de los anticuerpos humanizados, HV0LV0, HV0LV2, HV0LV3, HV0LV4 y HV0LV6 que estaban compuestos por HV0 como VH de anticuerpo y LV0, LV2, LV3, LV4 o LV6, como VL de anticuerpo, los anticuerpos humanizados, HV9LV0, HV9LV2, HV9LV3, HV9LV4 y HV9LV6 que estaban compuestos por HV9, como VH de anticuerpo, y LV0, LV2, LV3, LV4 o LV6, como VL de anticuerpo, los anticuerpos humanizados, HV3LV0, HV3LV2, HV3LV3 y HV3LV6 que estaban compuestos por HV3, como VH de anticuerpo y LV0, LV2, LV3 o LV6, como VL de anticuerpo, el anticuerpo humanizado HV4aLV0 que estaba compuesto por HV4a como VH de anticuerpo y LV0 como VL de anticuerpo, los anticuerpos humanizados, HV4bLV0, HV4bLV2, HV4bLV3 y HV4bLV6 que estaban compuestos por HV4b, como VH de anticuerpo y LV0, LV2, LV3 o LV6, como VL de anticuerpo, los anticuerpos humanizados HV7a LV0 y HV7a LV2 que estaban compuestos por HV7a, como VH de anticuerpo, y LV0 o LV2, como VL de anticuerpo, y el anticuerpo humanizado, HV7bLV2 que estaba compuesto por HV7b, como VH de anticuerpo, y LV2, como VL de anticuerpo.

**[Ejemplo 23]**Evaluación de la actividad de anticuerpo humanizado anti-BMP9

5 23-1) Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo c10D5-2-3 y anticuerpo humanizado a proteína BMP9 humana mediante análisis Biacore

10 Con el fin de comparar la actividad de unión a BMP9 humana entre anticuerpo c10D5-2-3 y 22 tipos de anticuerpos humanizados del anticuerpo 10D5-2-3, obtenidos en el ejemplo 22-7, se midió la actividad de unión a proteína recombinante BMP9 humana (fabricada por R&D Systems) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), utilizando un instrumento BiacoreT100 (fabricado por GE Healthcare bioscience).

15 Se inmovilizó anticuerpo anti-IgG humana sobre un chip sensor CM5 (fabricado por GE Healthcare bioscience) utilizando un kit de captura de anticuerpo humano (fabricado por GE Healthcare bioscience) según el protocolo adjunto. Se aplicaron 0.4 µg/ml de anticuerpo c10D5-2-3 o de cada anticuerpo humanizado a la célula de flujo en la que se inmovilizó el anticuerpo anti-IgG humana, a una velocidad de flujo de 10 µl/min durante 2 minutos.

20 Después de eso, se sometió proteína recombinante BMP9 humana (fabricada por R&D Systems, nº de cat. 3209-BP) a dilución en serie de 2 veces, comenzando desde 1 nm para dar 5 concentraciones, y se aplicó a una velocidad de flujo de 10 µl/min, se monitorizó la asociación a lo largo de 3 minutos y la disociación a lo largo de 3 minutos a un flujo de 10 µl/min. Se analizó el sensograma así obtenido mediante el software BiaEvaluation (fabricado por GE Healthcare bioscience) para calcular la constante de velocidad de cada anticuerpo.

25 En la tabla 3 se presentan la constante de velocidad de asociación (ka1), la constante de velocidad de disociación (kd1) y la constante de disociación [kd1/ka1=KD] de cada anticuerpo. Como resultado, se encontró que 17 tipos de anticuerpos humanizados de anticuerpo 10D5-2-3 presentaban reactividad específica de 10E-11 o menos frente a proteína BMP9 humana.

30 [Tabla 3]

Anticuerpo	Kd (1/Ms)	Ka (1/s)	KD (M)
Anticuerpo c10D5-2-3	5.32 x 10E7	2.40 x 10E-4	4.52 x 10E-12
HV0LV0			N.D.
HV0LV2			N.D.
HV0LV3			N.D.
HV0LV4			N.D.
HV0LV6			N.D.
HV9LV0	13.3 x 10E7	8.59 x 10E-4	6.45 x 10E-12
HV9LV2	8.91 x 10E7	3.47 x 10E-4	3.89 x 10E-12
HV9LV3	7.91 x 10E7	2.79 x 10E-4	3.52 x 10E-12
HV9LV4	11.6 x 10E7	7.39 x 10E-4	6.38 x 10E-12
HV9LV6	6.34 x 10E7	3.25 x 10E-4	5.13 x 10E-12
HV3LV0	15.1 x 10E7	17.2 x 10E-4	11.4 x 10E-12
HV4aLV0	15.7 x 10E7	14.5 x 10E-4	9.24 x 10E-12
HV4bLV0	14.4 x 10E7	16.4 x 10E-4	11.4 x 10E-12
HV7aLV0	14.7 x 10E7	14.2 x 10E-4	9.69 x 10E-12
HV3LV2	5.12 x 10E7	5.96 x 10E-4	11.6 x 10E-12
HV3LV3	5.43 x 10E7	5.16 x 10E-4	9.49 x 10E-12
HV3LV6	4.67 x 10E7	5.55 x 10E-4	11.9 x 10E-12
HV4bLV2	5.39 x 10E7	5.88 x 10E-4	10.9 x 10E-12
HV4bLV3	5.50 x 10E7	5.56 x 10E-4	10.1 x 10E-12
HV4bLV6	4.46 x 10E7	5.31 x 10E-4	11.9 x 10E-12
HV7aLV2	4.98 x 10E7	4.77 x 10E-4	9.57 x 10E-12
HV7bLV2	6.25 x 10E7	3.07 x 10E-4	4.91 x 10E-12
N.D.: No detectado			

**[Ejemplo 24]**

35 Efecto de anticuerpo humanizado de anticuerpo 10D5-2-3 sobre la eritropoyesis en ratón BALB/c normal

40 A continuación, se evaluaron las actividades eritropoyéticas de 4 tipos de anticuerpos humanizados (HV9LV2, HV9LV3, HV7aLV2 y HV7bLV2) utilizando ratón BALB/c, con el fin de examinar si los anticuerpos humanizados de anticuerpo 10D5-2-3 realmente funcionan para aumentar los eritrocitos. Se adquirieron ratones BALB/c macho de 7 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan Inc.) y se sometieron a los experimentos. Se utilizó

## ES 2 720 401 T3

agua corriente estéril como agua potable y se proporcionó pienso sólido FR- 2 (fabricado por Funabashi Farm) como dieta con acceso libre.

5 Tras la cría previa, se dividieron los ratones en 7 grupos (n=6 por grupo) basándose en el peso corporal y se administraron 4 tipos de anticuerpos humanizados (HV9LV2, HV9LV3, HV7aLV2, y HV7bLV2), así como anticuerpo c10D5-2-3 y anticuerpo 10D5-2-3, a una dosis de 1 mg/kg mediante inyección subcutánea.

10 En detalle, se preparó cada anticuerpo en una concentración de 0.1 mg/ml utilizando solución salina fisiológica y se administró cada uno en una dosis de 10 ml/kg. Al grupo de vehículo se le administró solución salina fisiológica en una dosis de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea. 1 semana tras la administración de anticuerpo, se extrajo sangre de la vena orbital con anestesia con isoflurano, se puso en un tubo que contenía EDTA y se utilizó como muestra de sangre.

15 Se diluyeron las muestras de sangre así obtenidas, 2 veces con solución salina fisiológica, y se determinaron los números de diversas células sanguíneas utilizando un contador automatizado de células sanguíneas ADVIA120 (fabricado por Bayer). Con respecto al número de eritrocitos de cada grupo ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ ), el grupo con solución salina mostró  $1036.3 \pm 10.9$ , mientras que el grupo tratado con HV9LV2, el grupo tratado con HV9LV3, el grupo tratado con HV7aLV2, el grupo tratado con HV7bLV2, el grupo tratado con grupo tratado con anticuerpo c10D5-2-3 y el grupo tratado con anticuerpo 10D5-2-3 mostraron  $1168.0 \pm 13.4$ ,  $1157.3 \pm 8.7$ ,  $1145.3 \pm 12.8$ ,  $1144.3 \pm 14.4$ ,  $1127.7 \pm 10.9$ , y  $1106.0 \pm 7.5$  (media  $\pm$  error estándar), respectivamente, lo que indica que todos los anticuerpos humanizados aumentan significativamente el número de eritrocitos.

SEC ID nº: 1: Secuencia de bases de LinkA1

25 SEC ID nº: 2: Secuencia de bases de LinkA2

SEC ID nº: 3: Secuencia de bases de LinkB1

30 SEC ID nº: 4: Secuencia de bases de LinkB2

SEC ID nº: 5: Secuencia de bases de Bmp9KOClaI-3'Fw

SEC ID nº: 6: Secuencia de bases de Bmp9KOAscl-3'Rv

35 SEC ID nº: 7: Secuencia de bases de Bmp9KOPacl-5'Fw

SEC ID nº: 8: Secuencia de bases de Bmp9KOFsel-5'Rv

SEC ID nº: 9: Secuencia de bases de Bmp9KO5'sonda FW2

40 SEC ID nº: 10: Secuencia de bases de Bmp9KO5'sonda RV2

SEC ID nº: 11: Secuencia de bases de Bmp9KO3'sonda FW2

45 SEC ID nº: 12: Secuencia de bases de Bmp9KO3'sonda RV2

SEC ID nº: 13: Secuencia de bases de mBMP9\_FW5915

50 SEC ID nº: 14: Secuencia de bases de mBMP9\_RV17165

SEC ID nº: 15: Secuencia de bases de mBMP9\_FW1

SEC ID nº: 16: Secuencia de bases de mBMP9\_RV1

55 SEC ID nº: 17: Secuencia de bases de cebador RV1 específico de IgG1 de ratón

SEC ID nº: 18: Secuencia de bases de cebador RV2 específico de IgG1 de ratón

SEC ID nº: 19: Secuencia de bases de cebador RV1 específico de IgG2a de ratón

60 SEC ID nº: 20: Secuencia de bases de cebador RV2 específico de IgG2a de ratón

SEC ID nº: 21: Secuencia de bases de cebador RV1 específico de IgG2b de ratón

65 SEC ID nº: 22: Secuencia de bases de cebador RV2 específico de IgG2b de ratón

## ES 2 720 401 T3

- SEC ID nº: 23: Secuencia de bases de cebador RV específico de IgG2c de ratón
- SEC ID nº: 24: Secuencia de bases de cebador RV1 específico de IgG3 de ratón
- 5 SEC ID nº: 25: Secuencia de bases de cebador RV2 específico de IgG3 de ratón
- SEC ID nº: 26: Secuencia de bases de cebador RV1 específico de Ig( $\kappa$ ) de ratón
- 10 SEC ID nº: 27: Secuencia de bases de cebador RV2 específico de Ig( $\kappa$ ) de ratón
- SEC ID nº: 28: Secuencia de bases de cebador RV1 específico de Ig( $\lambda$ ) de ratón
- SEC ID nº: 29: Secuencia de bases de cebador RV2 específico de Ig( $\lambda$ ) de ratón
- 15 SEC ID nº: 30: Secuencia de bases completa de VH del anticuerpo 6D10-1-1
- SEC ID nº: 31: Secuencia de bases completa de VH del anticuerpo 10D5-2-3
- SEC ID nº: 32: Secuencia de bases completa de VH del anticuerpo 3B7-3-3
- 20 SEC ID nº: 33: Secuencia de aminoácidos completa de VH del anticuerpo 6D10-1-1 (incluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 34: Secuencia de aminoácidos completa de VH del anticuerpo 10D5-2-3 (incluyendo la secuencia señal)
- 25 SEC ID nº: 35: Secuencia de aminoácidos completa de VH del anticuerpo 3B7-3-3 (incluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 36: Secuencia de bases completa de VL del anticuerpo 6D10-1-1
- 30 SEC ID nº: 37: Secuencia de bases completa de VL del anticuerpo 10D5-2-3
- SEC ID nº: 38: Secuencia de bases completa de VL del anticuerpo 3B7-3-3
- 35 SEC ID nº: 39: Secuencia de aminoácidos completa de VL del anticuerpo 6D10-1-1 (incluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 40: Secuencia de aminoácidos completa de VL del anticuerpo 10D5-2-3 (incluyendo la secuencia señal)
- 40 SEC ID nº: 41: Secuencia de aminoácidos completa de VL del anticuerpo 3B7-3-3 (incluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 42: Secuencia de bases de VH del anticuerpo 6D10-1-1 (excluyendo la secuencia señal)
- 45 SEC ID nº: 43: Secuencia de bases de VH del anticuerpo 10D5-2-3 (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 44: Secuencia de bases de VH del anticuerpo 3B7-3-3 (excluyendo la secuencia señal)
- 50 SEC ID nº: 45: Secuencia de bases de VL del anticuerpo 6D10-1-1 (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 46: Secuencia de bases de VL del anticuerpo 10D5-2-3 (excluyendo la secuencia señal)
- 55 SEC ID nº: 47: Secuencia de bases de VL del anticuerpo 3B7-3-3 (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 48: Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 6D10-1-1 (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 49: Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 10D5-2-3 (excluyendo la secuencia señal)
- 60 SEC ID nº: 50: Secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 3B7-3-3 (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 51: Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 6D10-1-1 (excluyendo la secuencia señal)
- 65 SEC ID nº: 52: Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 10D5-2-3 (excluyendo la secuencia señal)

## ES 2 720 401 T3

- SEC ID nº: 53: Secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 3B7-3-3 (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 54: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH del anticuerpo 6D10-1-1
- 5 SEC ID nº: 55: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH del anticuerpo 6D10-1-1
- SEC ID nº: 56: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH del anticuerpo 6D10-1-1
- 10 SEC ID nº: 57: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL del anticuerpo 6D10-1-1
- SEC ID nº: 58: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL del anticuerpo 6D10-1-1
- SEC ID nº: 59: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de VL del anticuerpo 6D10-1-1
- 15 SEC ID nº: 60: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH del anticuerpo 10D5-2-3
- SEC ID nº: 61: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH del anticuerpo 10D5-2-3
- SEC ID nº: 62: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH del anticuerpo 10D5-2-3
- 20 SEC ID nº: 63: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL del anticuerpo 10D5-2-3
- SEC ID nº: 64: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL del anticuerpo 10D5-2-3
- 25 SEC ID nº: 65: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de VL del anticuerpo 10D5-2-3
- SEC ID nº: 66: Secuencia de aminoácidos de la proteína BMP9 humana (incluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 67: Secuencia de aminoácidos de la región madura de BMP9 humana
- 30 SEC ID nº: 68: Secuencia de bases que codifica para la proteína BMP9 humana (incluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 69: Secuencia de bases que codifica para la región madura de BMP9 humana
- 35 SEC ID nº: 70: Secuencia de aminoácidos de BMPRII humano
- SEC ID nº: 71: Secuencia de aminoácidos de ALK1 humana
- 40 SEC ID nº: 72: Secuencia de bases del cebador directo utilizado en la amplificación de la cadena ligera del anticuerpo 6D10-1-1
- SEC ID nº: 73: Secuencia de bases del cebador inverso utilizado en la amplificación de la cadena ligera del anticuerpo 6D10-1-1
- 45 SEC ID nº: 74: Secuencia de bases del cebador directo utilizado en la amplificación de la cadena pesada del anticuerpo 6D10-1-1
- SEC ID nº: 75: Secuencia de bases del cebador inverso utilizado en la amplificación de la cadena pesada del anticuerpo 6D10-1-1
- 50 SEC ID nº: 76: Secuencia de bases del cebador directo utilizado en la amplificación de la cadena ligera del anticuerpo 10D5-2-3
- SEC ID nº: 77: Secuencia de bases del cebador inverso utilizado en la amplificación de la cadena ligera del anticuerpo 10D5-2-3
- 55 SEC ID nº: 78: Secuencia de bases del cebador directo utilizado en la amplificación de la cadena pesada del anticuerpo 10D5-2-3
- 60 SEC ID nº: 79: Secuencia de bases del cebador inverso utilizado en la amplificación de la cadena pesada del anticuerpo 10D5-2-3
- SEC ID nº: 80: Secuencia de bases de la región constante de cadena ligera (cadena  $\kappa$ ) de ratón como molde
- 65 SEC ID nº: 81: Secuencia de bases de la región constante de cadena pesada (IgG1) de ratón como molde

## ES 2 720 401 T3

- SEC ID nº: 82: Secuencia de bases del cebador directo utilizado en la amplificación de la región constante de cadena ligera (cadena  $\kappa$ ) de ratón
- 5 SEC ID nº: 83: Secuencia de bases del cebador inverso utilizado en la amplificación de la región constante de cadena ligera (cadena  $\kappa$ ) de ratón
- SEC ID nº: 84: Secuencia de bases del cebador directo utilizado en la amplificación de la región constante de cadena pesada (IgG1) de ratón
- 10 SEC ID nº: 85: Secuencia de bases del cebador inverso utilizado en la amplificación de la región constante de cadena pesada (IgG1) de ratón
- SEC ID nº: 86: Secuencia de aminoácidos de la región C de BMP9 humana
- 15 SEC ID nº: 87: Secuencia de aminoácidos de la región C de proteína quimérica 1 de BMP9/BMP10 humana
- SEC ID nº: 88: Secuencia de aminoácidos de la región C de proteína quimérica 2 de BMP9/BMP10 humana
- 20 SEC ID nº: 89: Secuencia de aminoácidos de la región C de proteína quimérica 3 de BMP9/BMP10 humana
- SEC ID nº: 90: Secuencia de aminoácidos de la región C de proteína quimérica 4 de BMP9/BMP10 humana
- SEC ID nº: 91: Secuencia de aminoácidos de la región C de proteína quimérica 5 de BMP9/BMP10 humana
- 25 SEC ID nº: 92: Secuencia de bases del cebador 1 para la preparación de proteína quimérica
- SEC ID nº: 93: Secuencia de bases del cebador 2 para la preparación de proteína quimérica
- 30 SEC ID nº: 94: Secuencia de bases del cebador 3 para la preparación de proteína quimérica
- SEC ID nº: 95: Secuencia de bases del cebador 4 para la preparación de proteína quimérica
- SEC ID nº: 96: Secuencia de bases del cebador 5 para la preparación de proteína quimérica
- 35 SEC ID nº: 97: Secuencia de bases del cebador 6 para la preparación de proteína quimérica
- SEC ID nº: 98: Secuencia de bases del cebador 7 para la preparación de proteína quimérica
- 40 SEC ID nº: 99: Secuencia de bases del cebador 8 para la preparación de proteína quimérica
- SEC ID nº: 100: Secuencia de bases del cebador 9 para la preparación de proteína quimérica
- SEC ID nº: 101: Secuencia de bases del cebador 10 para la preparación de proteína quimérica
- 45 SEC ID nº: 102: Secuencia de bases del cebador Fwd-1 para la clonación de BMP10 humana
- SEC ID nº: 103: Secuencia de bases del cebador Rv-1 para la clonación de BMP10 humana
- 50 SEC ID nº: 104: Secuencia de bases del cebador Fwd-2 para la clonación de BMP10 humana
- SEC ID nº: 105: Secuencia de bases del cebador Rv-2 para la clonación de BMP10 humana
- SEC ID nº: 106: Secuencia de aminoácidos de la proteína BMP10 humana (incluyendo la secuencia señal)
- 55 SEC ID nº: 107: Secuencia de aminoácidos de la región madura de BMP10 humana
- SEC ID nº: 108: Secuencia de bases que codifica para la proteína BMP10 humana (incluyendo la secuencia señal)
- 60 SEC ID nº: 109: Secuencia de bases que codifica para la región madura de BMP10 humana
- SEC ID nº: 110: Secuencia de aminoácidos de la proteína expresada por el vector pLN1V5\_BMP 10 humana
- 65 SEC ID nº: 111: Secuencia de bases que codifica para los aminoácidos expresados por el vector pLN1V5\_BMP 10 humana

## ES 2 720 401 T3

- SEC ID nº: 112: ADNc de longitud completa de ALK1 humana
- 5 SEC ID nº: 113: Secuencia de bases de hALK1 FPN
- SEC ID nº: 114: hALK1 RP
- 10 SEC ID nº: 115: Secuencia de bases de VH(HV0) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 116: Secuencia de aminoácidos de VH(HV0) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 15 SEC ID nº: 117: Secuencia de bases de VL(LV0) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 118: Secuencia de aminoácidos de VL(LV0) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 20 SEC ID nº: 119: Secuencia de bases de VH(HV3) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 120: Secuencia de aminoácidos de VH(HV3) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 25 SEC ID nº: 121: Secuencia de bases de VH(HV4a) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 122: Secuencia de aminoácidos de VH(HV4a) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 30 SEC ID nº: 123: Secuencia de bases de VH(HV4b) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 124: Secuencia de aminoácidos de VH(HV4b) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 35 SEC ID nº: 125: Secuencia de bases de VH(HV7a) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 40 SEC ID nº: 126: Secuencia de aminoácidos de VH(HV7a) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 127: Secuencia de bases de VH(HV7b) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 45 SEC ID nº: 128: Secuencia de aminoácidos de VH(HV7b) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 50 SEC ID nº: 129: Secuencia de bases de VH(HV9) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 130: Secuencia de aminoácidos de VH(HV9) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 55 SEC ID nº: 131: Secuencia de bases de VL(LV2) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- SEC ID nº: 132: Secuencia de aminoácidos de VL(LV2) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 60 SEC ID nº: 133: Secuencia de bases de VL(LV3) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)
- 65 SEC ID nº: 134: Secuencia de aminoácidos de VL(LV3) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)

SEC ID nº: 135: Secuencia de bases de VL(LV4) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)

5 SEC ID nº: 136: Secuencia de aminoácidos de VL(LV4) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)

SEC ID nº: 137: Secuencia de bases de VL(LV6) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)

10 SEC ID nº: 138: Secuencia de aminoácidos de VL(LV6) de anticuerpo humanizado modificado (excluyendo la secuencia señal)

SEC ID nº: 139: Secuencia de aminoácidos de la región C de BMP10 humana

15 **Listado de secuencias**

<110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

20 <120> Agente farmacéutico que comprende un anticuerpo anti-BMP9 como principio activo para el tratamiento de la anemia tal como la anemia renal y la anemia de cáncer

<130> W513672

25 <150> US61/666981

<151> 2012-07-02

<160> 139

30 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 28

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> LinkA1

40 <400> 1

tcgagtcgcg acaccggcgg gcgcgccc

28

<210> 2

<211> 28

45 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> LinkA2

50 <400> 2

tcgaggcgc gcccgccggt gtcgac

28

<210> 3

55 <211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

60 <223> LinkB1

<400> 3

ggccgcttaa ttaaggccgg ccgtcgacg

29

65 <210> 4

<211> 29

# ES 2 720 401 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> LinkB2	
	<400> 4	
	aatcgtcga cggccggcct taattaagc	29
10	<210> 5	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Bmp9KOClaI-3'Fw	
	<400> 5	
20	ccatcgattg gggatacagg acatggaaga ggtctctg	38
	<210> 6	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Bmp9KOAscl-3'Rv	
	<400> 6	
30	ttggcgcgcc gtctgagcat gacagtgggtg gacagacact	40
	<210> 7	
	<211> 40	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Bmp9KOPacl-5'Fw	
40	<400> 7	
	ccttaattaa ctccaattc ctgggccttc tgctcaggag	40
	<210> 8	
	<211> 40	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Bmp9KOFsel-5'Rv	
50	<400> 8	
	taggccggcc ctgggcctt gaagggggcc tgaggggctg	40
	<210> 9	
55	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> sonda FW2 de Bmp9 KO5'	
	<400> 9	
	cacagatact gtcctagagc ttct	25
65	<210> 10	
	<211> 25	

ES 2 720 401 T3

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sonda RV2 de Bmp9 KO5'  
  
 <400> 10  
 catttctgg aacactacct tagag 25  
  
 10 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Sonda FW2 de Bmp9 KO3'  
  
 <400> 11  
 tcatctgaa agttgtgagg tactg 25  
 20  
 <210> 12  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Sonda RV2 de Bmp9 KO3'  
  
 <400> 12  
 30 gatatgcttt ctacaccac agttt 25  
  
 <210> 13  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> mBMP9\_FW5915  
  
 40 <400> 13  
 gtagaggagg ttaggttta tgagg 25  
  
 <210> 14  
 <211> 25  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> mBMP9\_RV17165  
 50  
 <400> 14  
 atgccttct atgccttct tgacg 25  
  
 <210> 15  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 60 <223> mBMP9\_FW1  
  
 <400> 15  
 aacggacaaa tcgtctacgc 20  
 65 <210> 16  
 <211> 20

	<212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> mBMP9_RV1	
	<400> 16 tccctgttc attgggagtc	20
10	<210> 17 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador RV1 de IgG1 de ratón	
20	<400> 17 ccagggtcac catggagta gttgggagc	30
25	<210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador RV2 de IgG1 de ratón	
	<400> 18 tcaccatgga gttagtttg gcagcagatc	30
35	<210> 19 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador RV1 de IgG2a de ratón	
	<400> 19 cagtgatag accgatggg ctg	23
45	<210> 20 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador RV2 de IgG2a de ratón	
	<400> 20 ttgaccaggc atcctagagt cacc	24
55	<210> 21 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador RV1 de IgG2b de ratón	
	<400> 21 ttgaccaggc atcccagagt cacggaggaa	30
65	<210> 22 <211> 30	

	<212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> Cebador RV2 de IgG2b de ratón	
	<400> 22 tcacggagga accagttgta tctccacacc	30
10	<210> 23 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador RV de IgG2c de ratón	
20	<400> 23 cagttgtacc tccacacaca ggggc	25
25	<210> 24 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador RV1 de IgG3 de ratón	
	<400> 24 agatgagact gtgcgcacac cg	22
35	<210> 25 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador RV2 de IgG3 de ratón	
	<400> 25 ctggacaggg ctccatagtt ccatt	25
45	<210> 26 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador RV1 de Ig(kappa) de ratón	
	<400> 26 ctaactca ttctgtgga agctcttgac aa	32
55	<210> 27 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador RV2 de Ig(kappa) de ratón	
	<400> 27 gaagcacacg actgaggcac ctccagatgt	30
65	<210> 28 <211> 31	

ES 2 720 401 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador RV1 de Ig(lambda) de ratón	
	<400> 28	
	ftagagacat tctgcaggag acagactctt c	31
10	<210> 29	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador RV2 de Ig(lambda) de ratón	
	<400> 29	
20	ctgggtgata ggtgtacat ttgcctcca	30
	<210> 30	
	<211> 417	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> 6D10-1-1 VH	
	<400> 30	
	atggaatgga gcagagtctt tatctttctc ctatcagtaa ctgcaggtgt tcaactccag	60
30	gtccagctgc agcagctctgg agctgagctg gtaaggcctg ggacttcagt gaaggtgtcc	120
	tgcaaggctt ctggatacgc cttcactaat tacttgatgg agtggattaa gcagaggcct	180
	ggacagggcc ttgagtggat tggagtgatt catcctggaa ttgggtgttac taactacaat	240
	gagaagttca agggcaaggc aacctgact gcagacatat cctccagtac tgcctacatg	300
	cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcaag aagggtctaac	360
	tgggacctgt actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca	417
35	<210> 31	
	<211> 414	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> 10D5-2-3 VH	
	<400> 31	
	atggacttga gactgagctg tgcttttatt attgttcttt taaaaggggt ccagagtgaa	60
	gtgaagcttg aggagtctag aggaggcttg gtgcaacctg gaggatccat gaaactctcc	120
	tgtgttgccct ctggattcac tttcagtaac tactggatga actgggtccg ccagtctcca	180
	gagaaggggc ttgagtgggt tgctcacatt agattaaaat ctgataatta tgcaacacat	240
	tatgctggagt ctgtgagagg gaggttctact atctcaagag atgattccaa aagtagtctc	300
	ttcctgcaaa tgaacaactt aagggtctgaa gacactggaa tttattactg cacaggagga	360
	agtaactacg tgtttgcttt ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca	414
45	<210> 32	

ES 2 720 401 T3

<211> 408  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> 3B7-3-3 VH

<400> 32  
 atgggatgga actggatcct tattttaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60  
 gtccagctgc agcagtctag acctgaattg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatctcc 120  
 tgcaaggcct ctgattactc attcactgac tactacatga actgggtgaa gcaaagccct 180  
 gacaagagcc ttgagtggat tggagagatt agtcctagct ctgggtgtac tacctacaac 240  
 cagaagttca aggccaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300  
 cagctcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaac taggggggcc 360  
 ttctactttg actactgggg ccaaggcacc gctctcacag tctcctca 408

10 <210> 33  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> señal más-aminoácidos de VH de 6D10-1-1

<400> 33  
 Met Glu Trp Ser Arg Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 20 25 30  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe  
 35 40 45  
 Thr Asn Tyr Leu Met Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Gly Ile Gly Val Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Ala Asn Trp Asp Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 115 120 125

20 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130 135

<210> 34  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 25 <213> Artificial

ES 2 720 401 T3

<220>

<223> señal más-aminoácidos de VH de 10D5-2-3

5

<400> 34

Met Asp Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ile Ile Val Leu Leu Lys Gly  
1 5 10 15

Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Arg Gly Gly Leu Val Gln  
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Ser Asn Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ala His Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His  
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
85 90 95

Lys Ser Ser Val Phe Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr  
100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Gly Ser Asn Tyr Val Phe Ala Phe Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
130 135

10

<210> 35

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> señal más-aminoácidos de VH de 3B7-3-3

<400> 35

ES 2 720 401 T3

Met Gly Trp Asn Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly  
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys  
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Ser Phe  
35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Asp Lys Ser Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ser Pro Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Asn  
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Arg Gly Ala Phe Tyr Phe Asp Tyr TrpGly Gln  
115 120 125

5

Gly Thr Ala Leu Thr Val Ser Ser  
130 135

<210> 36

10 <211> 384

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> 6D10-1-1 VL

<400> 36

atgatgtcct ctgctcagtt ccttggtctc ctgttgctct gttttcaagg taccagatgt 60

gatatccaga tgacacagat tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 120

atcagttgca gtgcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 180

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcaga agtcccatcg 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 300

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatattaacc ttccgctcac gttcgggtgct 360

gggaccaagc tggagctgaa acgg 384

20 <210> 37

<211> 396

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> 10D5-2-3 VL

<400> 37

ES 2 720 401 T3

atggagaaag acacactcct gctatgggtc ctgcttctct gggttccagg ttccacaggt 60  
gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120  
atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 180  
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 240  
ggggtccttg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 300  
cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcaac aaagtaagga ggttccgtgg 360  
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aagcgg 396

<210> 38  
<211> 387  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> 3B7-3-3 VL

<400> 38  
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaata ga gtcctcagt cataatgtcc 60  
aggggacaaa ttgttctcac ccagctccca gcaactcatgt ctgcatttcc aggggagaag 120  
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtgagttaca tgtactggta ccagcagaag 180  
ccaagatcct cccccaaacc ctggatttat ctcatatcca acctggcttc tggagtcctt 240  
actcgttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 300  
gctgaagatg ctgccactta tttctgccag cagtggagta gtaatccacg gacgttcggt 360  
ggaggcacca agctggaaat caaacgg 387

<210> 39  
15 <211> 128  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
20 <223> señal más-aminoácidos de VL de 6D10-1-1

<400> 39

ES 2 720 401 T3

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ile Thr Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val  
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Glu Val Pro Ser  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile  
 100 105 110

Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 115 120 125

<210> 40  
 <211> 132  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> señal más-aminoácidos de VL de 10D5-2-3

10 <400> 40

ES 2 720 401 T3

Met Glu Lys Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala  
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser  
35 40 45

Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro  
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser  
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys  
100 105 110

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

Glu Ile Lys Arg  
130

<210> 41

<211> 129

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> señal más-aminoácidos de VL de 3B7-3-3 VL

<400> 41

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Met Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu  
20 25 30

Met Ser Ala Phe Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
35 40 45

ES 2 720 401 T3

Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser  
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Trp  
100 105 110

Ser Ser Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

Arg

5 <210> 42  
<211> 360  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Señal menos de VH de 6D10-1-1 VH

<400> 42  
cagggtccagc tgcagcagtc tggagctgag ctggtaaggc ctgggacttc agtgaaggtg 60  
tcctgcaagg cttctggata cgccttcact aattacttga tggagtggat taagcagagg 120  
cctggacagg gccttgagtg gattggagtg attcatcctg gaattggtgt tactaactac 180  
aatgagaagt tcaagggcaa ggcaacactg actgcagaca tctcctccag tactgcctac 240  
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggctt atttctgtgc aagaagggtc 300  
aactgggacc tgtactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

15 <210> 43  
<211> 357  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Señal menos de VH de 10D5-2-3

<400> 43  
gaagtgaagc ttgaggagtc tagaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 60  
tcctgtgttg cctctggatt cactttcagt aactactgga tgaactgggt ccgccagtct 120  
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctcac attagattaa aatctgataa ttatgcaaca 180  
cattatgagg agtctgtgag agggaggttc actatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240  
gtcttcctgc aaatgaacaa cttaagggtc gaagacactg gaatttatta ctgcacagga 300  
25 ggaagtaact acgtgtttgc tttctggggc caagggactc tggctactgt ctctgca 357

30 <210> 44  
<211> 351  
<212> ADN  
<213> Artificial

ES 2 720 401 T3

<220>

<223> Señal menos de VH de 3B7-3-3

<400> 44

gagggtccagc tgcagcagtc tagacctgaa ttggtgaagc ctggggcttc agtgaagatc 60  
 tcctgcaagg cctctgatta ctcatctact gactactaca tgaactgggt gaagcaaagc 120  
 cctgacaaga gccttgagtg gattggagag attagtccta gctctggtgg tactacctac 180  
 aaccagaagt tcaaggccaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca agagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aactaggggg 300  
 5 gccttctact ttgactactg gggccaaggc accgctctca cagtctcctc a 351

<210> 45

<211> 324

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Señal menos de VL de 6D10-1-1

15 <400> 45

gatatccaga tgacacagat tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60  
 atcagttgca gtgcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120  
 gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcaga agtcccatcg 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240  
 gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatattaacc ttccgctcac gttcgggtgct 300  
 gggaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 46

<211> 336

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Señal menos de VL de 10D5-2-3

25 <400> 46

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatcaa ccaaggatcc 180  
 ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggtg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240  
 cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcaac aaagtaagga ggttccgtgg 300  
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aagcgg 336

30 <210> 47

<211> 321

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Señal menos de VL de 3B7-3-3

<400> 47

ES 2 720 401 T3

caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ttccagggga gaagtcacc 60  
atgacctgca gtgccagctc aagtgtgagt tacatgtact ggtaccagca gaagccaaga 120  
tcctccccc aacctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctactcgc 180  
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240  
gatgctgcca cttatttctg ccagcagtgg agtagtaatc cacggacgtt cgggtggaggc 300  
accaagctgg aaatcaaacg g 321

<210> 48  
<211> 120  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> señal menos-aminoácidos de VH de 6D10-1-1

<400> 48  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30  
Leu Met Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Val Ile His Pro Gly Ile Gly Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Arg Arg Ala Asn Trp Asp Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 49  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> señal menos-aminoácidos de VH de 10D5-2-3

<400> 49

ES 2 720 401 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

Val Phe Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 50  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> señal menos-aminoácidos de VH de 3B7-3-3

<400> 50  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Asp Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

ES 2 720 401 T3

- <210> 51  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial
- <220>  
 <223> señal menos-aminoácidos de VL de 6D10-1-1
- 10 <400> 51  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ile Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Leu Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105
- 15 <210> 52  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artificial
- 20 <220>  
 <223> Señal menos-aminoácidos de VL de 10D5-2-3  
 <400> 52

ES 2 720 401 T3

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala  
50 55 60

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

<210> 53  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Señal menos-aminoácidos de VL de 3B7-3-3

10

<400> 53  
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Phe Pro Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

15

<210> 54  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>

ES 2 720 401 T3

<223> CDR1 de VH de 6D10-1-1

<400> 54  
Asn Tyr Leu Met Glu  
1 5

5 <210> 55  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> CDR2 de VH de 6D10-1-1

<400> 55  
Val Ile His Pro Gly Ile Gly Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

15 Gly

<210> 56  
<211> 11  
<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>  
<223> CDR3 de VH de 6D10-1-1

25 <400> 56  
Arg Ala Asn Trp Asp Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 57  
<211> 11  
<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>  
<223> CDR1 de VL de 6D10-1-1

35 <400> 57  
Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 58  
<211> 7  
<212> PRT

40 <213> Artificial

<220>  
<223> CDR2 de VL de 6D10-1-1

45 <400> 58  
Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser  
1 5

50 <210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> CDR3 de VL de 6D10-1-1

<400> 59

ES 2 720 401 T3

Gln Gln Tyr Ile Asn Leu Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 60  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> CDR1 de VH de 10D5-2-3  
 10 <400> 60  
 Asn Tyr Trp Met Asn  
 1 5  
 <210> 61  
 15 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> CDR2 de VH de 10D5-2-3  
 <400> 61  
 His Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser  
 1 5 10 15  
 Val Arg Gly  
 25 <210> 62  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> CDR3 de VH de 10D5-2-3  
 <400> 62  
 Gly Ser Asn Tyr Val Phe Ala Phe  
 35 1 5  
 <210> 63  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 40 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> CDR1 de VL de 10D5-2-3  
 45 <400> 63  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn  
 1 5 10 15  
 <210> 64  
 <211> 7  
 50 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> CDR2 de VL de 10D5-2-3  
 55 <400> 64  
 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
 1 5  
 <210> 65  
 60 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de VL de 10D5-2-3

5

<400> 65

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 66

10

<211> 429

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Met Cys Pro Gly Ala Leu Trp Val Ala Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu  
1 5 10 15

Ala Gly Ser Leu Gln Gly Lys Pro Leu Gln Ser Trp Gly Arg Gly Ser  
20 25 30

Ala Gly Gly Asn Ala His Ser Pro Leu Gly Val Pro Gly Gly Gly Leu  
35 40 45

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

Asp Phe Leu Arg Ser Leu Asn Leu Ser Gly Val Pro Ser Gln Asp Lys  
65 70 75 80

Thr Arg Val Glu Pro Pro Gln Tyr Met Ile Asp Leu Tyr Asn Arg Tyr  
85 90 95

Thr Ser Asp Lys Ser Thr Thr Pro Ala Ser Asn Ile Val Arg Ser Phe  
100 105 110

Ser Met Glu Asp Ala Ile Ser Ile Thr Ala Thr Glu Asp Phe Pro Phe  
115 120 125

Gln Lys His Ile Leu Leu Phe Asn Ile Ser Ile Pro Arg His Glu Gln  
130 135 140

Ile Thr Arg Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Val Ser Cys Gln Asn His Val  
145 150 155 160

Asp Pro Ser His Asp Leu Lys Gly Ser Val Val Ile Tyr Asp Val Leu  
165 170 175

Asp Gly Thr Asp Ala Trp Asp Ser Ala Thr Glu Thr Lys Thr Phe Leu  
180 185 190

15

Val Ser Gln Asp Ile Gln Asp Glu Gly Trp Glu Thr Leu Glu Val Ser  
195 200 205

ES 2 720 401 T3

Ser Ala Val Lys Arg Trp Val Arg Ser Asp Ser Thr Lys Ser Lys Asn  
 210 215 220

Lys Leu Glu Val Thr Val Glu Ser His Arg Lys Gly Cys Asp Thr Leu  
 225 230 235 240

Asp Ile Ser Val Pro Pro Gly Ser Arg Asn Leu Pro Phe Phe Val Val  
 245 250 255

Phe Ser Asn Asp His Ser Ser Gly Thr Lys Glu Thr Arg Leu Glu Leu  
 260 265 270

Arg Glu Met Ile Ser His Glu Gln Glu Ser Val Leu Lys Lys Leu Ser  
 275 280 285

Lys Asp Gly Ser Thr Glu Ala Gly Glu Ser Ser His Glu Glu Asp Thr  
 290 295 300

Asp Gly His Val Ala Ala Gly Ser Thr Leu Ala Arg Arg Lys Arg Ser  
 305 310 315 320

Ala Gly Ala Gly Ser His Cys Gln Lys Thr Ser Leu Arg Val Asn Phe  
 325 330 335

Glu Asp Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Lys Glu Tyr Glu  
 340 345 350

Ala Tyr Glu Cys Lys Gly Gly Cys Phe Phe Pro Leu Ala Asp Asp Val  
 355 360 365

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Lys Phe  
 370 375 380

Pro Thr Lys Val Gly Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro  
 385 390 395 400

Ile Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp Met Gly Val Pro Thr Leu Lys Tyr  
 405 410 415

His Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu Cys Gly Cys Arg  
 420 425

<210> 67  
 <211> 110  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> aminoácidos de región madura de hBMP9

10 <400> 67

ES 2 720 401 T3

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

<210> 68  
 <211> 1290  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 68  
 atgtgtcctg gggcactgtg ggtggccctg ccctgctgt cctgctggc tggtcccta 60  
 caggggaagc cactgcagag ctggggacga ggtctgctg ggggaaacgc ccacagccca 120  
 ctgggggtgc ctggaggtg gctgcctgag cacacctca acctgaagat gtttctggag 180  
 aacgtgaagg tggatttct ggcagcctt aacctgagt gggcccttc gcaggacaaa 240  
 accaggtgg agccgccga gtacatgatt gacctgtaca acaggtacac gtccgataag 300  
 tcgactacgc cagcgtccaa cattgtgctg agcttcagca tggaagatgc catctccata 360  
 actgccacag aggacttccc cttccagaag cacatcttgc tcttcaacat ctccattcct 420  
 aggcattgagc agatcaccag agctgagctc cgactctatg tctcctgtca aaatcacgtg 480  
 gaccctctc atgacctgaa aggaagcgtg gtcatttatg atgttctgga tggaacagat 540  
 gcctgggata gtgctacaga gaccaagacc ttcctggtgt cccaggacat tcaggatgag 600  
 ggctgggaga ccttgggaagt gtccagcgcg gtgaagcgtt gggctcggtc cgactccacc 660  
 aagagcaaaa ataagctgga agtgactgtg gagagccaca ggaagggtg cgacacgctg 720

5

10

ES 2 720 401 T3

gacatcagtg tccccccagc ttccagaaac ctgcccttct ttgttgcttt ctccaatgac 780  
cacagcagtg ggaccaagga gaccaggctg gagctgaggg agatgatcag ccatgaacaa 840  
gagagcgtgc tcaagaagct gtccaaggac ggctccacag aggcaggtga gagcagtcac 900  
gaggaggaca cggatggcca cgtggctgcg gggctgactt tagccaggcg gaaaaggagc 960  
gccggggctg gcagccactg tcaaaagacc tccctgcggg taaacttcga ggacatcggc 1020  
tgggacagct ggatcattgc acccaaggag tatgaagcct acgagtgtaa gggcggctgc 1080  
ttcttccctt tggctgacga tgtgacgccg acgaaacacg ctatcgtgca gaccctggtg 1140  
catctcaagt tccccacaaa ggtgggcaag gcctgctgtg tgcccaccaa actgagcccc 1200  
atctccgtcc tctacaagga tgacatgggg gtgcccaccc tcaagtacca ttacgagggc 1260  
atgagcgtgg cagagtgtgg gtgcaggtag 1290

<210> 69  
<211> 333  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Región madura de hBMP9

<400> 69  
agcgcggggg ctggcagcca ctgtcaaaag acctccctgc gggtaaactt cgaggacatc 60  
ggctgggaca gctggatcat tgcaccaag gagtatgaag cctacgagtg taaggcgggc 120  
tgcttcttcc ccttggctga cgatgtgagc ccgacgaaac acgctatcgt gcagaccctg 180  
gtgcatctca agttccccac aaaggtgggc aaggcctgct gtgtgcccac caaactgagc 240  
cccatctccg tcctctacaa ggatgacatg ggggtgccca ccctcaagta ccattacgag 300  
ggcatgagcg tggcagagtg tgggtgcagg tag 333

<210> 70  
15 <211> 1038  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70  
Met Thr Ser Ser Leu Gln Arg Pro Trp Arg Val Pro Trp Leu Pro Trp  
1 5 10 15  
  
Thr Ile Leu Leu Val Ser Thr Ala Ala Ala Ser Gln Asn Gln Glu Arg  
20 25 30  
  
Leu Cys Ala Phe Lys Asp Pro Tyr Gln Gln Asp Leu Gly Ile Gly Glu  
35 40 45  
  
20 Ser Arg Ile Ser His Glu Asn Gly Thr Ile Leu Cys Ser Lys Gly Ser



ES 2 720 401 T3

Ala His Ser Val Thr Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His Thr Glu Leu Pro  
 305 310 315 320

Arg Gly Asp His Tyr Lys Pro Ala Ile Ser His Arg Asp Leu Asn Ser  
 325 330 335

Arg Asn Val Leu Val Lys Asn Asp Gly Thr Cys Val Ile Ser Asp Phe  
 340 345 350

Gly Leu Ser Met Arg Leu Thr Gly Asn Arg Leu Val Arg Pro Gly Glu  
 355 360 365

Glu Asp Asn Ala Ala Ile Ser Glu Val Gly Thr Ile Arg Tyr Met Ala  
 370 375 380

Pro Glu Val Leu Glu Gly Ala Val Asn Leu Arg Asp Cys Glu Ser Ala  
 385 390 395 400

Leu Lys Gln Val Asp Met Tyr Ala Leu Gly Leu Ile Tyr Trp Glu Ile  
 405 410 415

Phe Met Arg Cys Thr Asp Leu Phe Pro Gly Glu Ser Val Pro Glu Tyr  
 420 425 430

Gln Met Ala Phe Gln Thr Glu Val Gly Asn His Pro Thr Phe Glu Asp  
 435 440 445

Met Gln Val Leu Val Ser Arg Glu Lys Gln Arg Pro Lys Phe Pro Glu  
 450 455 460

Ala Trp Lys Glu Asn Ser Leu Ala Val Arg Ser Leu Lys Glu Thr Ile  
 465 470 475 480

Glu Asp Cys Trp Asp Gln Asp Ala Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys  
 485 490 495

Ala Glu Glu Arg Met Ala Glu Leu Met Met Ile Trp Glu Arg Asn Lys  
 500 505 510

Ser Val Ser Pro Thr Val Asn Pro Met Ser Thr Ala Met Gln Asn Glu  
 515 520 525

Arg Asn Leu Ser His Asn Arg Arg Val Pro Lys Ile Gly Pro Tyr Pro  
 530 535 540

Asp Tyr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Asp Ser Ile His His Thr Asp  
 545 550 555 560

ES 2 720 401 T3

Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Ser Glu His Ser Met Ser Ser Thr Pro  
565 570 575

Leu Thr Ile Gly Glu Lys Asn Arg Asn Ser Ile Asn Tyr Glu Arg Gln  
580 585 590

Gln Ala Gln Ala Arg Ile Pro Ser Pro Glu Thr Ser Val Thr Ser Leu  
595 600 605

Ser Thr Asn Thr Thr Thr Thr Asn Thr Thr Gly Leu Thr Pro Ser Thr  
610 615 620

Gly Met Thr Thr Ile Ser Glu Met Pro Tyr Pro Asp Glu Thr Asn Leu  
625 630 635 640

His Thr Thr Asn Val Ala Gln Ser Ile Gly Pro Thr Pro Val Cys Leu  
645 650 655

Gln Leu Thr Glu Glu Asp Leu Glu Thr Asn Lys Leu Asp Pro Lys Glu  
660 665 670

Val Asp Lys Asn Leu Lys Glu Ser Ser Asp Glu Asn Leu Met Glu His  
675 680 685

Ser Leu Lys Gln Phe Ser Gly Pro Asp Pro Leu Ser Ser Thr Ser Ser  
690 695 700

Ser Leu Leu Tyr Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Ala Thr Gly Gln  
705 710 715 720

Gln Asp Phe Thr Gln Thr Ala Asn Gly Gln Ala Cys Leu Ile Pro Asp  
725 730 735

Val Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Pro Leu Pro Lys Gln Gln Asn Leu Pro  
740 745 750

Lys Arg Pro Thr Ser Leu Pro Leu Asn Thr Lys Asn Ser Thr Lys Glu  
755 760 765

Pro Arg Leu Lys Phe Gly Ser Lys His Lys Ser Asn Leu Lys Gln Val  
770 775 780

Glu Thr Gly Val Ala Lys Met Asn Thr Ile Asn Ala Ala Glu Pro His  
785 790 795 800

Val Val Thr Val Thr Met Asn Gly Val Ala Gly Arg Asn His Ser Val  
805 810 815

ES 2 720 401 T3

Asn Ser His Ala Ala Thr Thr Gln Tyr Ala Asn Gly Thr Val Leu Ser  
820 825 830

Gly Gln Thr Thr Asn Ile Val Thr His Arg Ala Gln Glu Met Leu Gln  
835 840 845

Asn Gln Phe Ile Gly Glu Asp Thr Arg Leu Asn Ile Asn Ser Ser Pro  
850 855 860

Asp Glu His Glu Pro Leu Leu Arg Arg Glu Gln Gln Ala Gly His Asp  
865 870 875 880

Glu Gly Val Leu Asp Arg Leu Val Asp Arg Arg Glu Arg Pro Leu Glu  
885 890 895

Gly Gly Arg Thr Asn Ser Asn Asn Asn Asn Ser Asn Pro Cys Ser Glu  
900 905 910

Gln Asp Val Leu Ala Gln Gly Val Pro Ser Thr Ala Ala Asp Pro Gly  
915 920 925

Pro Ser Lys Pro Arg Arg Ala Gln Arg Pro Asn Ser Leu Asp Leu Ser  
930 935 940

Ala Thr Asn Val Leu Asp Gly Ser Ser Ile Gln Ile Gly Glu Ser Thr  
945 950 955 960

Gln Asp Gly Lys Ser Gly Ser Gly Glu Lys Ile Lys Lys Arg Val Lys  
965 970 975

Thr Pro Tyr Ser Leu Lys Arg Trp Arg Pro Ser Thr Trp Val Ile Ser  
980 985 990

Thr Glu Ser Leu Asp Cys Glu Val Asn Asn Asn Gly Ser Asn Arg Ala  
995 1000 1005

Val His Ser Lys Ser Ser Thr Ala Val Tyr Leu Ala Glu Gly Gly  
1010 1015 1020

Thr Ala Thr Thr Met Val Ser Lys Asp Ile Gly Met Asn Cys Leu  
1025 1030 1035

<210> 71  
<211> 503  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 71

ES 2 720 401 T3

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala  
 1 5 10 15

Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val  
 20 25 30

Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly  
 35 40 45

Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln  
 50 55 60

Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg  
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn  
 85 90 95

His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln  
 100 105 110

Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala  
 115 120 125

Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Leu Gly Leu Trp His Val Arg  
 130 135 140

Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser  
 145 150 155 160

Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Ser Met Leu Gly Asp  
 165 170 175

Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe  
 180 185 190

Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val  
 195 200 205

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu  
 210 215 220

Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe  
 225 230 235 240

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile



ES 2 720 401 T3

	<400> 72 acgccatcac agatctcacc atgatgtcct ctgctcagtt c	41
5	<210> 73 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador Rv de LC de 6D10-1-1 LC	
15	<400> 73 cagcatcagc cgtacgttc agtccagct tggtc	35
20	<210> 74 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador Fwd de HC de 6D10-1-1	
30	<400> 74 acacagacc gtcgaccacc atggaatgga gcagagtct	40
35	<210> 75 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador Rv de HC de 6D10-1-1	
45	<400> 75 tcgtttggc gctagctgag gagactgtga gagggtg	38
50	<210> 76 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador Fwd de LC de 10D5-2-3	
60	<400> 76 acgccatcac agatctcacc atggagaaag acacactcct g	41
65	<210> 77 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Cebador Rv de LC de 10D5-2-3	
75	<400> 77 cagcatcagc cgtacgcttg attccagct tgggcctc	39
80	<210> 78 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<220> <223> Cebador Fwd de HC de 10D5-2-3	

ES 2 720 401 T3

	<400> 78		
	acacagaccg gtcgaccacc atggactga gactgagctg		40
5	<210> 79		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador Fwd de HC de 10D5-2-3		
	<400> 79		
15	tcgttttggc gctagctgca gagacagtga ccagag		36
	<210> 80		
	<211> 324		
	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
20	<400> 80		
	cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc ttcccacat ccagtgagca gttaacatct		60
	ggagtgacct cagtogtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag		120
	tggaagattg atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac		180
	agcaaagaca gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa		240
	cgacataaca gctatacctg tgaggccact cacaagacat caacttcacc cattgtcaag		300
	agcttcaaca ggaatgagtg ttga		324
	<210> 81		
25	<211> 975		
	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
	<400> 81		
30	gccaaaaacga caccoccatc tgtctatcca ctggccctg gatctgctgc ccaaactaac		60

ES 2 720 401 T3

tccatggtga ccctgggatg cctgggtcaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc 120  
 tggaactctg gctccctgtc cagcgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct ggagtctgac 180  
 ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagcc ctcggccag cgagaccgtc 240  
 acctgcaacg ttgccacccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaat tgtgcccagg 300  
 gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc 360  
 cccccaaagc ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaagggtcac gtgtgttgtg 420  
 gtagacatca gcaaggatga tcccagagtc cagttcagct ggttttaga tgatgtggag 480  
 gtgcacacag ctgagcgcga accccgggag gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc 540  
 agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttaa atgcagggtc 600  
 aacagtgcag ctttccctgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa aggcagaccg 660  
 aaggctccac aggtgtacac cattccacct cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc 720  
 agtctgacct gcatgataac agacttcttc cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtg 780  
 aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac actcagccca tcatgaacac gaatggctct 840  
 tacttctgtc acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatactttc 900  
 acctgctctg tgttacatga gggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac 960  
 tctcctggta aatga 975

<210> 82

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador Fwd de CR de ratón kappa

<400> 82

gtacggctga tgctcacca actg 24

<210> 83

15 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador Rv de CR de ratón kappa

<400> 83

taacgatct gaattcaaca ctattctg ttgaag 36

<210> 84

25 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador Fwd de CR de IgG1 de ratón

<400> 84

35 ctacgcca aacgacccc ccatctgtc 29

<210> 85

<211> 38

<212> ADN

ES 2 720 401 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Rv de CR de IgG1 de ratón

5

<400> 85  
aaccgtaac ggatcctcat ttaccaggag agtgggag 38

<210> 86

10 <211> 36  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Región C de BMP9 humana

<400> 86  
Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp Met  
1 5 10 15

Gly Val Pro Thr Leu Lys Tyr His Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu  
20 25 30

Cys Gly Cys Arg  
35

20 <210> 87  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Región C de quimera-1 de BMP9/BMP10 humana

<400> 87  
Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Tyr Leu Asp Lys Gly  
1 5 10 15

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

Gly Cys Arg  
35

30 <210> 88  
<211> 36  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Región C de quimera-2 de BMP9/BMP10 humana

<400> 88  
Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Lys Asp Asp Met  
1 5 10 15

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

Cys Gly Cys Arg  
35

40

ES 2 720 401 T3

<210> 89  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Región C de quimera-3 de BMP9/BMP10 humana  
 <400> 89  
 Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp Met  
 1 5 10 15  
 Gly Val Pro Thr Leu Lys Tyr His Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu  
 20 25 30  
 Cys Gly Cys Arg  
 35  
 10  
 <210> 90  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Región C de quimera-4 de BMP9/BMP10 humana  
 20  
 <400> 90  
 Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu Cys  
 20 25 30  
 Gly Cys Arg  
 35  
 25  
 <210> 91  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Región C de quimera-5 de BMP9/BMP10 humana  
 <400> 91  
 Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Lys Asp Asp Met  
 1 5 10 15  
 Gly Val Pro Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu  
 20 25 30  
 Cys Gly Cys Arg  
 35  
 35  
 <210> 92  
 <211> 86  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>

ES 2 720 401 T3

<223> Cebador de quimera 1

<400> 92  
**caaaggtggg caaggcctgc tgtgtgccca ccaaactgag ccccatctcc gtcctctact** 60

5 **tagataaagg ggtggtcacc ctcaag** 86

<210> 93  
 <211> 86  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador de quimera 2

<400> 93  
**caaaggtggg caaggcctgc tgtgtgccca ccaaactgag ccccatctcc atcctctaca** 60

15 **aggatgacat gggggtgccc acctac** 86

<210> 94  
 <211> 86  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador de quimera 3

25 <400> 94  
**caaaggtggg caaggcctgc tgtgtgccca ccaaactgga gcccatctcc gtcctctaca** 60

**aggatgacat gggggtgccc accctc** 86

30 <210> 95  
 <211> 86  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador de quimera 4

<400> 95  
**caaaggtggg caaggcctgc tgtgtgccca ccaaactgag ccccatctcc atcctctact** 60

40 **tagataaagg ggtggtcacc tacaag** 86

<210> 96  
 <211> 86  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador de quimera 5

<400> 96  
**caaaggtggg caaggcctgc tgtgtgccca ccaaactgga gcccatctcc atcctctaca** 60

50 **aggatgacat gggggtgccc acctac** 86

<210> 97  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Cebador de quimera 6

ES 2 720 401 T3

<400> 97  
 tcatgtctcg ctcgagctac ctgcacccac actctgccac gctcatgccc tcgtaatggt 60  
 acttgagggt gaccacccc 79

5 <210> 98  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador de quimera 7

<400> 98  
 tcatgtctcg ctcgagctac ctgcacccac actctgccac gctcatgccc tcgtatttaa 60  
 acttgtaggt gggcacccc 79

15 <210> 99  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador de quimera 8

<400> 99  
 tcatgtctcg ctcgagctac ctgcacccac actcggacac ggccatgccc tcgtaatggt 60  
 acttgagggt gggcacccc 79

25 <210> 100  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador de quimera 9

<400> 100  
 tcatgtctcg ctcgagctac ctgcacccac actctgccac gctcatgccc tcgtatttaa 60  
 acttgtaggt gaccacccc 79

35 <210> 101  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador de quimera 10

45 <400> 101  
 tcatgtctcg ctcgagctac ctgcacccac actcggacac ggccatgccc tcgtatttaa 60  
 acttgtaggt gggcacccc 79

50 <210> 102  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Cebador Fwd-1 de BMP10 humana

<400> 102  
 cccgggatcc gctagcggc caccatggc tctctgtcc tgac 44

## ES 2 720 401 T3

5	<210> 103 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador Rv-1 de BMP10 humana	
10	<400> 103 gatgggcta tggatgatgatgatggcc agaaaccaag taag	44
	<210> 104 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador Fwd-2 de BMP10 humana	
20	<400> 104 cacatagcc ccatcatgaa cctagagcag tc	32
	<210> 105 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador Rv-2 de BMP10 humana	
30	<400> 105 tcatgtctcg ctcgagctat ctacagccac attcggagac	40
	<210> 106 <211> 424 <212> PRT <213> Homo sapiens	
35	<400> 106	
40	<400> 106	

ES 2 720 401 T3

Met Gly Ser Leu Val Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

Tyr Leu Val Ser Gly Ser Pro Ile Met Asn Leu Glu Gln Ser Pro Leu  
 20 25 30

Glu Glu Asp Met Ser Leu Phe Gly Asp Val Phe Ser Glu Gln Asp Gly  
 35 40 45

Val Asp Phe Asn Thr Leu Leu Gln Ser Met Lys Asp Glu Phe Leu Lys  
 50 55 60

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

Pro Pro Glu Tyr Met Leu Glu Leu Tyr Asn Lys Phe Ala Thr Asp Arg  
 85 90 95

Thr Ser Met Pro Ser Ala Asn Ile Ile Arg Ser Phe Lys Asn Glu Asp  
 100 105 110

Leu Phe Ser Gln Pro Val Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu  
 115 120 125

ES 2 720 401 T3

Leu Phe Asn Val Ser Ile Pro His His Glu Glu Val Ile Met Ala Glu  
 130 135 140

Leu Arg Leu Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp Arg Met Ile Tyr Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Asp Arg Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Gly Asp  
 165 170 175

Asn Glu Gly Glu Arg Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr  
 180 185 190

Gly Thr Asn Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg  
 195 200 205

Arg Trp Gln Lys Ser Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile  
 210 215 220

Glu Ser Lys His Asp Glu Ala Glu Asp Ala Ser Ser Gly Arg Leu Glu  
 225 230 235 240

Ile Asp Thr Ser Ala Gln Asn Lys His Asn Pro Leu Leu Ile Val Phe  
 245 250 255

Ser Asp Asp Gln Ser Ser Asp Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asn Glu  
 260 265 270

Met Ile Ser His Glu Gln Leu Pro Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu Asp  
 275 280 285

Ser Phe Ser Ser Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser  
 290 295 300

Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg Asn Ala Lys Gly  
 305 310 315 320

Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gly  
 325 330 335

Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu Ala Tyr Glu Cys  
 340 345 350

Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu Thr Pro Thr Lys  
 355 360 365

His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn Ser Gln Lys Ala  
 370 375 380

Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu  
 385 390 395 400

Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met  
 405 410 415

Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg  
 420

ES 2 720 401 T3

<210> 107  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> aminoácidos de región madura de hBMP10

<400> 107  
 Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe  
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu  
 20 25 30

Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu  
 35 40 45

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn  
 50 55 60

Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

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

10

Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg  
 100 105

<210> 108  
 <211> 1275  
 <212> ADN

15

<213> Homo sapiens

<400> 108  
 atgggctctc tggctcctgac actgtgcgct cttttctgcc tggcagctta cttggtttct 60  
 ggcagcccca tcatgaacct agagcagtct cctctggaag aagatatgtc cctctttggt 120  
 gatgttttct cagagcaaga cgggtgctgac ttaacacac tgctccagag catgaaggat 180

ES 2 720 401 T3

gagtttctta agacactaaa cctctctgac atccccacgc aggattcagc caaggtggac 240  
 ccaccagagt acatggttga actctacaac aaatttgcaa cagatcggac ctccatgccc 300  
 tctgccaaca tcattaggag tttcaagaat gaagatctgt tttcccagcc ggtcagtttt 360  
 aatgggctcc gaaaataccc cctcctcttc aatgtgtcca ttcctcacca tgaagaggtc 420  
 atcatggctg aacttaggct atacacactg gtgcaaaggg atcgtatgat atacgatgga 480  
 gtagaccgga aaattaccat ttttgaagtg ctggagagca aaggggataa tgaggggaaa 540  
 agaaacatgc tggctcttgg gtctggggag atatatggaa ccaacagtga gtgggagact 600  
 tttgatgtca cagatgccat cagacgttgg caaaagtcag gctcatccac ccaccagctg 660  
 gaggtccaca ttgagagcaa acacgatgaa gctgaggatg ccagcagtgg acggctagaa 720  
 atagatacca gtgcccagaa taagcataac cctttgctca tcgtgttttc tgatgaccaa 780  
 agcagtgaca aggagaggaa ggaggaactg aatgaaatga tttcccatga gcaacttcca 840  
 gagctggaca acttgggcct ggatagcttt tccagtggac ctggggaaga ggctttggtg 900  
 cagatgagat caaacatcat ctatgactcc actgccgaa tcagaaggaa cgccaaagga 960  
 aactactgta agaggacccc gctctacatc gacttcaagg agattgggtg ggactcctgg 1020  
 atcatcgctc cgcttgata cgaagcctat gaatgccgtg gtgtttgtaa ctaccccctg 1080  
 gcagagcatc tcacaccac aaagcatgca attatccagg ccttggcca cctcaagaat 1140  
 tcccagaaag cttccaaagc ctgctgtgtg cccacaaagc tagagcccat ctccatcctc 1200  
 tatttagaca aaggogtctg cacctacaag tttaaatagc aaggcatggc cgtctccgaa 1260  
 tgtggctgta gatag 1275

<210> 109  
 <211> 327  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región madura de hBMP10

10 <400> 109  
 aacgccaaag gaaactactg taagaggacc ccgctctaca tcgacttcaa ggagattggg 60  
 tgggactcct ggatcategc tccgcctgga tacgaagcct atgaatgccg tgggttttgt 120  
 aactacccc tggcagagca tctcacacc acaagcatg caattatcca ggccttggtc 180  
 cacctcaaga attcccagaa agcttccaaa gcctgctgtg tgcccacaaa gctagagccc 240  
 atctccatcc tctatctaga caaaggcgtc gtcacctaca agtttaata cgaaggcatg 300  
 gccgtctccg aatgtggctg tagatag 327

15 <210> 110  
 <211> 430  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> aminoácidos de pLN1V5\_hBMP10

<400> 110

ES 2 720 401 T3

Met Gly Ser Leu Val Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

Tyr Leu Val Ser Gly His His His His His Ser Pro Ile Met Asn  
 20 25 30

Leu Glu Gln Ser Pro Leu Glu Glu Asp Met Ser Leu Phe Gly Asp Val  
 35 40 45

Phe Ser Glu Gln Asp Gly Val Asp Phe Asn Thr Leu Leu Gln Ser Met  
 50 55 60

Lys Asp Glu Phe Leu Lys Thr Leu Asn Leu Ser Asp Ile Pro Thr Gln  
 65 70 75 80

Asp Ser Ala Lys Val Asp Pro Pro Glu Tyr Met Leu Glu Leu Tyr Asn  
 85 90 95

Lys Phe Ala Thr Asp Arg Thr Ser Met Pro Ser Ala Asn Ile Ile Arg  
 100 105 110

Ser Phe Lys Asn Glu Asp Leu Phe Ser Gln Pro Val Ser Phe Asn Gly  
 115 120 125

Leu Arg Lys Tyr Pro Leu Leu Phe Asn Val Ser Ile Pro His His Glu  
 130 135 140

Glu Val Ile Met Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp  
 145 150 155 160

Arg Met Ile Tyr Asp Gly Val Asp Arg Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val  
 165 170 175

Leu Glu Ser Lys Gly Asp Asn Glu Gly Glu Arg Asn Met Leu Val Leu  
 180 185 190

Val Ser Gly Glu Ile Tyr Gly Thr Asn Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp  
 195 200 205

Val Thr Asp Ala Ile Arg Arg Trp Gln Lys Ser Gly Ser Ser Thr His  
 210 215 220

ES 2 720 401 T3

Gln Leu Glu Val His Ile Glu Ser Lys His Asp Glu Ala Glu Asp Ala  
225 230 235 240

Ser Ser Gly Arg Leu Glu Ile Asp Thr Ser Ala Gln Asn Lys His Asn  
245 250 255

Pro Leu Leu Ile Val Phe Ser Asp Asp Gln Ser Ser Asp Lys Glu Arg  
260 265 270

Lys Glu Glu Leu Asn Glu Met Ile Ser His Glu Gln Leu Pro Glu Leu  
275 280 285

Asp Asn Leu Gly Leu Asp Ser Phe Ser Ser Gly Pro Gly Glu Glu Ala  
290 295 300

Leu Leu Gln Met Arg Ser Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile  
305 310 315 320

Arg Arg Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile  
325 330 335

Asp Phe Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly  
340 345 350

Tyr Glu Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu  
355 360 365

His Leu Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu  
370 375 380

Lys Asn Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu  
385 390 395 400

Glu Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys  
405 410 415

Phe Lys Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg  
420 425 430

<210> 111

<211> 1293

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pLN1V5\_hBMP10

10

<400> 111

atgggctctc tggctctgac actgtgcgct cttttctgcc tggcagctta cttggtttct

60

ES 2 720 401 T3

ggccatcatc accatcacca tagcccatc atgaacctag agcagtctcc tctggaagaa 120  
gatatgtccc tctttggtga tgttttctca gagcaagacg gtgtcgactt taacacactg 180  
ctccagagca tgaaggatga gtttcttaag aactaaacc tctctgacat ccccacgcag 240  
gattcagcca aggtggaccc accagagtac atgttggaac tctacaacaa atttgcaaca 300  
gatcggacct ccatgccctc tgccaacatc attaggagt tcaagaatga agatctgttt 360  
tcccagccgg tcagttttaa tgggctccga aaataccccc tcctcttcaa tgtgtccatt 420  
cctcaccatg aagaggatc catggctgaa cttaggctat acacactggt gcaaagggat 480  
cgtatgatata acgatggagt agaccggaaa attaccattt ttgaagtgct ggagagcaaa 540  
ggggataatg agggagaaa aaacatgctg gtcttgggtgt ctggggagat atatggaacc 600  
aacagtgagt gggagacttt tgatgtcaca gatgccatca gacgttgca aaagtcaaggc 660  
tcatccacc accagctgga ggtccacatt gagagcaaac acgatgaagc tgaggatgcc 720  
agcagtggac ggctagaaat agataccagt gccagaata agcataacc tttgctcatc 780  
gtgtttctg atgaccaaag cagtgacaag gagaggaagg aggaactgaa tgaatgatt 840  
tccatgagc aacttccaga gctggacaac ttggcctgg atagcttttc cagtggacct 900  
ggggaagagg ctttgttgca gatgagatca aacatcatct atgactccac tgcccgaatc 960  
agaaggaacg ccaagggaaa ctactgtaag aggaccgcc tctacatcga cttcaaggag 1020  
attgggtggg actcctggat catcgctccg cctggatagc aagcctatga atgccgtggt 1080  
gtttgtaact acccctggc agagcatctc acaccacaa agcatgcaat tatccaggcc 1140  
ttggtccacc tcaagaattc ccagaaagct tccaagcct gctgtgtgcc cacaagcta 1200  
gagcccatct ccactccta tttagacaaa ggcgtcgtca cctacaagtt taaatacga 1260  
ggcatggccg tctccgaatg tggctgtaga tag 1293

<210> 112  
<211> 1512  
5 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 112  
atgacctgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt ggtgaccag 60  
ggagaccctg tgaagccgctc tcggggcccg ctggtgacct gcacgtgtga gagccacat 120  
tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg 180  
aggcaccccc aggaacatcg gggctgcggg aactgcaca gggagctctg cagggggcgc 240  
cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caactgtcc 300  
ctggtgctgg aggccaccca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg ccagctggcc 360  
ctgatcctgg gccccgtgct ggccttctg gcctgggtgg ccctgggtgt cctgggcctg 420

10

ES 2 720 401 T3

tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cgtggcctgc acagcgagct gggagagtcc 480  
 agtctcatcc tgaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt 540  
 gactgcacca cagggagtgg ctacagggctc cccttctggtg tgcagaggac agtggcacgg 600  
 caggttgctt tgggtggagtg tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg 660  
 tggcacgggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggatgaaca gtcctggttc 720  
 cgggagactg agatctataa cacagtgttg ctacagacag acaacatcct aggcttcatc 780  
 gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcactaccac 840  
 gagcacggct ccctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagcccca tctggctctg 900  
 aggctagctg tgtccgcggc atgcggcctg gcgcacctgc acgtggagat cttcgggtaca 960  
 cagggcaaac cagccattgc ccaccgagc ttcaagagcc gcaatgtgct ggtcaagagc 1020  
 aacctgcagt gttgcatcgc cgacctgggc ctggctgtga tgcaactcaca gggcagcgat 1080  
 tacctggaca tcggcaacaa cccgagagtg ggcaccaagc ggtacatggc acccgaggtg 1140  
 ctggacgagc agatccgac ggactgcttt gaggctctaca agtggactga catctgggcc 1200  
 tttggcctgg tgctgtggga gattgcccgc cggaccatcg tgaatggcat cgtggaggac 1260  
 tatagaccac cttctatga tgtggtgccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag 1320  
 gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agacccggtc 1380  
 ctctcaggcc tagctcagat gatgcgggag tgctggtacc caaacccctc tgcccgactc 1440  
 accgcgctgc ggatcaagaa gacactacaa aaaattagca acagtccaga gaagcctaaa 1500  
 gtgattcaat ag 1512

<210> 113  
 <211> 32  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> shALK1 FPN

10 <400> 113  
 agaattccca ccatgacctt gggctcccc ag 32

15 <210> 114  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> hALK1 RP  
 <400> 114  
 gcggccgctt attgaatcac ttaggc 27

25 <210> 115  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> HV0  
 <400> 115

ES 2 720 401 T3

gaagtgcagc ttgtggagtc tggcggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgcggctc 60  
 tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aactactgga tgaactgggt ccgccaggcc 120  
 ccaggcaagg ggcttgagtg ggttggccac attagattaa aatctgataa ttatgcaaca 180  
 cattatgogg agtctgtgag agggaggttc actatctcaa gagatgattc caaaaacagt 240  
 ctgtacctgc aaatgaactc cttaaagacc gaagacactg ccgtgtatta ctgcgccgg 300  
 ggaagtaact acgtgtttgc tttctggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

<210> 116  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Aminoácidos de HV0

10

<400> 116  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly His Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60  
 Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Asn Tyr Val Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 117  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> LV0

20

<400> 117

ES 2 720 401 T3

gacattgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
 atcaactgca gagccagcga aagtgtgat aattatggca ttagttttat gaactggtac 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcactatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
 ggggtccctg acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctcc 240  
 tcctgcagg ccgaggatgt ggcagtgtat tactgtcaac aaagtaagga ggttccgtgg 300  
 acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aag 333  
  
 <210> 118  
 <211> 111  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Aminoácidos de LVO  
 10  
 <400> 118  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30  
  
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
  
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95  
  
 Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
  
 <210> 119  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> HV3  
 20  
 <400> 119  
 gaagtgcagc ttgtggagtc tggcggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgcggctc 60  
 tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aactactgga tgaactgggt ccgccaggcc 120  
 ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctcac attagattaa aatctgataa ttatgcaaca 180  
 cattatgagg agtctgtgag agggaggttc actatctcaa gagatgattc caaaaacagt 240  
 ctgtacctgc aaatgaactc cttaaagacc gaagacactg ccgtgtatta ctgcacagga 300  
 ggaagtaact acgtgtttgc tttctggggc caagggactc tggctactgt ctcttcc 357

ES 2 720 401 T3

<210> 120  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Aminoácidos de HV3  
 <400> 120  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala His Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60  
 Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Gly Gly Ser Asn Tyr Val Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 10 115  
 <210> 121  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> HV4a  
 20 <400> 121  
 gaagtgcagc ttgtggagtc tagaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgcggtc 60  
 tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aactactgga tgaactgggt ccgccaggcc 120  
 ccaggcaagg ggcttgagtg ggttggccac attagattaa aatctgataa ttatgcaaca 180  
 cattatgogg agtctgtgag agggaggttc actatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240  
 ctgtacctgc aaatgaactc cttaaagacc gaagacactg ccgtgtatta ctgcccggga 300  
 ggaagtaact acgtgtttgc tttctggggc caagggactc tggctactgt ctcttcc 357  
 <210> 122  
 <211> 119  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Aminoácidos de HV4a  
 30

ES 2 720 401 T3

<400> 122

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Arg Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

Gly His Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Gly Gly Ser Asn Tyr Val Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

- 5 <210> 123
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> HV4b

<400> 123  
 gaagtgcagc ttgtggagtc tggcggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgcggctc 60  
 tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aactactgga tgaactgggt cgcaccagcc 120  
 ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctcac attagattaa aatctgataa ttatgcaaca 180  
 cattatgcgg agtctgtgag agggaggttc actatctcaa gagatgatc caaaaacagt 240  
 ctgtacctgc aaatgaactc cttaaagacc gaagacactg ccatttatta ctgcacagga 300  
 ggaagtaact acgtgtttgc tttctggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

- 15 <210> 124
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Aminoácidos de HV4b

<400> 124

ES 2 720 401 T3

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

<210> 125  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> HV7a

<400> 125  
 gaagtgcagc ttgtggagtc tagaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgctggctc 60  
 tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aactactgga tgaactgggt ccgccaggcc 120  
 ccaggcaagg ggcttgagtg gggtgctcac attagattaa aatctgataa ttatgcaaca 180  
 cattatgctgg agtctgtgag agggagggtc actatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240  
 ctgtacctgc aaatgaactc cttaaagacc gaagacactg gagtgtatta ctgcacagga 300  
 ggaagtaact acgtgtttgc tttctggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

<210> 126  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Aminoácidos de HV7a

<400> 126

ES 2 720 401 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Arg Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr  
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

- 5 <210> 127
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> HV7b

<400> 127  
 gaagtgcagc ttgtggagtc tagaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgctggctc 60  
 tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aactactgga tgaactgggt ccgccaggcc 120  
 ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctcac attagattaa aatctgataa ttatgcaaca 180  
 cattatgctgg agtctgtgag agggaggttc actatctcaa gagatgattc caaaaacagt 240  
 gtctacctgc aatgaactc cttaaagacc gaagacactg gagtctatta ctgcacagga 300  
 ggaagtaact acgtgtttgc tttctggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

- 15 <210> 128
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Aminoácidos de HV7b
- <400> 128

ES 2 720 401 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Arg Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr  
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 129  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> HV9

<400> 129  
 gaagtgcagc ttgtggagtc tagaggaggc ttgtgcaac ctggaggatc catgctggctc 60  
 tcctgtgccg cctctggatt cactttcagt aactactgga tgaactgggt ccgccaggcc 120  
 ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctcac attagattaa aatctgataa ttatgcaaca 180  
 cattatgctgg agtctgtgag agggaggttc actatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240  
 gtctacctgc aaatgaactc cttaaagacc gaagacactg gaatttatta ctgcacagga 300  
 ggaagtaact acgtgtttgc tttctggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

15 <210> 130  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Aminoácidos de HV9  
 <400> 130

ES 2 720 401 T3

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

5 <210> 131  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> LV2  
 <400> 131  
 gacattgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
 atcaactgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaacct ctcactatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
 ggggtccctg acaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctcc 240  
 tccctgcagg ccgaggatgt ggcagtgtat ttctgtcaac aaagtaagga ggttccgtgg 300  
 acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aag 333

15 <210> 132  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Aminoácidos de LV2  
 <400> 132

ES 2 720 401 T3

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 133  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> LV3

<400> 133  
 gacattgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
 atcaactgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcactatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
 ggggtccctg acaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctcc 240  
 cctctgcagg ccgaggatgt ggcagtgtat ttctgtcaac aaagtaagga ggttccgtgg 300  
 acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aag 333

<210> 134  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Aminoácidos de LV3

<400> 134

ES 2 720 401 T3

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp  
50 55 60

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

Pro Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 135  
<211> 333  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> LV4

<400> 135  
gacattgtgc tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
atcaactgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggtac 120  
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
ggggtccttg acaggttttag tggcagtgagg tctgggacag acttcaccct caccatctcc 240  
cctatgcagg ccgaggatgt ggcaatgtat tactgtcaac aaagtaagga ggttccgtgg 300  
10 acgttcggtc agggcaccaa gctggaatc aag 333

<210> 136  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Aminoácidos de LV4

20 <400> 136

ES 2 720 401 T3

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

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

Pro Met Gln Ala Glu Asp Val Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 137  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> LV6

<400> 137  
 gacattgtgc tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
 atcaactgca gagccagcga aagtgtgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
 ggggtccctg acaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctcc 240  
 cctatgcagg ccgaggatgt ggcaatgtat ttctgtcaac aaagtaagga ggttccgtgg 300  
 acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aag 333

<210> 138  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Aminoácidos de LV6

<400> 138

ES 2 720 401 T3

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

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

Pro Met Gln Ala Glu Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 139

<211> 35

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región C de BMP10 humana

<400> 139

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

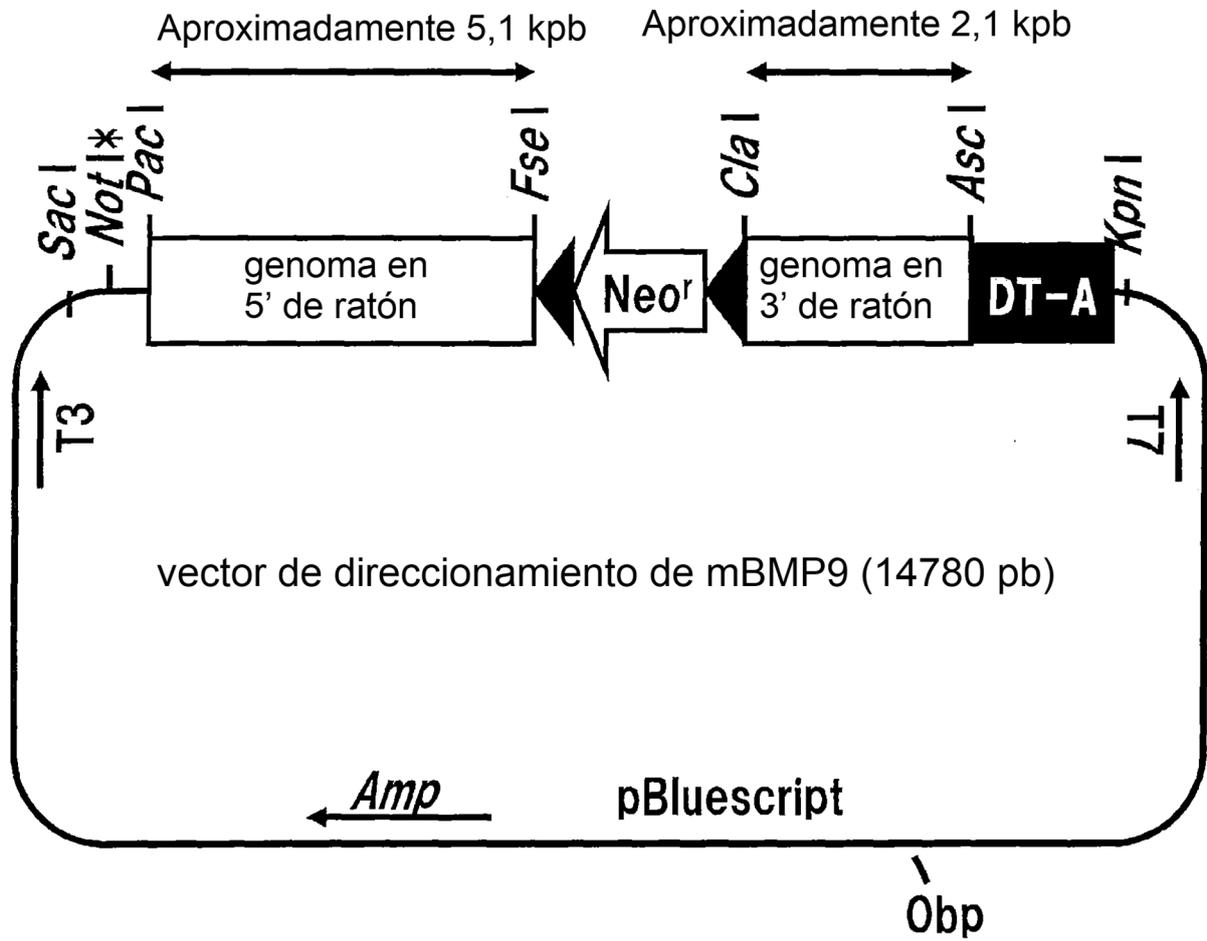
Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys  
 20 25 30

Gly Cys Arg  
 35

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo, que es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo seleccionado de entre los (a) y (b) siguientes:
  - (a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 49 y comprende una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 52, y
  - (b) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 128 y comprende una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 132.
2. Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo es un anticuerpo recombinante.
3. Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo recombinante se selecciona de entre un anticuerpo quimérico humano y un anticuerpo humanizado.
4. Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°: 128 y comprende una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID n°: 132.
5. Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo se une a por lo menos Lys en la posición 87, Asp en la posición 89, Met en la posición 90, y Pro en la posición 93 en la secuencia de aminoácidos de la región madura de BMP9 humana representada por SEC ID n°: 67.
6. Fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona de entre Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), una región V dimerizada (diacuerpo) y una región V estabilizada por disulfuro (dsFv).
7. ADN que codifica el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Vector recombinante que comprende el ADN según la reivindicación 7.
9. Transformante obtenido introduciendo el vector recombinante según la reivindicación 8 en una célula hospedadora.
10. Método para preparar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar el transformante según la reivindicación 9 en un medio para formar y acumular el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el caldo de cultivo y recoger el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo del caldo de cultivo.
11. Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su utilización en terapia.
12. Anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su utilización en el tratamiento de la anemia.
13. Método para detectar o medir de manera inmunológica BMP9 humana que utiliza el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el método no es un método de diagnóstico puesto en práctica en el cuerpo humano o animal.
14. Composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1



**pBluemBMP9-Lox-Neo-DT-A-3'KO-5'KO**

Fig. 2

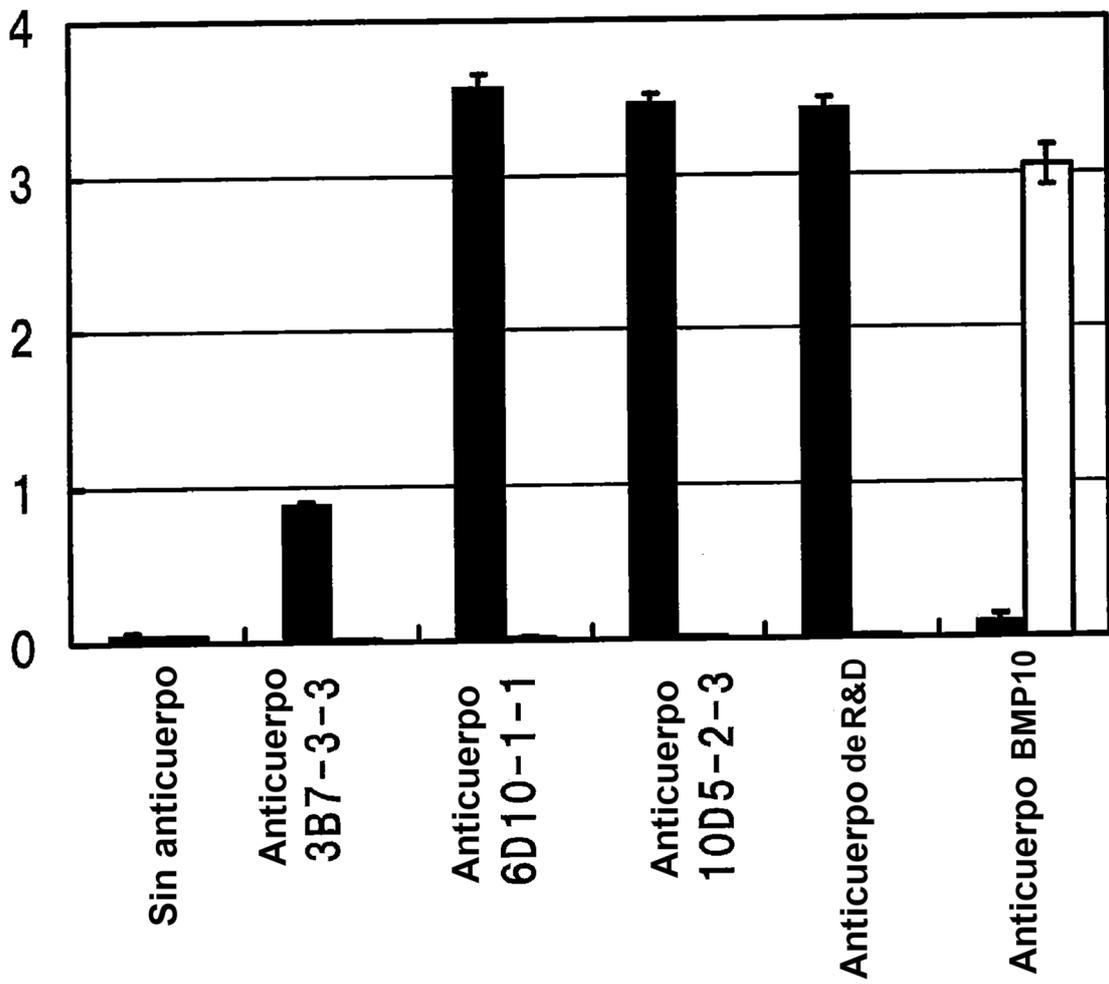


Fig. 3

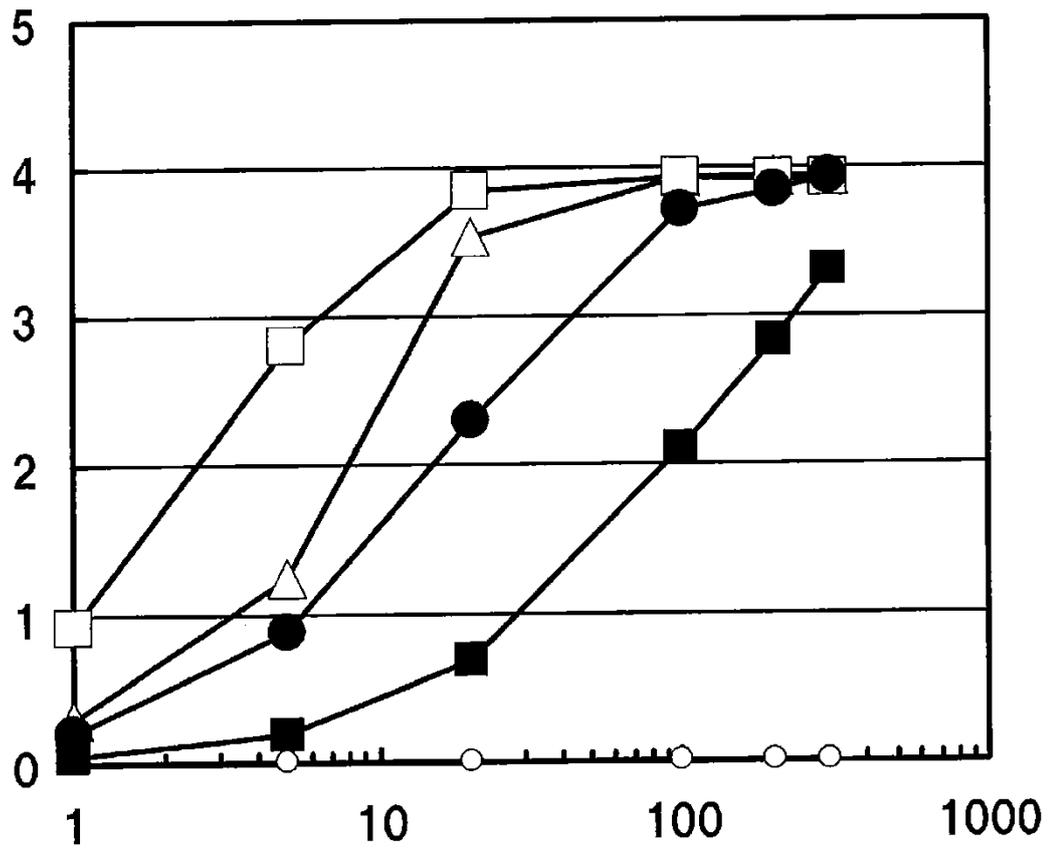


Fig. 4

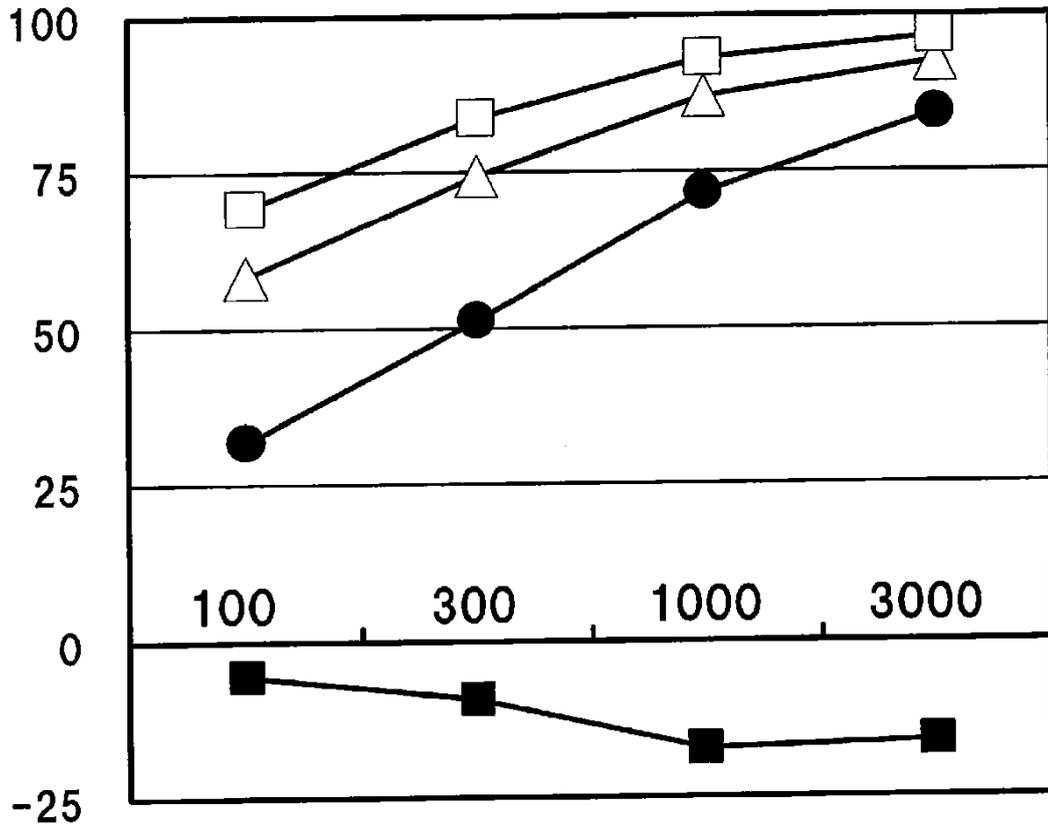
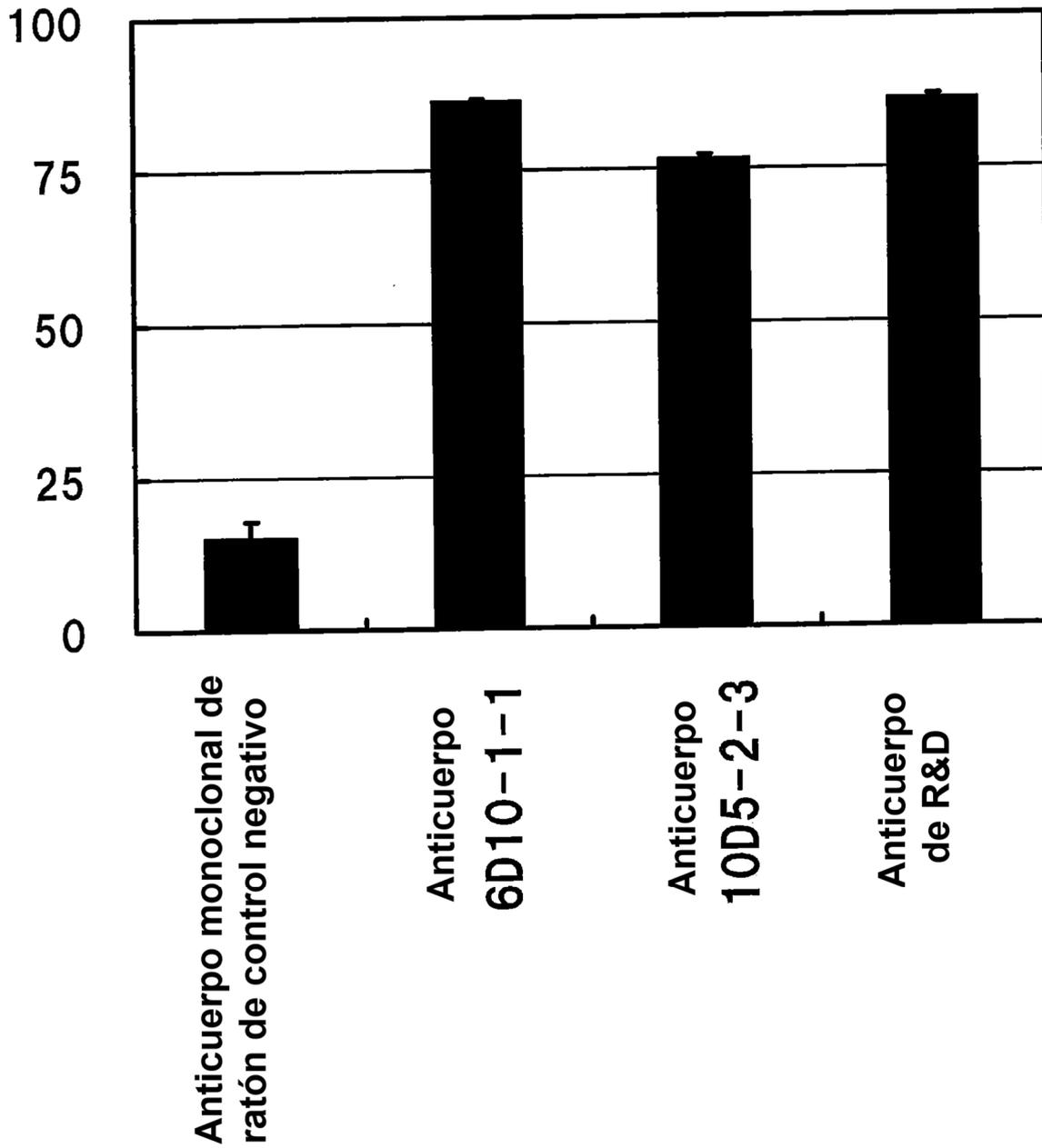
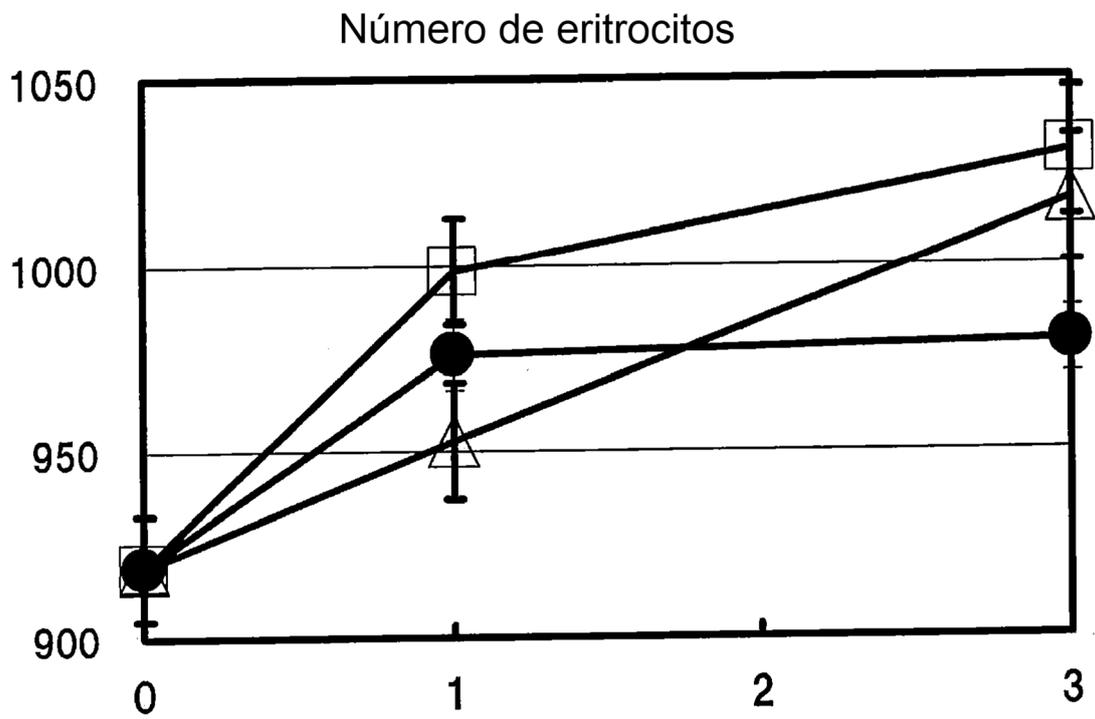


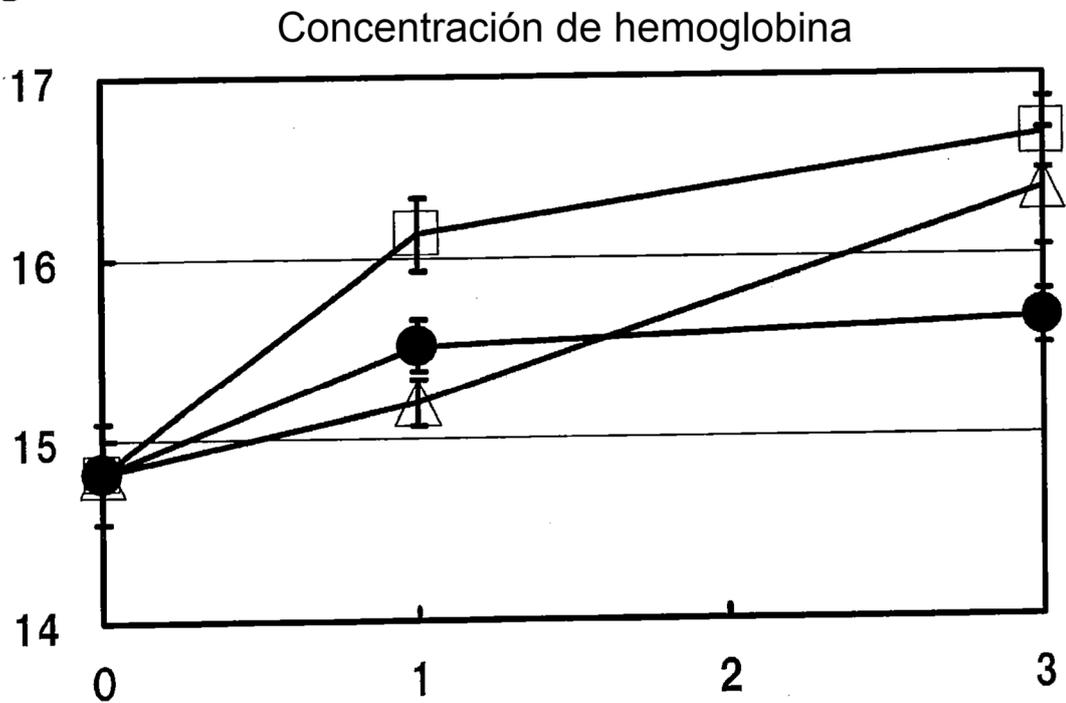
Fig. 5



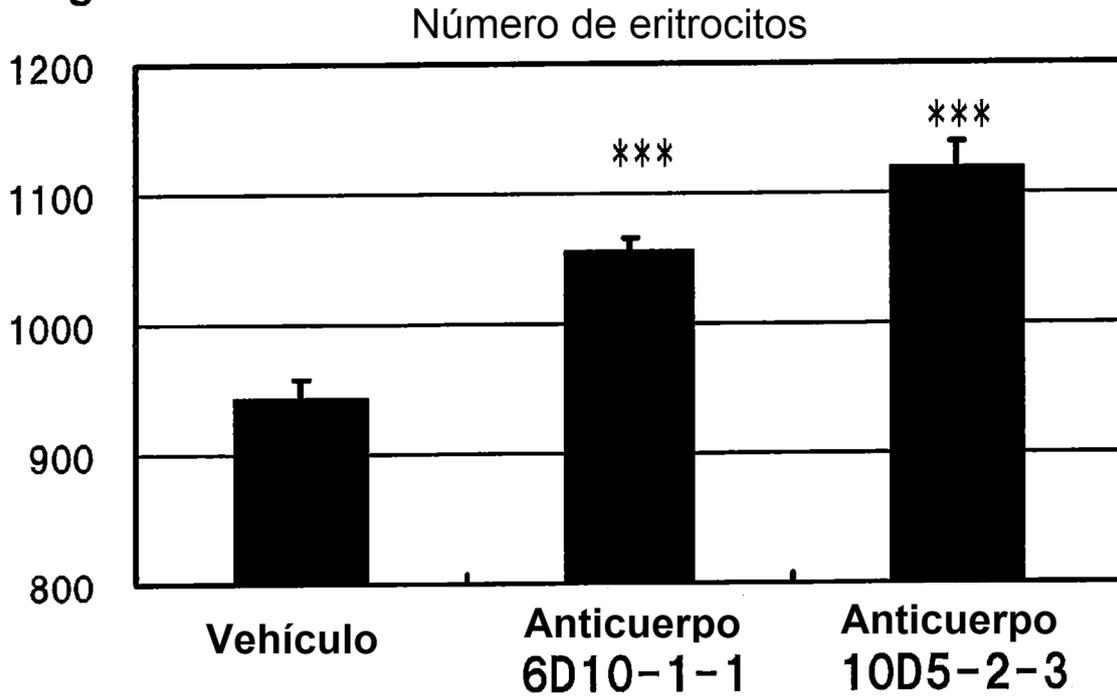
**Fig. 6A**



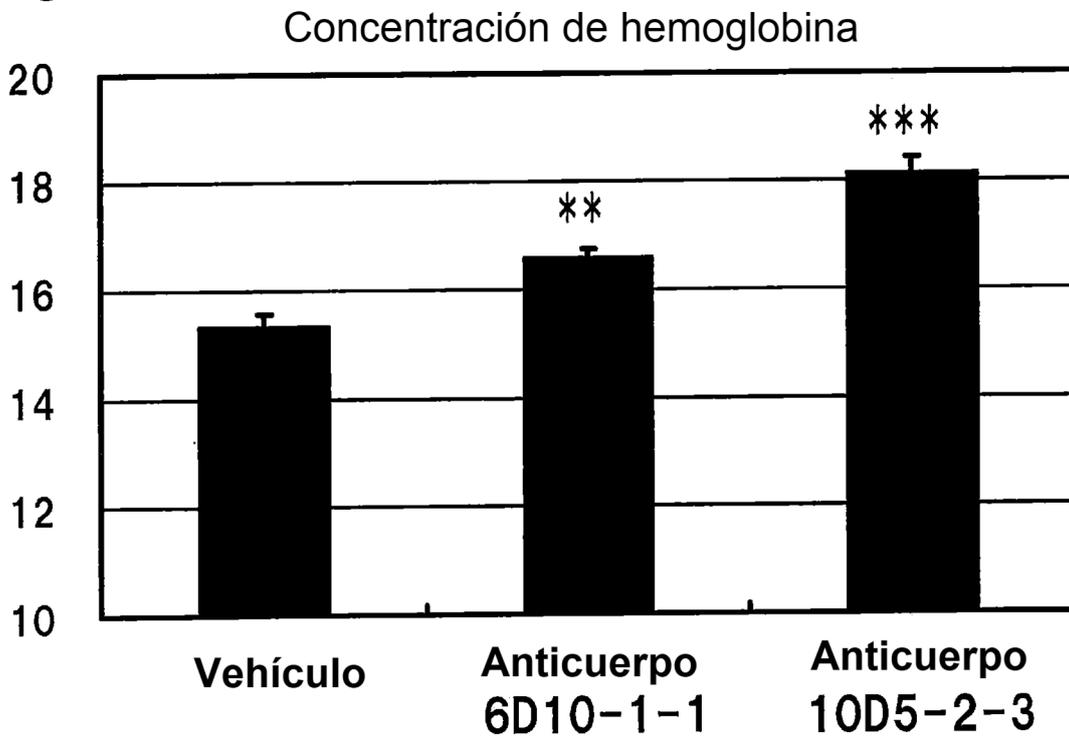
**Fig. 6B**



**Fig. 7A**



**Fig. 7B**



**Fig. 8**

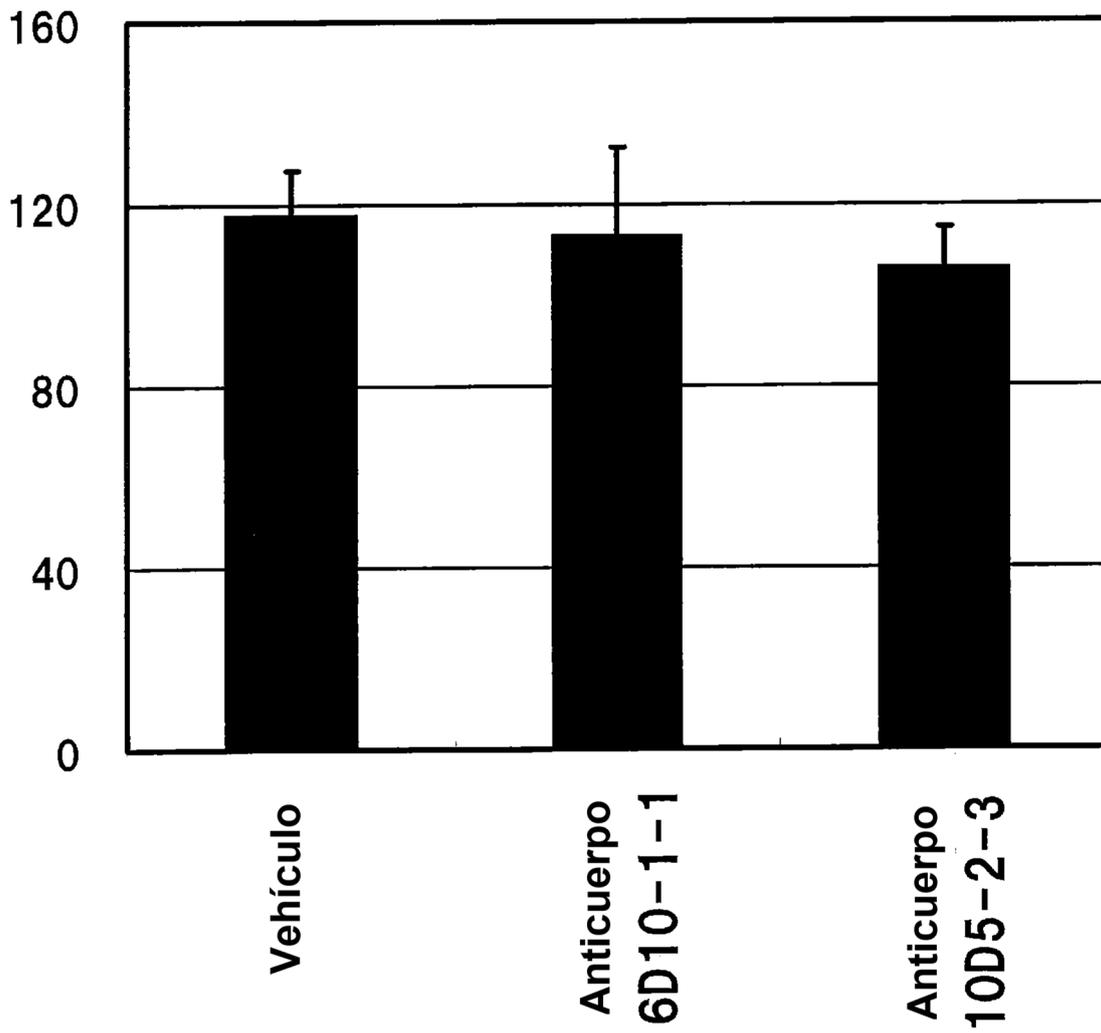


Fig. 9A

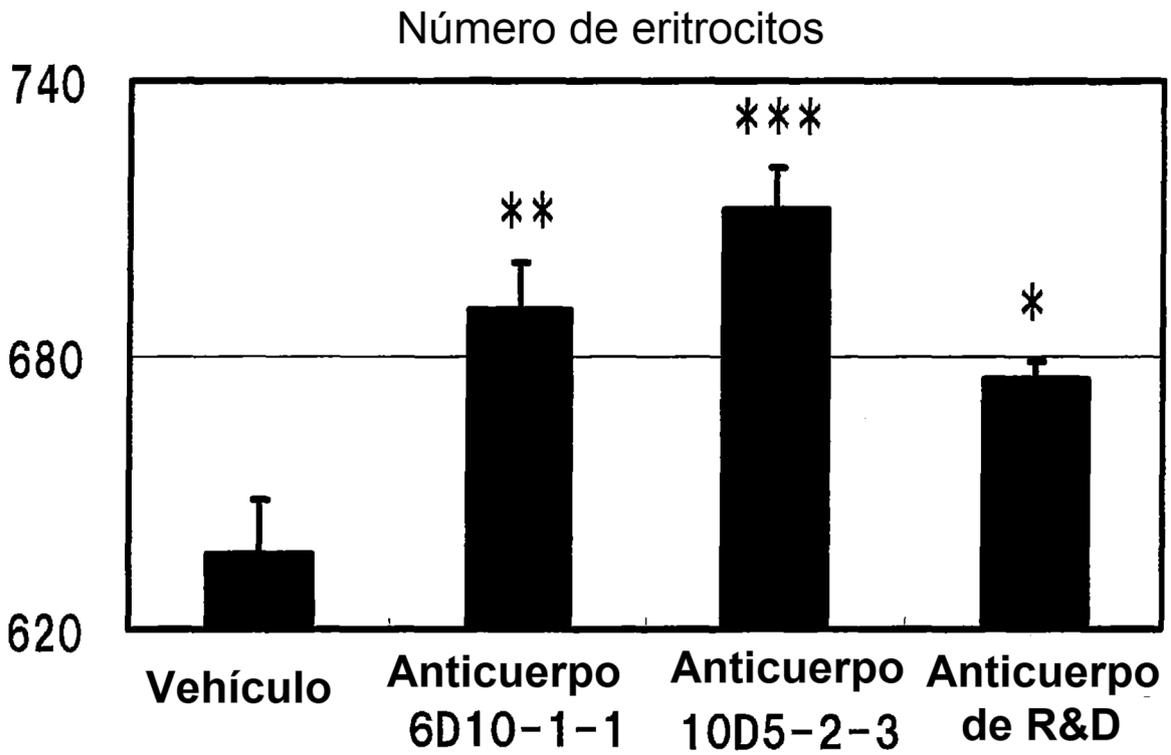


Fig. 9B

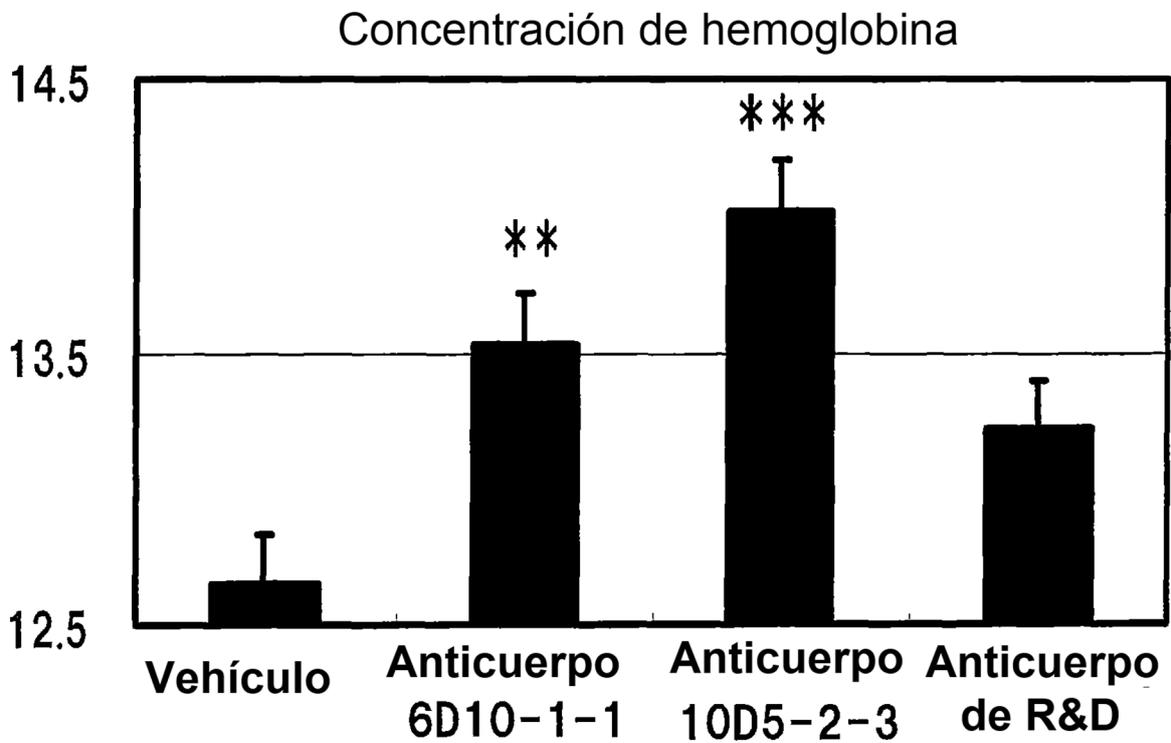


Fig. 10A

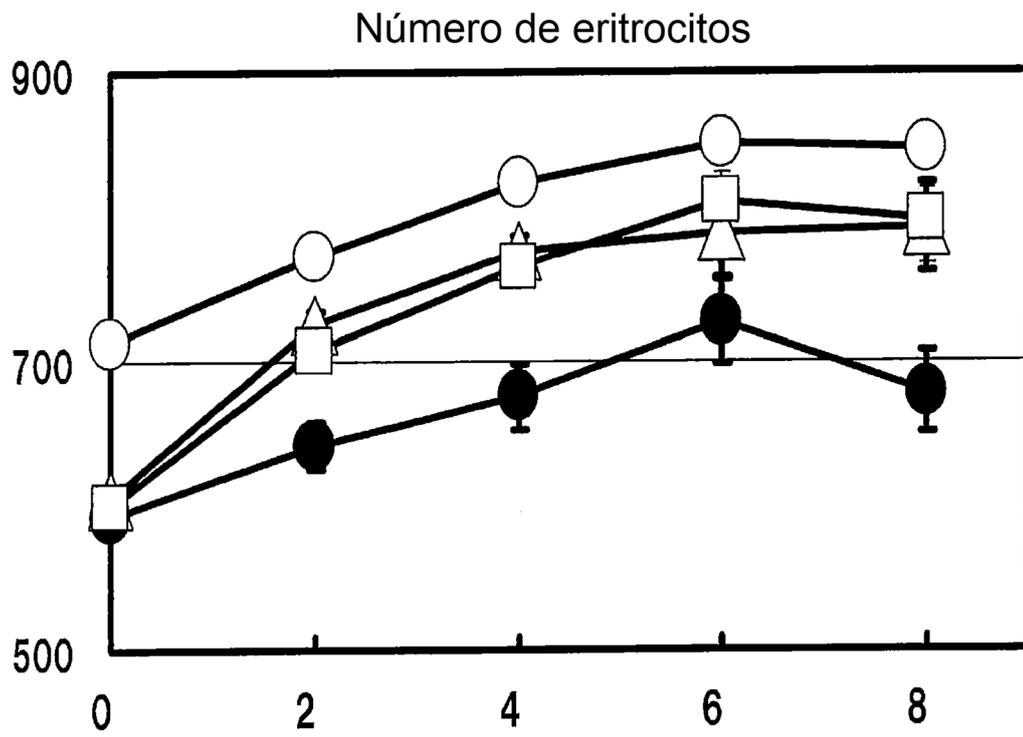


Fig. 10B

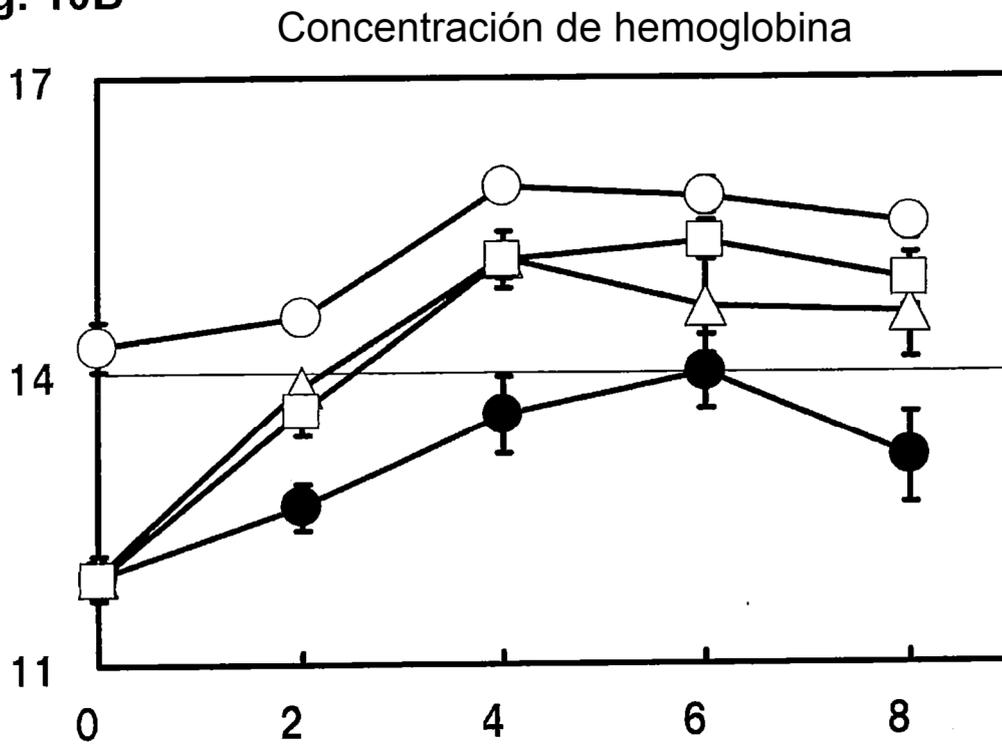


Fig. 11A

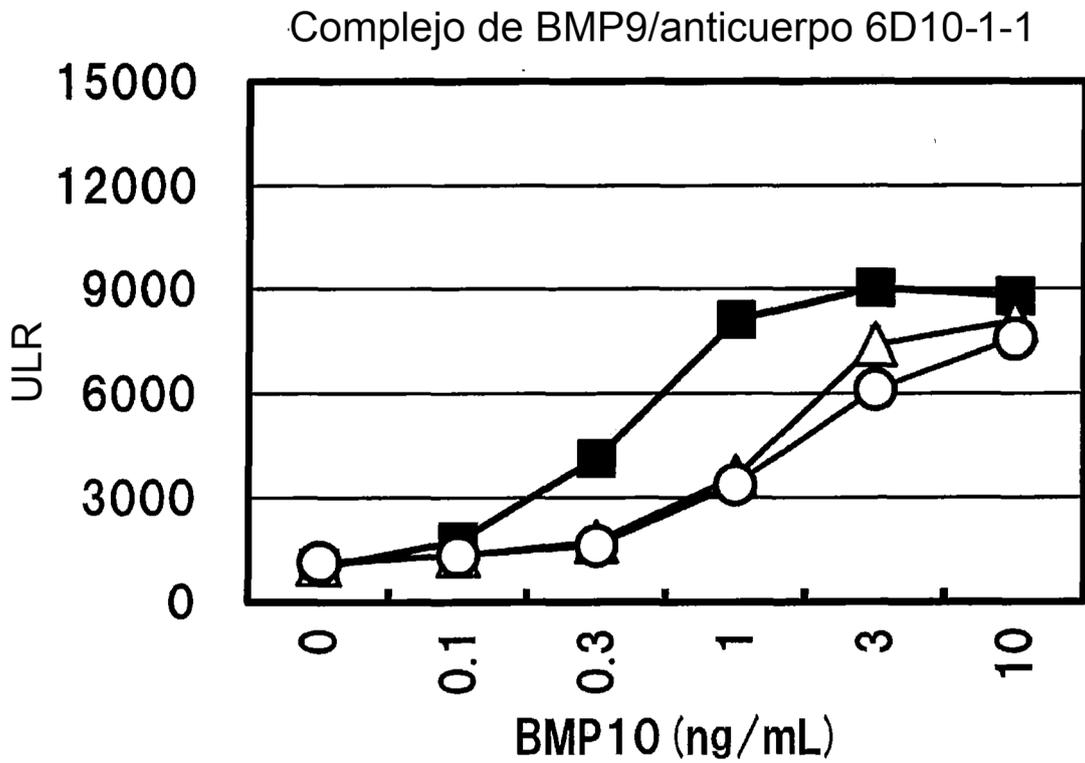
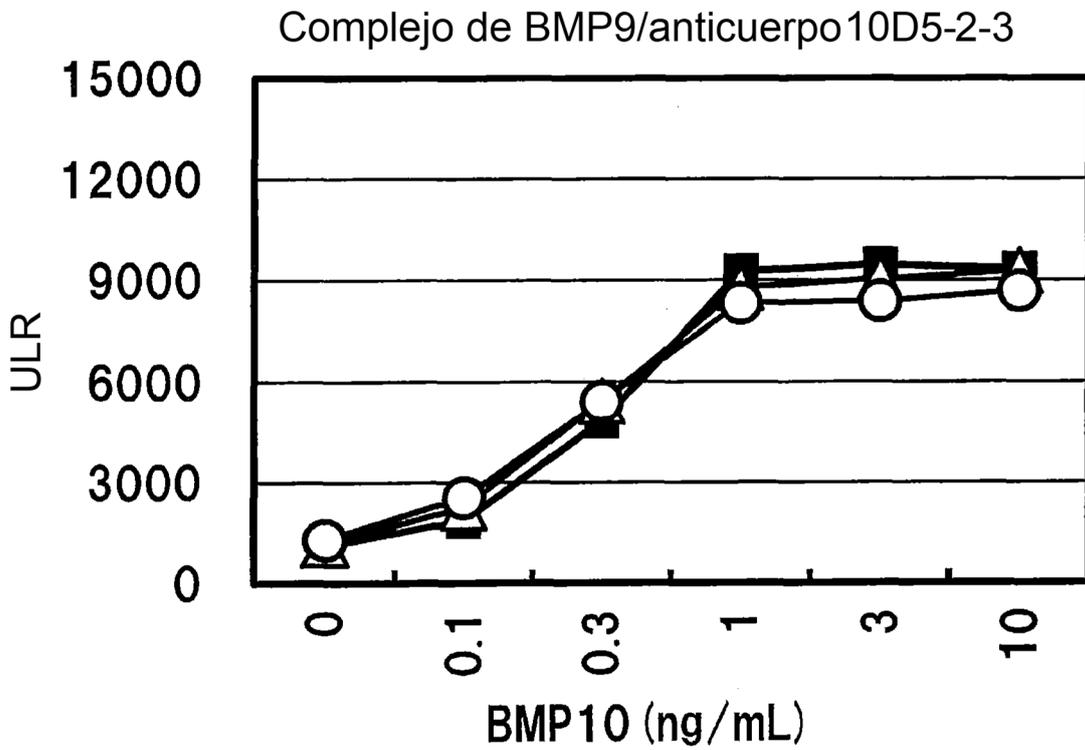


Fig. 11B



ES 2 720 401 T3

Anticuerpo 10D5	123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	012345678901234
HV0	EVKLEESRGGLVQPGGSMKLSVASGFTFS	NYWMN	WVRQSPEKGLEWVA	HIRLKS DNYATHYAE
HV3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVG	
HV4a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS	CDR1	WVRQAPGKGLEWVA	CDR2
HV4b	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLS CAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVG	
HV7a	EVQLVESRGGLVQPGGSMRLS CAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV7b	EVQLVESRGGLVQPGGSMRLS CAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	
HV9	EVQLVESRGGLVQPGGSMRLS CAASGFTFS		WVRQAPGKGLEWVA	

Anticuerpo 10D5	5678	90123456789012345678901234567890	12345678	90123456789
HV0	SVRG	RFTISRDDSKSSVFLQMNNLRAEDTGIYYCTG	GSNYVFAF	WGQGLTVTVSA
HV3		RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR		WGQGLTVTVSS
HV4a	CDR2	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTG	CDR3	WGQGLTVTVSS
HV4b		RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAG		WGQGLTVTVSS
HV7a		RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTG		WGQGLTVTVSS
HV7b		RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTGVYYCTG		WGQGLTVTVSS
HV9		RFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTGVYYCTG		WGQGLTVTVSS

Fig. 12

Anticuerpo 10D5	12345678901234567890123	456789012345678	901234567890123	4567890
LV0	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVDNYGISFMN	WFQQKPGQPPKLLIY	AASNQGS
LV2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	CDR1	WFQQKPGQPPKLLIY	CDR2
LV3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC		WFQQKPGQPPKLLIY	
LV4	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC		WFQQKPGQPPKLLIY	
LV6	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC		WFQQKPGQPPKLLIY	

Anticuerpo 10D5	12345678901234567890123456789012	345678901	2345678901
LV0	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC	QQSKEVPWT	FGGGTKLEIK
LV2	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC	CDR3	FGQGTKLEIK
LV3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISPLQAEDVAVYYC		FGQGTKLEIK
LV4	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISPMQAEDVAVYYC		FGQGTKLEIK
LV6	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISPMQAEDVAVYYC		FGQGTKLEIK

**Fig. 13**