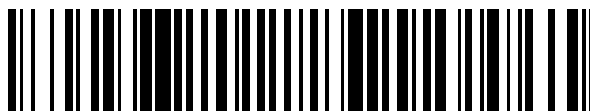


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 066**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2009 E 09704066 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2247618**

54 Título: **Anticuerpos frente a ferroportina y métodos de uso**

30 Prioridad:

25.01.2008 US 23693 P

11.12.2008 US 121729 P

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

30.09.2014

73 Titular/es:

AMGEN, INC (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es:

ARVEDSON, TARA;
DYAS, GREGORY;
ROTTMAN, JAMES y
SASU, BARBRA

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 500 066 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos frente a ferroportina y métodos de uso

Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos frente a ferroportina y a usos de los mismos.

5 Antecedentes

El hierro es un oligoelemento esencial requerido para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos vivos. El contenido en hierro en los mamíferos se regula controlando la absorción de hierro, el reciclaje de hierro y la liberación de hierro desde las células en las que se almacena. La liberación de hierro está controlada por ferroportina, una proteína exportadora de hierro principal ubicada en la superficie celular de enterocitos, macrófagos y hepatocitos, las principales células que pueden liberar hierro al plasma. La ferroportina, también conocida como MTP1 o ferroportina-1, es una proteína transmembrana múltiple que media en el flujo de salida de hierro celular (Donovan *et al.*, Nature, 403:776-781, 2000; Abboud *et al.*, J. Biol. Chem., 275:19906-19912, 2000). La ferroportina se expresa altamente en enterocitos duodenales y macrófagos del sistema reticuloendotelial en donde está implicada en el transporte de hierro de la dieta y el reciclaje de hierro de glóbulos rojos senescentes, respectivamente (Yang *et al.*, J. Biol. Chem., 277:39786-39791, 2002). La ferroportina se regula de manera negativa mediante la hormona reguladora de hierro hepcidina. Se ha mostrado que la hepcidina se une a ferroportina, dando como resultado la internalización y degradación de ferroportina (Nemeth *et al.*, Blood, 107:328-333, 2006; Nemeth *et al.*, Science, 306:2090-2093, 2004; de Domenico *et al.*, Mol. Biol. Cell., 8:2569-2578, 2007). Este mecanismo bloquea la liberación de hierro de macrófagos, hepatocitos y enterocitos (Knutson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:1324-1328, 2008; Nemeth *et al.*, Blood, 107:328-333, 2006; Knutson *et al.*, Blood, 102:4191-4197, 2003).

La ferroportina es importante para el flujo de salida de hierro tal como se demuestra en ratones transgénicos: la delección de ferroportina es letal en embriones mientras que la inactivación de ferroportina por una deficiencia condicional da como resultado un aumento del almacenamiento de hierro en enterocitos, macrófagos y hepatocitos (Donovan *et al.*, Cell. Metab., 1:191-200, 2005). Thomas y Oates, Gut, 2004;53:44-49, notificaron que un anticuerpo policlonal generado usando una secuencia peptídica de ferroportina de rata con n.º de registro de Genbank AAK77858 (que se predice que se encuentra entre los dominios transmembrana 3 y 4) redujo la captación de hierro celular pero no tuvo efecto sobre la liberación de hierro.

Delaby *et al.* 2005 (Blood vol. 106, n.º 12, págs. 3979-3984) describen la producción de anticuerpo policlonal de conejo anti-Fpn1 de ratón y su uso en inmunotransferencia de tipo Western e inmunofluorescencia.

30 Thomas *et al.* 2002 (The Journal of Nutrition, vol. 132, n.º 4, págs. 680-687) describen un anticuerpo policlonal de conejo anti-Fpn1 de rata generado contra los aminoácidos 247-264 o Fpn1 de rata (IREG1) conjugado con KLH.

Oates *et al.* 2005 (Pflügers Archive-European Journal of Physiology, vol. 450, n.º 5, págs. 317-325) describen el uso de un anticuerpo policlonal de conejo anti-Fpn1 de rata generado contra un péptido que corresponde a los aminoácidos 247-264 de Fpn1 de rata.

35 El documento US 7.166.448 describe la expresión de Fpn1 y un método de detección de Fpn1 en una muestra que incluye incubar con un agente que se une a Fpn1 y detectar el agente unido.

Sumario de la invención

La invención proporciona anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen a ferroportina humana, métodos de producción de tales anticuerpos, métodos de uso de tales anticuerpos para detectar ferroportina, formulaciones farmacéuticas que incluyen tales anticuerpos, métodos de preparación de las formulaciones farmacéuticas y métodos de tratamiento de pacientes con las formulaciones farmacéuticas, incluyendo terapia de combinación con estimuladores de la eritropoyesis y/o quelantes de hierro tal como se describe a continuación. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican para tales anticuerpos, vectores y células huésped recombinantes que comprenden tales ácidos nucleicos, y métodos de producción de tales anticuerpos.

45 En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal aislado, que se une a un dominio extracelular de ferroportina (SEQ ID NO: 16), con la afinidad deseada. En algunos aspectos, la afinidad kd del anticuerpo por las células que expresan ferroportina es de aproximadamente 10^{-6} M o menos, o de aproximadamente 10^{-7} M o menos, o de aproximadamente 10^{-8} M o menos, o de aproximadamente 10^{-9} M o menos. En algunos aspectos, el dominio extracelular de ferroportina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 46-60, 116-126, 204-205, 325-342, 394-449, 513-517, 35-57, 116-124, 332-340, 393-449 y 515-518 de SEQ ID NO: 16 y fragmentos de los mismos de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos, el anticuerpo inhibe la internalización y/o degradación de ferroportina. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe la internalización o degradación mediada por hepcidina de ferroportina. En un aspecto, el anticuerpo disminuye la concentración de hierro intracelular y/o aumenta la concentración de hierro circulante a una CE_{50} de aproximadamente 10^{-6} M o menos, o de aproximadamente

10^{-7} M o menos, o de aproximadamente 10^{-8} M o menos, o de aproximadamente 10^{-9} M o menos. En otros aspectos, el anticuerpo presente la propiedad de aumentar el recuento (número) de glóbulos rojos o los niveles de hemoglobina o hematocrito, y/o normalizar el recuento de reticulocitos, el volumen celular medio de reticulocitos y/o el contenido en hemoglobina de reticulocitos.

5 En diversos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende al menos cinco, diez, quince o más aminoácidos ubicados dentro de los aminoácidos 393-449 de SEQ ID NO: 16, o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de ferroportina que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más aminoácidos ubicados dentro de los aminoácidos 439-449 de SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ANIVPETSPE (aminoácidos 439-449 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. Los epítipos pueden estar completamente dentro del fragmento, o los epítipos del fragmento pueden comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos dentro del fragmento y uno o más aminoácidos fuera del fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos NIVPETSPE (aminoácidos 440-449 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos IVPETSPE (aminoácidos 441-450 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos VPETSPE (aminoácidos 442-451 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos PETSPE (aminoácidos 443-452 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos TPESVPIIS (aminoácidos 445-454 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ANIVPETS (aminoácidos 439-447 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos IVPETSPE (aminoácidos 441-449 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ANIVPETS (aminoácidos 439-446 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos IVPETSPE (aminoácidos 441-448 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos IVPETS (aminoácidos 441-447 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos PETSPE (aminoácidos 443-449 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos LVELYGNSSL (aminoácidos 50-69 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos FLVELYGNSSL (aminoácidos 49-68 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos VELYGNLLLL (aminoácidos 51-70 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ELYGNLLLL (aminoácidos 52-71 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos LYGNLLLLTA (aminoácidos 53-72 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos LAFLYMTVLG (aminoácidos 314-323 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos AFLYMTVLG (aminoácidos 315-324 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos FLYMTVLGFD (aminoácidos 316-325 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos IQGESITPKIPEIT (aminoácidos 413-427 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos IQGESITPK (aminoácidos 413-422 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos QGESITPKI (aminoácidos 414-423 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos GESITPKIP (aminoácidos 415-424 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ESITPKIPE (aminoácidos 416-425 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos SITPKIPEI (aminoácidos 417-426 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ITPKIPEIT (aminoácidos 418-427 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos DGWVSYYNQP (aminoácidos 297-306 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ITTEIYMSNGSNS (aminoácidos 426-438 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos TEIYMSNGSNSA (aminoácidos 428-439 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de

este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ITTEIYMSNG (aminoácidos 426-435 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos TTEIYMSNGS (aminoácidos 427-436 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos TEIYMSNGSN (aminoácidos 428-437 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos EIYMSNGSNS (aminoácidos 429-438 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos IYMSNGSNSA (aminoácidos 430-439 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos YHGWWLTSCY (aminoácidos 124-133 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos RDGWVSYYNQ (aminoácidos 296-305 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos EIYMSNG (aminoácidos 429-435 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos IYMSNGSN (aminoácidos 430-437 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento. En algunos aspectos, el anticuerpo se une a un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos ITPTK (aminoácidos 418-422 de SEQ ID NO: 16), o un epítipo dentro o de este fragmento.

En diversos aspectos los anticuerpos monoclonales pueden incluir cualquiera de los anticuerpos 31A5, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6 o anticuerpos que conservan una, dos, tres, cuatro, cinco o seis cualesquiera de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3 de tales anticuerpos, incluyendo opcionalmente una o dos mutaciones en tal(es) CDR, o anticuerpos que conservan una región variable de cadena ligera o pesada de cualquiera de tales anticuerpos, o anticuerpos que conservan todas las CDR de cadena pesada y/o todas las CDR de cadena ligera de cualquiera de tales anticuerpos, o anticuerpos que se unen al mismo epítipo en la ferroportina humana que los anticuerpos 31A5, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6, o que compiten con tales anticuerpos por la unión a ferroportina humana en al menos el 75%.

Diversos aspectos también proporcionan ácidos nucleicos que codifican para cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento, vectores que comprenden tales secuencias de ácido nucleico y células huésped que comprenden tales ácidos nucleicos o vectores. En un aspecto relacionado, se proporcionan métodos para la producción recombinante de tales anticuerpos monoclonales que incluyen cultivar la célula huésped mencionada anteriormente de manera que el ácido nucleico se exprese para producir el anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula huésped o el medio de cultivo. En un aspecto relacionado, se proporciona un agente o anticuerpo aislado producido mediante el método mencionado anteriormente. Tales anticuerpos se conjugan opcionalmente con restos terapéuticos, citotóxicos o de diagnóstico adicionales.

En algunos aspectos, los anticuerpos anti-ferroportina se producen (a) administrando a un mamífero un ácido nucleico que codifica para ferroportina (SEQ ID NO: 16), opcionalmente (b) administrando a dicho mamífero un ácido nucleico igual diferente que codifica para ferroportina (SEQ ID NO: 16), opcionalmente (c) administrando a dicho mamífero una composición que comprende membrana celular que expresa ferroportina, y (d) obteniendo células que expresan el anticuerpo de dicho mamífero.

En otro aspecto, se proporciona un método de detección de ferroportina humana en una muestra, que comprende poner en contacto una muestra de un ser humano con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente en condiciones que permiten la unión del anticuerpo a ferroportina humana, y detectar el anticuerpo unido. En un aspecto, se inmoviliza un primer anticuerpo frente a ferroportina sobre un soporte sólido, como reactivo de captura, y se usa un segundo anticuerpo frente a ferroportina como reactivo de detección. En un aspecto relacionado, la cantidad de ferroportina en la muestra se cuantifica midiendo la cantidad del anticuerpo unido.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. También se proporciona el uso de tales anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un ser humano con un trastorno de la homeostasis del hierro, incluyendo pero sin limitarse a un nivel elevado de hepcidina, un trastorno relacionado con hepcidina o anemia. Se entiende que métodos de coadministración que implican la administración de anticuerpos con un segundo agente terapéutico, tal como se describe en el presente documento, abarcan no sólo el uso del anticuerpo en la preparación de un medicamento para su coadministración con el segundo agente terapéutico, sino también el uso del segundo agente terapéutico en la preparación de un medicamento para su coadministración con el anticuerpo.

Diversos aspectos proporcionan además métodos de uso de tales anticuerpos, por ejemplo, para tratar a un mamífero con un trastorno de la homeostasis del hierro, o un trastorno relacionado con hepcidina, o a un mamífero con anemia, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de tal anticuerpo. En realizaciones a modo de ejemplo, el mamífero es un ser humano que padece un estado seleccionado del grupo que consiste en sobrecarga de hierro africana, alfa-talasemia, enfermedad de Alzheimer, anemia, anemia de cáncer, anemia de enfermedad crónica, anemia de inflamación, arteriosclerosis o aterosclerosis (incluyendo arteriopatía coronaria, enfermedad

5 cerebrovascular o enfermedad arterial oclusiva periférica), ataxias, ataxias relacionadas con hierro, atranferrinemia, cáncer, deficiencia de ceruloplasmina, anemia inducida por quimioterapia, enfermedad renal/de riñón crónica (estadio I, II, III, IV o V), incluyendo enfermedad renal en fase avanzada o insuficiencia renal/de riñón crónica, cirrosis de hígado, hemocromatosis clásica, artritis inducida por colágeno (AIC), estados con exceso de hepcidina (hepcidina elevada), anemia diseritropoyética congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de Crohn, diabetes, trastornos de la biodistribución del hierro, trastornos de la homeostasis del hierro, trastornos del metabolismo del hierro, enfermedad de ferroportina, hemocromatosis por mutación de ferroportina, deficiencia de folato, ataxia de Friedrich, mielosis funicular, síndrome GRACILE, infección por *H. pylori* u otras infecciones bacterianas, enfermedad de Hallervorden Spatz, hemocromatosis, hemocromatosis que resulta de mutaciones en el receptor 2 de transferrina, hemoglobinopatías, hepatitis, hepatitis (Brock), hepatitis C, carcinoma hepatocelular, hemocromatosis hereditaria, VIH u otras enfermedades virales, enfermedad de Huntington, hiperferritinemia, anemia microcítica hipocrómica, hipoferrremia, resistencia a la insulina, anemia por deficiencia de hierro, trastornos de deficiencia de hierro, trastornos de sobrecarga de hierro, estados de deficiencia de hierro con exceso de hepcidina, hemocromatosis juvenil (HFE2), esclerosis múltiple, mutación en el receptor 2 de transferrina, HFE, hemojuvelina, ferroportina u otros genes del metabolismo del hierro, hemocromatosis neonatal, enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el hierro, osteopenia, osteoporosis, pancreatitis, neurodegeneración asociada con pantotolato cinasa, enfermedad de Parkinson, pelagra, pica, porfiria, porfiria cutánea tardía, pseudoencefalitis, hemosisiderosis pulmonar, trastornos de glóbulos rojos, artritis reumatoide, septicemia, anemia sideroblástica, lupus eritematoso sistémico, talasemia, talasemia intermedia, sobrecarga de hierro transfusional, tumores, vasculitis, deficiencia de vitamina B6, deficiencia de vitamina B12, enfermedad de Wilson y/o trastornos cardíacos asociados con sobrecarga de hierro.

25 Aún en otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar a un mamífero con un trastorno de la homeostasis del hierro mediante la administración de (a) un anticuerpo anti-ferroportina mencionado anteriormente o un agente de unión específica; y (b) un estimulador de la eritropoyesis, en cantidades terapéuticamente eficaces. Los estimuladores de la eritropoyesis a modo de ejemplo incluyen eritropoyetina, variantes agonistas de eritropoyetina y péptidos o anticuerpos que se unen a y activan el receptor de eritropoyetina. Los estimuladores de la eritropoyesis incluyen, pero no se limitan a, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega, epoetina iota, epoetina zeta y análogos de las mismas, péptidos miméticos, anticuerpos miméticos e inhibidores de HIF (véase la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0020487). En particular, la eritropoyetina incluye, pero no se limita a, eritropoyetina así como moléculas de eritropoyetina o variantes o análogos de la misma tal como se dan a conocer en las siguientes patentes o solicitudes de patente: las patentes estadounidenses n.ºs 4.703.008; 5.441.868; 5.547.933; 5.618.698; 5.621.080; 5.756.349; 5.767.078; 5.773.569; 5.955.422; 5.830.851; 5.856.298; 5.986.047; 6.030.086; 6.310.078; 6.391.633; 6.583.272; 6.586.398; 6.900.292; 6.750.369; 7.030.226; 7.084.245; 7.217.689; las publicaciones PCT n.ºs WO 91/05867; WO 95/05465; WO 99/66054; WO 00/24893; WO 01/81405; WO 00/61637; WO 01/36489; WO 02/014356; WO 02/19963; WO 02/20034; WO 02/49673; WO 02/085940; WO 03/029291; WO 2003/055526; WO 2003/084477; WO 2003/094858; WO 2004/002417; WO 2004/002424; WO 2004/009627; WO 2004/024761; WO 2004/033651; WO 2004/035603; WO 2004/043382; WO 2004/101600; WO 2004/101606; WO 2004/101611; WO 2004/106373; WO 2004/018667; WO 2005/001025; WO 2005/001136; WO 2005/021579; WO 2005/025606; WO 2005/032460; WO 2005/051327; WO 2005/063808; WO 2005/063809; WO 2005/070451; WO 2005/081687; WO 2005/084711; WO 2005/103076; WO 2005/100403; WO 2005/092369; WO 2006/50959; WO 2006/02646; WO 2006/29094; y las publicaciones estadounidenses n.ºs US 2002/0155998; US 2003/0077753; US 2003/0082749; US 2003/0143202; US 2004/0009902; US 2004/0071694; US 2004/0091961; US 2004/0143857; US 2004/0157293; US 2004/0175379; US 2004/0175824; US 2004/0229318; US 2004/0248815; US 2004/0266690; US 2005/0019914; US 2005/0026834; US 2005/0096461; US 2005/0107297; US 2005/0107591; US 2005/0124045; US 2005/0124564; US 2005/0137329; US 2005/0142642; US 2005/0143292; US 2005/0153879; US 2005/0158822; US 2005/0158832; US 2005/0170457; US 2005/0181359; US 2005/0181482; US 2005/0192211; US 2005/0202538; US 2005/0227289; US 2005/0244409; US 2006/0088906; y US 2006/0111279. En determinados aspectos a modo de ejemplo, el estimulador de la eritropoyesis se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina humana (SEQ ID NO: 21) y darbepoetina alfa (SEQ ID NO: 22). Las formas de anemia a modo de ejemplo que pueden tratarse según tales métodos incluyen anemia de inflamación, anemia de cáncer, anemia inducida por quimioterapia, anemia por deficiencia de hierro, un trastorno de la homeostasis del hierro, enfermedad de ferroportina o anemia resultante de enfermedad de riñón. También se proporcionan métodos de tratamiento de un mamífero con anemia que es hiposensible, o incluso resistente, a la terapia con un estimulador de la eritropoyesis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica.

55 En otro aspecto relacionado, también se proporcionan kits para tratar un trastorno de la homeostasis del hierro, o un trastorno asociado con niveles de hepcidina elevados, o un trastorno relacionado con hepcidina, o un trastorno de la homeostasis del hierro o a un mamífero con anemia. En un aspecto a modo de ejemplo, el kit incluye (a) un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica, y (b) un estimulador de la eritropoyesis, y opcionalmente, hierro o un quelante de hierro. En otro aspecto a modo de ejemplo, el kit incluye un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica, y una etiqueta unida a o envasada con el recipiente, describiendo la etiqueta el uso del anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica, con un estimulador de la eritropoyesis. Aún en otro aspecto a modo de ejemplo, el kit incluye un estimulador de la eritropoyesis y una etiqueta unida a o envasada con el recipiente, describiendo la etiqueta el uso del estimulador de la eritropoyesis con un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica. También se da a conocer el uso de un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión

específica en la preparación de un medicamento para la administración con un estimulador de la eritropoyesis, así como el uso de un estimulador de la eritropoyesis en la preparación de un medicamento para la administración con un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica. En cualquiera de estos kits o usos, un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica y el estimulador de la eritropoyesis pueden estar en viales separados o pueden combinarse juntos en una única composición farmacéutica. Aún en otra realización, el anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica, el estimulador de la eritropoyesis, o ambos, pueden combinarse con hierro o un quelante de hierro en una única composición farmacéutica o pueden estar en viales separados.

También se da a conocer un método de selección de un régimen de tratamiento para un sujeto que necesita tratamiento que comprende (a) examinar al sujeto para determinar una disminución del nivel de hierro circulante o un nivel elevado de hepcidina; (b) prescribir a dicho sujeto cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente y opcionalmente prescribir un estimulador de la eritropoyesis y/o hierro y/o quelante de hierro a dicho sujeto. En algunos aspectos, el examen comprende obtener una muestra biológica y determinar el nivel de hierro o hepcidina en dicha muestra.

Diversas realizaciones proporcionan terapias de combinación para el tratamiento de un trastorno de la homeostasis del hierro o sobrecarga de hierro. En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica y un estimulador de la eritropoyesis en cantidades terapéuticamente eficaces. En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica y hierro en cantidades terapéuticamente eficaces. En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento, por ejemplo que padece de sobrecarga de hierro, un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica y un quelante de hierro en cantidades terapéuticamente eficaces. En algunas realizaciones, la terapia de combinación comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento un anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica y un anticuerpo anti-hepcidina en cantidades terapéuticamente eficaces. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica y el otro agente en la terapia de combinación se formulan en una composición. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica y el otro agente en la terapia de combinación se formulan en composiciones separadas.

El sumario anterior no pretende definir cada aspecto de la invención, y se describen aspectos adicionales en otras secciones, tales como la descripción detallada. Todo el documento pretende considerarse como una descripción unificada, y debe entenderse se contemplan todas las combinaciones de características descritas en el presente documento, incluso si la combinación de características no se encuentran juntas en la misma frase, o párrafo, o sección de este documento.

Además de lo anterior, la invención puede incluir, como aspecto adicional, todas las realizaciones de la invención con un alcance más estrecho de cualquier modo que las variaciones definidas por párrafos específicos en el presente documento. Por ejemplo, determinados aspectos de la invención que se describen como un género, y debe entenderse que cada miembro de un género puede ser, individualmente, un aspecto de la invención. Además, aspectos descritos como un género o la selección de un miembro de un género, debe entenderse que abarcan combinaciones de dos o más miembros del género.

Debe entenderse que aunque se presentan diversas realizaciones en la memoria descriptiva usando la expresión "que comprende", en diversas circunstancias, una realización relacionada también puede describirse usando la expresión "que consiste en" o "que consiste esencialmente en". Debe entenderse que el término "un" o "una", se refiere a uno o más, por ejemplo, "una molécula de inmunoglobulina" se entiende que representa una o más moléculas de inmunoglobulina. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más," y "al menos uno" pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

Debe entenderse también que cuando se describe un intervalo de valores, la característica que está describiéndose podría ser un valor individual que se encuentra dentro del intervalo. Por ejemplo, "un pH de desde aproximadamente pH 4 hasta aproximadamente pH 6" podría ser, pero no se limita a, pH 4, 4,2, 4,6, 5,1 5,5 etc. y cualquier valor entre tales valores. Adicionalmente, "un pH de desde aproximadamente pH 4 hasta aproximadamente pH 6" no debe interpretarse que significa que el pH de una formulación en cuestión varía 2 unidades pH en el intervalo de desde pH 4 hasta pH 6 durante el almacenamiento, sino más bien que puede escogerse un valor en ese intervalo para el pH de la disolución, y el pH permanece tamponado a aproximadamente ese pH. En algunas realizaciones, cuando se usa el término "aproximadamente", significa el número mencionado más o menos el 5%, el 10%, el 15% o más del número mencionado. La variación real prevista puede determinarse a partir del contexto. Aunque el/los solicitante(s) inventó/inventaron el alcance completo de la invención descrita en el presente documento, los solicitantes no pretenden reivindicar la materia descrita en el trabajo de técnica anterior de otros. Por tanto, en el caso de que la oficina de patentes u otra entidad o individuo indique a los solicitantes la existencia de técnica anterior establecida legalmente (*statutory prior art*) dentro del alcance de una reivindicación, el/los solicitantes se reservan el derecho a ejercer derechos de modificación según las leyes de patentes aplicables para redefinir la materia de tal reivindicación para que excluya específicamente tal técnica anterior establecida legalmente o variaciones obvias de la técnica anterior establecida legalmente del alcance de tal reivindicación. Las variaciones de la invención definidas por tales reivindicaciones modificadas también se pretenden como aspectos de la presente divulgación.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B muestran dos representaciones esquemáticas de los dominios transmembrana y extracelular de ferroportina.

5 La figura 2 muestra que el anticuerpo anti-ferroportina 31A5 reconoce la secuencia peptídica de ferroportina (ANIVPETSPE, residuos 439-449 de SEQ ID NO: 16).

La figura 3 muestra que el anticuerpo anti-ferroportina 31A5 conserva la actividad de exportar hierro de la ferroportina en un ensayo de respuesta a hierro *in vitro*.

La figura 4 muestra que el anticuerpo anti-ferroportina 31A5 protege a la ferroportina de la internalización y degradación.

10 Las figuras 5A y 5B muestran que el anticuerpo anti-ferroportina 31A5 detecta la expresión de ferroportina en células mediante inmunohistoquímica.

La figura 6 proporciona las CDR de cadena pesada para los anticuerpos 37A2 (SEQ ID NO: 32-34), 37B9 (SEQ ID NO: 42-44), 37C8 (SEQ ID NO: 52-54), 37G8 (SEQ ID NO: 62-64), 38A4 (SEQ ID NO: 72-74), 38C8 (SEQ ID NO: 82-84), 38D2 (SEQ ID NO: 92-94), 38E3 (SEQ ID NO: 102-104) y 38G6 (SEQ ID NO: 112-114).

15 La figura 7 proporciona las CDR de cadena ligera para los anticuerpos 37A2 (SEQ ID NO: 29-31), 37B9 (SEQ ID NO: 39-41), 37C8 (SEQ ID NO: 49-51), 37G8 (SEQ ID NO: 59-61), 38A4 (SEQ ID NO: 69-71), 38C8 (SEQ ID NO: 79-81), 38D2 (SEQ ID NO: 89-91), 38E3 (SEQ ID NO: 99-101) y 38G6 (SEQ ID NO: 109-111).

La figura 8A proporciona las secuencias de aminoácidos y ADNc de las regiones variables pesadas y ligeras de los anticuerpos 38G6 y 38E3.

20 La figura 8B proporciona las secuencias de aminoácidos y ADNc de las regiones variables pesadas y ligeras de los anticuerpos 38D2 y 38C8.

La figura 8C proporciona las secuencias de aminoácidos y ADNc de las regiones variables pesadas y ligeras de los anticuerpos 38A4 y 37G8.

25 La figura 8D proporciona las secuencias de aminoácidos y ADNc de las regiones variables pesadas y ligeras de los anticuerpos 37C8 y 37B9.

La figura 8E proporciona las secuencias de aminoácidos y ADNc de las regiones variables pesadas y ligeras del anticuerpo 37A2.

La figura 9 demuestra que los anticuerpos anti-ferroportina funcionales y no funcionales reconocen epítomos similares en la ferroportina.

30 Descripción detallada

La ferroportina (SEQ ID NO: 16) es una proteína multitransmembrana que se predice que tiene o bien diez o bien doce dominios transmembrana. Basándose en diagramas de topología, se predice que menos del 20% de los residuos son extracelulares, y se predice que el bucle extracelular más largo tiene sólo 57 residuos de longitud. La figura 1 muestra dos representaciones esquemáticas de los dominios transmembrana y extracelular de ferroportina. En la figura 1A, los dominios extracelulares corresponden a los aminoácidos 46-60 (bucle 1), 116-126 (bucle 2), 204-205 y 325-342 (bucle 3), 394-449 (bucle 4) y 513-517 (bucle 5) de SEQ ID NO: 16. En la figura 1B, los dominios extracelulares corresponden a los aminoácidos 35-57 (bucle 1), 116-124 (bucle 2), 332-340 (bucle 3), 393-449 (bucle 4) y 515-518 (bucle 5) de SEQ ID NO: 16.

40 La descripción proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a ferroportina o a los bucles 1, 2, 3 y 4 de ferroportina (tal como se representa en las figuras 1A o 1B), o fragmentos de los mismos, con alta afinidad. Otros aspectos de la divulgación proporcionan anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, que pueden conservar la actividad de ferroportina y aumentar los niveles de hierro circulante, o bien en sujetos con homeostasis del hierro normal o bien en sujetos con riesgo de padecer o que padecen trastornos de la homeostasis del hierro, incluyendo trastornos que surgen de niveles elevados de hepcidina. En algunas realizaciones, los anticuerpos dados a conocer en el presente documento inhiben los efectos de hepcidina sobre la expresión en superficie de ferroportina. En algunas realizaciones, los anticuerpos dados a conocer en el presente documento impiden la internalización y degradación de ferroportina, incluyendo degradación mediada por hepcidina de ferroportina, manteniendo de ese modo la homeostasis del hierro.

1. Anticuerpos anti-ferroportina y agentes de unión específica

50 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos ensamblados completamente, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos

biespecíficos), fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a un antígeno (incluyendo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos) y péptidos recombinantes que comprenden lo anterior siempre que presenten la actividad biológica deseada. Se contemplan multímeros o agregados de moléculas intactas y/o fragmentos, incluyendo anticuerpos derivatizados químicamente. Se contemplan anticuerpos de cualquier clase o subclase de isotipo, incluyendo IgG, IgM, IgD, IgA, e IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, o cualquier alotipo. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En algunas realizaciones, los anticuerpos presentan características deseables tales como afinidad de unión tal como se mide mediante K_D (constante de disociación de equilibrio) para ferroportina en el intervalo de 1×10^{-6} M o menos, o que oscila hasta 10^{-16} M o inferior, (por ejemplo, aproximadamente 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} , 10^{-16} M o menos). Una mayor o mejor afinidad se caracteriza por una K_D inferior. Una estimación de la constante de disociación de equilibrio puede determinarse monitorizando la unión de anticuerpo a células que expresan ferroportina a lo largo de un intervalo de concentraciones de anticuerpo. Para determinar la afinidad de unión del anticuerpo, se siembra en placa una línea de células HEK 293 modificada por ingeniería genética para expresar de manera inducible ferroportina humana a 50.000 células por pocillo de una placa recubierta con poli-D-lisina de paredes negras, de fondo transparente de 96 pocillos (Becton-Dickinson, Franklin Lakes NJ) y se induce, usando una concentración final de 10 µg/ml de doxiciclina en un sistema inducible por Tet, para expresar ferroportina en presencia de citrato férrico. Tras la eliminación del reactivo de inducción, se sustituye entonces el medio de las células por cantidades crecientes de anticuerpo en DMEM frío con FBS al 10% 1X penicilina/estreptomina/glutamina y se incuban durante 30 minutos a 4°C. Tras esto, se lavan las células cuidadosamente cuatro veces con 200 µl/pocillo de PBS frío y se incuban con una concentración de saturación (5 µg/ml) de un conjugado de anticuerpo anti-ratón H+L AlexaFluor 488 (Invitrogen Inc, Carlsbad CA) y se incuban en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Una vez que se completa esto se lavan entonces las células cuatro veces con 200 µl/pocillo de PBS frío, se dejan en 100 µl/pocillo de PBS frío y se leen inmediatamente para determinar la intensidad de fluorescencia relativa en un fluorímetro tal como un dispositivo Envision de Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Waltham MA). A partir de los datos de intensidad de fluorescencia, se establece entonces una curva de unión, cuya CE_{50} representa entonces una K_D aproximada.

En otras realizaciones, los anticuerpos presentan especificidad por ferroportina. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo es "específico para" o "se une específicamente" a ferroportina humana cuando tiene una afinidad de unión significativamente superior para, y en consecuencia puede distinguir, ferroportina humana en comparación con otras proteínas no relacionadas en familias diferentes. En algunas realizaciones, tales anticuerpos también pueden reaccionar de manera cruzada con ferroportina de otras especies, tal como ferroportina de ratón, de rata o de primate; mientras que en otras realizaciones, los anticuerpos se unen sólo a ferroportina humana o de primate y no significativamente a ferroportina de roedores.

Aún en otras realizaciones, los anticuerpos pueden promover la conservación de ferroportina. "Conservación de ferroportina" o "conservación de la actividad de ferroportina" tal como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad para aumentar o mantener el flujo de salida de hierro regulado por ferroportina y puede detectarse como nivel aumentado relativamente de flujo de salida de hierro en presencia del anticuerpo que promueve la conservación de ferroportina, en comparación con el nivel de flujo de salida de hierro en ausencia de ese anticuerpo. Por ejemplo, en presencia de un anticuerpo que promueve la conservación de ferroportina, el flujo de salida de hierro puede aumentar, los niveles de hierro intracelular pueden disminuir y/o los niveles de hierro circulante pueden aumentar. En algunas realizaciones, la conservación de ferroportina puede producirse en células normales y sujetos normales. En otras realizaciones, la conservación de ferroportina puede producirse en presencia de moléculas, por ejemplo, hepcidina, que de lo contrario alterarían el flujo de salida de hierro regulado por ferroportina. En algunas realizaciones, la conservación de ferroportina se produce en presencia de una cantidad de hepcidina humana eficaz para degradar ferroportina al 100% o aproximadamente al 99%, o aproximadamente al 98%, o aproximadamente al 97%, o aproximadamente al 96%, o aproximadamente al 95% o aproximadamente al 94%, o aproximadamente al 93%, o aproximadamente al 92%, o aproximadamente al 91%, o aproximadamente al 90%, o aproximadamente al 85%, o aproximadamente al 80%, o aproximadamente al 75% o inferior. En algunas realizaciones, la conservación de ferroportina puede producirse en células o sujetos que tienen un trastorno de la homeostasis del hierro. En algunas realizaciones, el anticuerpo disminuye la concentración de hierro intracelular y/o aumenta la concentración de hierro circulante a una CE_{50} de aproximadamente 10^{-6} M o menos, o de aproximadamente 10^{-7} M o menos, o de aproximadamente 10^{-8} M o menos, o de aproximadamente 10^{-9} M o menos. La capacidad de los anticuerpos para conservar la actividad de ferroportina y/o mantener el flujo de salida de hierro puede detectarse mediante ensayos tales como los expuestos en el ejemplo 3. En diversas realizaciones, en presencia de hepcidina, el anticuerpo disminuye la concentración de hierro intracelular y/o aumenta la concentración de hierro circulante a una CI_{50} de aproximadamente 10^{-6} M o menos, o de aproximadamente 10^{-7} M o menos, o de aproximadamente 10^{-8} M o menos, o de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que inhiben (o neutralizan) la internalización y/o degradación de ferroportina, incluyendo internalización y/o degradación dependiente de hepcidina, *in vitro* y preferiblemente también *in vivo*. La capacidad de los anticuerpos para inhibir la internalización y/o degradación de ferroportina puede detectarse mediante ensayos tales como los expuestos en el ejemplo 6. En aspectos a modo de ejemplo, los

anticuerpos monoclonales inhiben (o neutralizan) la degradación de ferroportina que se produce en respuesta a niveles altos de hierro (y/o inflamación). En algunas realizaciones, la unión de hepcidina a ferroportina no se inhibe por los anticuerpos que conservan ferroportina dados a conocer en el presente documento.

5 Los anticuerpos anti-ferroportina que pueden conservar ferroportina son terapéuticamente útiles para los trastornos de la homeostasis del hierro y se espera que aumenten los niveles de hierro sérico y/o mejoren el número o las características de glóbulos rojos tal como se miden a través de uno o más marcadores, por ejemplo, niveles de ferritina/hierro, recuento de glóbulos rojos, características de glóbulos rojos (contenido en hemoglobina y/o volumen celular), características de glóbulos rojos tempranos (número de reticulocitos, contenido en hemoglobina o volumen celular) (Clinical Hematology, tercera edición, Lippincott, Williams y Wilkins; editor Mary L. Turgeon, 1999), o el transporte de hierro.

En aspectos a modo de ejemplo específicos, la divulgación contempla:

1) un anticuerpo monoclonal que conserva una, dos, tres, cuatro, cinco o seis cualesquiera de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3 de los anticuerpos 31A5, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6, incluyendo opcionalmente una o dos mutaciones en tales CDR;

15 2) un anticuerpo monoclonal que conserva todas de CDRH1, CDRH2, CDRH3 o la región variable de cadena pesada de los anticuerpos 31A5, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6, incluyendo opcionalmente una o dos mutaciones en tales CDR;

20 3) un anticuerpo monoclonal que conserva todas de CDRL1, CDRL2, CDRL3 o la región variable de cadena ligera de los anticuerpos 31A5, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6, incluyendo opcionalmente una o dos mutaciones en tales CDR,

4) un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo lineal o tridimensional de ferroportina que los anticuerpos 31A5, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6, por ejemplo tal como se determina mediante cristalografía de rayos X u otras técnicas biofísicas o bioquímicas tales como espectrometría de masas de intercambio de deuterio, barrido de alanina y ELISA de fragmentos peptídicos,

25 5) un anticuerpo monoclonal que se une a un péptido que consiste en los residuos de aminoácido 393-446 de ferroportina (SEQ ID NO: 16), y en algunas realizaciones que no se une a los residuos de aminoácido 75-96, 152-183, 330-338 o 542-571 de SEQ ID NO: 16,

6) un anticuerpo monoclonal que se une a un péptido que consiste en los residuos de aminoácido 439-449 de ferroportina (SEQ ID NO: 16), y

30 7) un anticuerpo monoclonal que compite con uno cualquiera de anticuerpos 31A5, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6 por la unión a ferroportina humana en más de aproximadamente el 75%, más de aproximadamente el 80%, o más de aproximadamente el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94% o el 95%.

35 En un aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-10 (31A5). En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29-34 (37A2). En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 39-44 (CDR de 37B9). Aún en otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 49-54 (CDR de 37C8). En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 59-64 (CDR de 37G8). En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69-74 (CDR de 38A4). En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 79-84 (CDR de 38C8). En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 89-94 (CDR de 38D2). En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 99-104 (CDR de 38E3). Aún en otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 109-114 (CDR de 38G6).

55 En algunos aspectos, el anticuerpo comprende las tres CDR de cadenas ligeras, las tres CDR de cadenas pesadas o las seis CDR. En algunos aspectos a modo de ejemplo, pueden combinarse dos CDR de cadenas ligeras de un anticuerpo con una tercera CDR de cadena ligera de un anticuerpo diferente. Alternativamente, puede combinarse una CDRL1 de un anticuerpo con una CDRL2 de un anticuerpo diferente y una CDRL3 de aún otro anticuerpo, particularmente cuando las CDR son altamente homólogas. De manera similar, pueden combinarse dos CDR de cadenas pesadas de un anticuerpo con una tercera CDR de cadena pesada de un anticuerpo diferente; o puede

combinarse una CDRH1 de un anticuerpo con una CDRH2 de un anticuerpo diferente y una CDRH3 de aún otro anticuerpo, particularmente cuando las CDR son altamente homólogas. La figura 6 proporciona las CDR de cadena pesada para los anticuerpos 37A2 (SEQ ID NO: 32-34), 37B9 (SEQ ID NO: 42-44), 37C8 (SEQ ID NO: 52-54), 37G8 (SEQ ID NO: 62-64), 38A4 (SEQ ID NO: 72-74), 38C8 (SEQ ID NO: 82-84), 38D2 (SEQ ID NO: 92-94), 38E3 (SEQ ID NO: 102-104) y 38G6 (SEQ ID NO: 112-114). La figura 7 proporciona las CDR de cadena ligera para los anticuerpos 37A2 (SEQ ID NO: 29-31), 37B9 (SEQ ID NO: 39-41), 37C8 (SEQ ID NO: 49-51), 37G8 (SEQ ID NO: 59-61), 38A4 (SEQ ID NO: 69-71), 38C8 (SEQ ID NO: 79-81), 38D2 (SEQ ID NO: 89-91), 38E3 (SEQ ID NO: 99-101) y 38G6 (SEQ ID NO: 109-111).

También pueden usarse CDR consenso. En un aspecto, el anticuerpo comprende una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42 (GYMH, CDR1 de cadena pesada de los anticuerpos 37B9, 37C8, 37G8, 38C8 y 38E3), SEQ ID NO: 115 (GYXMH, consenso de CDR1 de cadena pesada de 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38C8 y 38E3), SEQ ID NO: 116 (GYXXH, consenso de CDR1 de cadena pesada de 37B9, 37C8, 37G8, 38C8, 38D2 y 38E3), SEQ ID NO: 117 (WINPHTGGKKNYXQXFQG, consenso de CDR2 de cadena pesada para los anticuerpos 37B9, 37C8, 37G8, 38C8 y 38E3), SEQ ID NO: 118 (DPSXXVXGSPFYXGLDV, consenso de CDR3 de cadena pesada para los anticuerpos 37B9, 37C8, 37G8, 38C8 y 38E3), SEQ ID NO: 119 (KISNRXS, consenso de CDR2 de cadena ligera para los anticuerpos 37B9, 37C8, 37G8, 38C8 y 38E3): en las que X es cualquier aminoácido.

En diversos aspectos, el anticuerpo comprende WINPHTGGKKNYX₁QX₂FQG (SEQ ID NO: 136), en la que X₁ y X₂ es cualquier aminoácido; o X₁ y X₂ es A, G, K o R, cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos; o X₁ es A o G o sustitución conservativa de los mismos, y X₂ es cualquier aminoácido; o X₁ es cualquier aminoácido y X₂ es K o R o sustitución conservativa de los mismos, o X₁ es A o G o sustitución conservativa de los mismos y X₂ es K o R o sustitución conservativa de los mismos.

En diversos otros aspectos, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos WINPHTGGKKNYX₁QX₂FQG (SEQ ID NO: 136), en la que X₁ y X₂ es A, G, K, R, cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos; y la secuencia de aminoácidos DPSX₁X₂VX₃GPSFYX₄GLDV (SEQ ID NO: 137), en la que X₁, X₂, X₃ y X₄ es A, F, I, L, V, S, T, Y cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos.

En diversos aspectos, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos DPSX₁X₂VX₃GPSFYX₄GLDV (SEQ ID NO: 137), en la que X₁, X₂, X₃ y X₄ es cualquier aminoácido; o X₁, X₂, X₃ y X₄ es A, F, I, L, V, S, T, Y, cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos; o X₁ es I o L o sustitución conservativa de los mismos y X₂, X₃ y X₄ es cualquier aminoácido; o X₂ es A, V, o S o sustitución conservativa de los mismos y X₁, X₃ y X₄ es cualquier aminoácido; o X₃ es A o T o sustitución conservativa de los mismos y X₁, X₂ y X₄ es cualquier aminoácido; o X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos y X₁, X₂ y X₃ es cualquier aminoácido; o X₁ es I o L o sustitución conservativa de los mismos, X₂ es A V o S o sustitución conservativa de los mismos, y X₃ y X₄ es cualquier aminoácido; o X₁ es cualquier aminoácido, X₂ es A, V o S o sustitución conservativa de los mismos, X₃ es A o T o sustitución conservativa de los mismos y X₄ es cualquier aminoácido; o X₁ y X₂ es cualquier aminoácido, X₃ es A o T o sustitución conservativa de los mismos y X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos; o X₁, X₂ y X₃ es cualquier aminoácido, y X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos; o X₁ es I o L o sustitución conservativa de los mismos y X₂ es A, V, o S o sustitución conservativa de los mismos, X₃ es A o T o sustitución conservativa de los mismos y X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos; X₂ y X₃ es cualquier aminoácido, X₁ es I o L o sustitución conservativa de los mismos y X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos; o X₁ y X₂ es cualquier aminoácido, X₃ es A o T o sustitución conservativa de los mismos y X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos; o X₁ y X₃ es cualquier aminoácido, X₂ es A, V o S o sustitución conservativa de los mismos y X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos; o X₁ y X₄ es cualquier aminoácido, X₂ es A, V o S o sustitución conservativa de los mismos y X₃ es A o T o sustitución conservativa de los mismos; o X₁, X₂ y X₃ es cualquier aminoácido y X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos; o X₁, X₂ y X₄ es cualquier aminoácido y X₃ es A o T o sustitución conservativa de los mismos; o X₁, X₃ y X₄ es cualquier aminoácido y X₂ es A, V o S o sustitución conservativa de los mismos, o X₂, X₃ y X₄ es cualquier aminoácido y X₁ es I o L o sustitución conservativa de los mismos; o X₁ es I o L o sustitución conservativa de los mismos, X₂ es cualquier aminoácido, X₃ es A o T o sustitución conservativa de los mismos y X₄ es Y o F o sustitución conservativa de los mismos.

Una cualquiera de las CDR consenso dadas a conocer en el presente documento puede combinarse con otras dos CDR de la misma cadena (por ejemplo pesada o ligera) de cualquier anticuerpo, por ejemplo para formar una región variable de cadena pesada o ligera adecuada.

Aún en otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 31A5, por ejemplo, SEQ ID NO: 4 (región variable de cadena pesada de 31A5), y/o SEQ ID NO: 2 (región variable de cadena ligera de 31A5). En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 37A2, por ejemplo, SEQ ID NO: 28 (región variable de cadena pesada de 37A2) y/o SEQ ID NO: 26 (región variable de cadena ligera de 37A2). En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 37B9, por ejemplo, SEQ ID NO: 38 (región variable de cadena pesada de 37B9) y/o SEQ ID NO: 36 (región variable de cadena ligera de 37B9). En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 37C8, por ejemplo, SEQ ID NO: 48 (región variable de cadena pesada de 37C8) y/o SEQ ID NO: 46 (región variable de cadena ligera de 37C8). En otra

realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 37G8, por ejemplo, SEQ ID NO: 58 (región variable de cadena pesada de 37G8) y/o SEQ ID NO: 56 (región variable de cadena ligera de 37G8). En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 38A4, por ejemplo, SEQ ID NO: 68 (región variable de cadena pesada de 38A4) y/o SEQ ID NO: 66 (región variable de cadena ligera de 38A4). En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 38C8, por ejemplo, SEQ ID NO: 78 (región variable de cadena pesada de 38C8) y/o SEQ ID NO: 76 (región variable de cadena ligera de 38C8). Aún en otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 38D2, por ejemplo, SEQ ID NO: 88 (región variable de cadena pesada de 38D2) y/o SEQ ID NO: 86 (región variable de cadena ligera de 38D2). En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 38E3, por ejemplo, SEQ ID NO: 98 (región variable de cadena pesada de 38E3) y/o SEQ ID NO: 96 (región variable de cadena ligera de 38E3). En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo 38G6, por ejemplo, SEQ ID NO: 108 (región variable de cadena pesada de 38G6) y/o SEQ ID NO: 106 (región variable de cadena ligera de 38G6).

En algunos aspectos, se describe un anticuerpo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 (región variable de cadena pesada de 31A5), 2 (región variable de cadena ligera de 31A5), 28 (región variable de cadena pesada de 37A2), 26 (región variable de cadena ligera de 37A2), 38 (región variable de cadena pesada de 37B9), 36 (región variable de cadena ligera de 37B9), 48 (región variable de cadena pesada de 37C8), 46 (región variable de cadena ligera de 37C8), 58 (región variable de cadena pesada de 37G8), 56 (región variable de cadena ligera de 37G8), 68 (región variable de cadena pesada de 38A4), 66 (región variable de cadena ligera de 38A4), 78 (región variable de cadena pesada de 38C8), 76 (región variable de cadena ligera de 38C8), 88 (región variable de cadena pesada de 38D2), 86 (región variable de cadena ligera de 38D2), 98 (región variable de cadena pesada de 38E3), 96 (región variable de cadena ligera de 38E3), 108 (región variable de cadena pesada de 38G6) y 106 (región variable de cadena ligera de 38G6), comprendiendo adicionalmente el polipéptido al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5-10 (CDR de 31A5), 29-34 (37A2), 39-44 (37B9), 49-54 (37C8), 59-64 (37G8), 69-74 (38A4), 79-84 (38C8), 89-94 (38D2), 99-104 (38E3) y 109-114 (38G6). En algunas realizaciones, el polipéptido con porcentaje de identidad con la región variable de cadena ligera puede comprender una, dos o tres de las CDR de cadena ligera. En otros aspectos, el polipéptido con porcentaje de identidad con la región variable de cadena pesada puede comprender una, dos o tres de las CDR de cadena pesada. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el polipéptido puede incluir una secuencia que comprende una o dos modificaciones en cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 5-10 (CDR de 31A5), 29-34 (37A2), 39-44 (37B9), 49-54 (37C8), 59-64 (37G8), 69-74 (38A4), 79-84 (38C8), 89-94 (38D2), 99-104 (38E3) y 109-114 (38G6).

También se da a conocer un anticuerpo que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más idéntica a las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 34G3, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38D6, 38E3 y 38G6, se contempla específicamente que el polipéptido comprenda además al menos una o más de las CDR seleccionadas del grupo que consiste en CDR de 31A5, CDR de 37A2, CDR de 37B9, CDR de 37C8, CDR de 37G8, CDR de 38A4, CDR de 38C8, CDR de 38D2, CDR de 38E3 y CDR de 38G6. En cualquiera de los aspectos anteriores, el polipéptido incluye una secuencia que comprende una o dos modificaciones en una CDR seleccionada del grupo que consiste en CDR de 31A5, CDR de 37A2, CDR de 37B9, CDR de 37C8, CDR de 37G8, CDR de 38A4, CDR de 38C8, CDR de 38D2, CDR de 38E3 y CDR de 38G6.

También se proporciona las secuencias de aminoácidos y ADNc para las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa del anticuerpo 31A5. La secuencia de ADNc que codifica para la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 31A5, incluyendo la región constante, se expone en SEQ ID NO: 11. La secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 31A5, incluyendo la región constante, se expone en SEQ ID NO: 12 (de la cual los residuos 1-20 corresponden al péptido señal y el resto es el polipéptido maduro). La secuencia de ADNc que codifica para la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 31A5, incluyendo la región constante, se expone en SEQ ID NO: 13. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 31A5, incluyendo la región constante, se expone en SEQ ID NO: 14 (de la cual los residuos 1-17 corresponden al péptido señal y el resto es el polipéptido maduro).

En otra realización, el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada de cualquiera de anticuerpos 34G3, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6 y opcionalmente comprende una región constante seleccionada del grupo que consiste en una región constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEQ ID NO: 120-121) y una región constante de cadena pesada de IgG2 humana (SEQ ID NO: 122-123). En otra realización a modo de ejemplo, el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos 34G3, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6 y opcionalmente comprende una región constante de cadena ligera kappa humana (SEQ ID NO: 124-125). En otra realización a modo de ejemplo, el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos 34G3, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8,

38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6 y opcionalmente comprende una región constante seleccionada del grupo que consiste en una región constante de cadena ligera lambda humana tipo C1 (SEQ ID NO: 126-127), una región constante de cadena ligera lambda humana tipo C2 (SEQ ID NO: 128-129), una región constante de cadena ligera lambda humana tipo C3 (SEQ ID NO: 130-131), una región constante de cadena ligera lambda humana tipo C6 (SEQ ID NO: 132-133) y una región constante de cadena ligera lambda humana tipo C7 (SEQ ID NO: 134-135)

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo, tal como se define ese término en el presente documento, obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural o modificaciones postraduccionales alternativas que pueden estar presentes en cantidades minoritarias, ya se produzcan a partir de hibridomas o de técnicas de ADN recombinante. Los ejemplos no limitativos de anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos de ratón, de conejo, de rata, de pollo, quiméricos, humanizados o humanos, anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a un antígeno (incluyendo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos), maxicuerpos, nanocuerpos y péptidos recombinantes que comprenden lo anterior siempre que presenten la actividad biológica deseada, o variantes o derivados de los mismos. La humanización o modificación de la secuencia de un anticuerpo para que sea más similar a la humana se describe en, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immunol., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol., 31(3): 169-217 (1994); y Kettleborough, CA. *et al.*, Protein Engineering, 4(7):773-83 (1991); Co, M. S., *et al.* (1994), J. Immunol 152, 2968-2976; Srudnicka *et al.*, Protein Engineering 7: 805-814 (1994). Un método para aislar anticuerpos monoclonales humanos es el uso de tecnología de presentación en fago. Se describe la presentación en fago en por ejemplo, Dower *et al.*, documento WO 91/17271, McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047 y Caton y Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990). Otro método para aislar anticuerpos monoclonales humanos usa animales transgénicos que no tienen producción de inmunoglobulinas endógenas y se modifican por ingeniería genética para contener loci de inmunoglobulinas humanas. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993); documentos WO 91/10741, WO 96/34096, WO 98/24893 o publicación de solicitud de patente estadounidense n.ºs 2003/0194404, 2003/0031667 o 2002/0199213.

Un anticuerpo "aislado" se refiere a un anticuerpo, tal como se define ese término en el presente documento, que se ha identificado y separado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo lo más preferiblemente más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o preferiblemente plata. El anticuerpo aislado que se produce de manera natural incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, habitualmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una "inmunoglobulina" o "anticuerpo nativo" es una glicoproteína tetramérica. En una inmunoglobulina que se produce de manera natural, cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región "variable" ("V") de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxilo-terminal de cada cadena define una región constante y las regiones constantes de las cadenas pesadas son responsables principalmente de la función efectora. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) y épsilon (ϵ), y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Varios de éstos pueden dividirse adicionalmente en subclases o isotipos, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ). Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase en general, Fundamental Immunology, cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Los alotipos son variaciones en la secuencia de anticuerpos, a menudo en la región constante, que pueden ser inmunogénicos y están codificados por alelos específicos en seres humanos. Se han identificado alotipos para cinco de los genes de IGHC humanos, los genes de IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHA2 e IGHE, y se designan como alotipos G1m, G2m, G3m, A2m y Em, respectivamente. Se conocen al menos 18 alotipos Gm: nG1m(1), nG1m(2), G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5). Hay dos alotipos A2m A2m(l) y A2m(2).

Para una descripción detallada de la estructura y generación de anticuerpos, véase Roth, D. B., y Craig, N. L., *Cell*, 94:41 1-414 (1998). En resumen, el proceso para generar ADN que codifica para las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera se produce principalmente en células B en desarrollo. Antes de la redistribución y unión de diversos segmentos génicos de inmunoglobulinas, los segmentos génicos V, D, J y constante (C) se encuentran generalmente en proximidad relativamente estrecha en un único cromosoma. Durante la diferenciación de células B, se recombinan uno de cada uno de los miembros de las familias apropiadas de los segmentos génicos V, D, J (o sólo V y J en el caso de genes de cadenas ligeras) para formar regiones variables redistribuidas funcionalmente de los genes de inmunoglobulinas pesadas y ligeras. Este proceso de redistribución de segmentos génicos parece ser secuencial. En primer lugar, se producen las uniones de cadenas pesadas D-a-J, seguido por las uniones de cadenas pesadas V-a-DJ y las uniones de cadenas ligeras V-a-J. Además de la redistribución de los segmentos V, D y J, se genera diversidad adicional en el repertorio primario de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas por medio de recombinación variable en las ubicaciones en las que se unen los segmentos V y J en la cadena ligera y en las que se unen los segmentos D y J de la cadena pesada. Tal variación en la cadena ligera se produce normalmente dentro del último codón del segmento génico V y el primer codón del segmento J. Se produce una imprecisión similar en la unión en el cromosoma de cadenas pesadas entre los segmentos D y J_H y puede extenderse a lo largo de tanto como 10 nucleótidos. Además, pueden insertarse varios nucleótidos entre los segmentos génicos D y J_H y entre los segmentos génicos V_H y D que no están codificados por ADN genómico. La adición de estos nucleótidos se conoce como diversidad de región N. El efecto neto de tales redistribuciones en los segmentos génicos de regiones variables y la recombinación variable que puede producirse durante tal unión es la producción de un repertorio de anticuerpos primarios.

El término región "hipervariable" se refiere a residuos de aminoácido de una región determinante de complementariedad o CDR (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada tal como se describe por Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Incluso una única CDR puede reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad inferior que el sitio de unión a antígeno completo que contiene todas las CDR.

Una definición alternativa de residuos de un "bucle" hipervariable se describe por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987) como los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada.

Residuos de "entramado" o FR son los residuos de regiones variables distintos de los residuos de regiones hipervariables.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de una inmunoglobulina intacta, preferiblemente una región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto, e incluyen anticuerpos multiespecíficos (bienespecíficos, triespecíficos, etc.) formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Pueden producirse fragmentos de inmunoglobulinas mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

Los ejemplos no limitativos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (región variable), anticuerpos de dominio (dAc, que contienen un dominio V_H) (Ward *et al.*, *Nature*, 341:544-546, 1989), fragmentos de regiones determinantes de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv, que contienen dominios V_H y V_L en una única cadena de polipéptido) (Bird *et al.*, *Science*, 242:423-426, 1988, y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988, que incluyen opcionalmente un ligador de polipéptido; y opcionalmente multiespecífico, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)), fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos (dominios V_H y V_L en una única cadena de polipéptido que se aparean con dominios V_L y V_H complementarios de otra cadena) (documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)), triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos (scFv fusionado a CH₃ por medio de un ligador de péptido (sin bisagra) o por medio de una bisagra de IgG) (Olafsen, *et al.*, *Protein Eng Des Sel.* Abril de 2004; 17(4):315-23), anticuerpos lineales (segmentos Fd en tándem (V_H-CH₁-V_H-CH₁) (Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995)); anticuerpos recombinantes quelantes (crAc, que pueden unirse a dos epitopos adyacentes en el mismo antígeno) (Neri *et al.*, *J Mol Biol.*, 246:367-73, 1995), bicuerpos (Fab-scFv bienespecífico) o tricuerpos (Fab-(scFv)₂ triespecífico) (Schoonjans *et al.*, *J Immunol.* 165:7050-57, 2000; Willems *et al.*, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 786: 161-76, 2003), intracuerpos (Biocca, *et al.*, *EMBO J.*, 9:101-108, 1990; Colby *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:17616-21, 2004) que pueden comprender también secuencias señal celulares que retienen o dirigen el anticuerpo intracelularmente (Mhashilkar *et al.*, *EMBO J.*, 14:1542-51, 1995; Wheeler *et al.*, *FASEB J.*, 17:1733-5, 2003), transcuerpos (anticuerpos permeables en células que contienen un dominio de transducción de proteínas (PTD) fusionado a scFv (Heng *et al.*, *Med Hypotheses.*, 64: 1105-8, 2005), nanocuerpos (dominio variable de aproximadamente 15 kDa de la cadena pesada) (Cortez-Retamozo *et al.*, *Cancer Research* 64:2853-57, 2004), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) (documento WO 03/041600, publicación de patente estadounidense 2003/0133939 y publicación de patente estadounidense 2003/0118592), una proteína de fusión de dominio de unión a antígeno-inmunoglobulina, un anticuerpo camelizado (en el que V_H se recombina con una región constante que contiene dominios bisagra, CH₁, CH₂ y CH₃) (Desmyter *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:26285-90, 2001; Ewert *et al.*, *Biochemistry*, 41:3628-36, 2002; publicación de patente estadounidense n.ºs 2005/0136049 y 2005/0037421), un anticuerpo que contiene V_HH, anticuerpos de cadena pesada (HCAC,

homodímeros de dos cadenas pesadas que tienen la estructura H2L2), o variantes o derivados de los mismos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específico al polipéptido, tal como una secuencia de CDR, siempre que el anticuerpo conserve la actividad biológica deseada.

5 El término "variante", cuando se usa en conexión con anticuerpos, se refiere a una secuencia de polipéptido de un anticuerpo que contiene al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácido en la región variable o la porción equivalente a la región variable, siempre que la variante conserve la afinidad de unión o actividad biológica deseada. Además, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden tener modificaciones de aminoácidos en la región constante para modificar la función efectora del anticuerpo, incluyendo semivida o aclaramiento, actividad de ADCC y/o CDC. Tales modificaciones pueden potenciar la farmacocinética o potenciar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de cáncer, por ejemplo. Véase Shields *et al.*, J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001). En el caso de IgG1, las modificaciones en la región constante, particularmente la región bisagra o CH2, pueden aumentar o disminuir la función efectora, incluyendo la actividad de ADCC y/o CDC. En otras realizaciones, se modifica una región constante de IgG2 para disminuir la formación de agregados anticuerpo-antígeno. En el caso de IgG4, las modificaciones en la región constante, particularmente la región bisagra, pueden reducir la formación de semianticuerpos.

20 El término "modificación", cuando se usa en conexión con anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento, incluye pero no se limita a, uno o más cambios de aminoácidos (incluyendo sustituciones, inserciones o delecciones); modificaciones químicas que no interfieren con la actividad de unión a ferroporfina; modificación covalente mediante conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico; marcaje (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas); unión covalente a polímeros tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, los polipéptidos modificados (incluyendo anticuerpos) conservarán las propiedades de unión de moléculas no modificadas de la invención.

25 El término "derivado", cuando se usa en conexión con anticuerpos o polipéptidos de la invención se refiere a anticuerpos o polipéptidos que se modifican covalentemente mediante conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcaje (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión covalente a polímeros tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, los derivados conservarán las propiedades de unión de moléculas no derivatizadas de la invención.

30 Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos u otros multiespecíficos e incluyen reticulación química, uso de cremalleras de leucina (Kostelny *et al.*, J. Immunol 148: 1547-1553, 1992); tecnología de diacuerpos (Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:6444-48, 1993); dímeros de scFv (Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368, 1994), anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, Protein Eng., 8:1057-62, 1995); y anticuerpos recombinantes quelantes (Neri *et al.*, J. Mol. Biol, 246:367-73, 1995).

Por tanto, pueden generarse una variedad de composiciones que comprenden una, dos y/o tres CDR de una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo mediante técnicas conocidas en la técnica.

A. Producción recombinante de anticuerpos

40 También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican para anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento, opcionalmente unidos operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped, vectores y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos y técnicas recombinantes para la producción de los anticuerpos, que pueden comprender cultivar la célula huésped de modo que se exprese el ácido nucleico y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo del cultivo de célula huésped o medio de cultivo.

45 Puede determinarse la secuencia de aminoácidos relevante de una inmunoglobulina de interés mediante secuenciación de proteínas directa, y pueden diseñarse secuencias de nucleótidos codificantes adecuadas según una tabla de codones universal. Alternativamente, puede aislarse ADNc o genómico que codifica para los anticuerpos monoclonales y secuenciarse a partir de células que producen tales anticuerpos usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales).

50 La clonación se lleva a cabo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press). Por ejemplo, puede construirse una biblioteca de ADNc mediante transcripción inversa de ARNm poliA+, preferiblemente ARNm asociado a membrana y examinarse la biblioteca usando sondas específicas para secuencias génicas de polipéptidos de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, en un aspecto se usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar ADNc (o porciones de ADNc de longitud completa) que codifican para un segmento génico de inmunoglobulina de interés (por ejemplo, un segmento variable de cadena ligera o pesada). Las secuencias amplificadas pueden clonarse fácilmente en cualquier vector adecuado, por ejemplo, vectores de expresión, vectores de minigenes o vectores de presentación

en fago. Se apreciará que el método particular de clonación usado no es crítico, siempre que sea posible determinar la secuencia de alguna porción del polipéptido de inmunoglobulina de interés.

5 Una fuente de ácidos nucleicos de anticuerpos es un hibridoma producido obteniendo una célula B a partir de un animal inmunizado con el antígeno de interés y fusionándolo con una célula inmortal. Alternativamente, puede aislarse ácido nucleico de células B (o de bazo completo) del animal inmunizado. Aún otra fuente de ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos es una biblioteca de tales ácidos nucleicos generados, por ejemplo, a través de tecnología de presentación en fago. Pueden identificarse polinucleótidos que codifican para péptidos de interés, por ejemplo, péptidos de región variable con características de unión deseadas, mediante técnicas convencionales tales como cribado.

10 Puede determinarse la secuencia que codifica para una región variable completa del polipéptido de inmunoglobulina; sin embargo, en ocasiones será adecuado secuenciar sólo una porción de una región variable, por ejemplo, la porción que codifica para CDR. La secuenciación se lleva a cabo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, y Sanger, F. *et al.*, (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467). Comparando la secuencia del ácido nucleico clonado con secuencias publicadas de genes de inmunoglobulinas humanas y ADNc, un experto podrá determinar fácilmente, dependiendo de la región secuenciada, (i) el uso de segmento de línea germinal del polipéptido de inmunoglobulina de hibridoma (incluyendo el isotipo de la cadena pesada) y (ii) la secuencia de las regiones variables de cadena pesada y ligera, incluyendo las secuencias que resultan de la adición de región N y el proceso de mutación somática. Una fuente de información de secuencia de genes de inmunoglobulinas es el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

20 Tal como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "aislada" o secuencia de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que o bien (1) se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico o bien (2) se clona, se amplifica, se etiqueta o se distingue de otra manera de los ácidos nucleicos de fondo de modo que pueda determinarse la secuencia del ácido nucleico de interés. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta que, en forma o configuración, la que se encuentra en la naturaleza. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente a la de las células naturales.

30 Una vez aislado, el ADN puede unirse operativamente a las secuencias de control de la expresión o colocarse en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células huésped que de otra manera no producen la proteína inmunoglobulina, para dirigir la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. En la técnica se conoce bien la producción recombinante de anticuerpos.

35 Secuencias de control de la expresión se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

40 El ácido nucleico está operativamente unido cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente unido a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado de modo que facilita la traducción. En general, operativamente unido significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

45 En la técnica se conocen muchos vectores. Los componentes del vector pueden incluir uno o más de los siguientes: una secuencia señal (que puede, por ejemplo, dirigir la secreción del anticuerpo), un origen de replicación, uno o más genes marcadores selectivos (que pueden, por ejemplo, conferir resistencia a antibióticos u otros fármacos, deficiencias auxotróficas de complemento o suministrar nutrientes críticos no disponibles en los medios), un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción, todos los cuáles se conocen bien en la técnica.

55 Célula, línea celular y cultivo celular se usan a menudo de manera intercambiable y todas estas designaciones en el presente documento incluyen la progenie. Los transformantes y las células transformadas incluyen la célula objeto principal y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También debe entenderse que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido en ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica tal como se examinó en la célula transformada originalmente.

Las células huésped a modo de ejemplo incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores (es decir, un organismo multicelular). Las células huésped procariotas incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de expresión o clonación adecuados para polipéptidos o anticuerpos recombinantes. *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadería común, es el usado más comúnmente entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, varios géneros, especies y cepas distintos están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tal como *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, *Yarrowia*; *Candida*; *Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Pueden derivarse células huésped para la expresión de anticuerpo o polipéptido glicosilado a partir de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y variantes y las correspondientes células huésped de insecto permisivas a partir de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección de tales células están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV.

Células huésped de vertebrados también son huéspedes adecuados, y la producción recombinante de polipéptido o anticuerpo a partir de tales células se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son células de ovario de hámster chino, incluyendo células CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 y células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77: 4216 (1980)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 ó 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, [Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)]; células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hepatoma humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y Acad. Sci, 383: 44-68 (1982)); células MRC 5 o células FS4; o células de mieloma de mamífero.

Las células huésped se transforman o transfectan con los vectores o ácidos nucleicos descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas. Además, líneas celulares transfectadas y vectores novedosos con múltiples copias de unidades de transcripción separadas por un marcador selectivo son particularmente útiles para la expresión de anticuerpos.

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo descrito en el presente documento pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Met. Enz., 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem., 102: 255 (1980), las patentes estadounidenses n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; los documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente estadounidense con n.º de referencia 30.985 pueden usarse como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GentamicinaTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que conocerán los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las usadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la técnica.

Tras cultivar las células huésped, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, el residuo particulado, o bien células huésped o bien fragmentos lisados, se elimina, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración.

El anticuerpo puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico o preferiblemente cromatografía de afinidad, usando el antígeno de interés o proteína A o proteína G como ligando de afinidad. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que están basados en

5 cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Met. 62: 1-13 (1983)). Se recomienda proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se une es, lo más a menudo, agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como poli(estirenodivinil)benceno o vidrio de poro controlado permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio $C_H 3$, la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatofoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también son posibles dependiendo del anticuerpo que va a recuperarse.

10 B. Anticuerpos quiméricos y humanizados

Debido a que los anticuerpos quiméricos o humanizados son menos inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos monoclonales de roedor originales, pueden usarse para el tratamiento de seres humanos con mucho menos riesgo de anafilaxia. Por tanto, estos anticuerpos se contemplan en aplicaciones terapéuticas que implican la administración *in vivo* a un ser humano.

15 Por ejemplo, un anticuerpo de ratón con la administración *in vivo* repetida en el ser humano o bien solo o bien como un conjugado provocará una respuesta inmunitaria en el receptor, en ocasiones denominada respuesta de HAMA (anticuerpo humano anti ratón). La respuesta de HAMA puede limitar la eficacia del agente farmacéutico si se requiere una dosificación repetida. La inmunogenicidad del anticuerpo puede reducirse mediante modificación química del anticuerpo con un polímero hidrófilo tal como polietilenglicol o usando métodos de ingeniería genética para hacer que la estructura de unión del anticuerpo sea más similar a la humana.

20 La expresión "anticuerpo quimérico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene una secuencia derivada de dos anticuerpos diferentes que normalmente se originan a partir de especies diferentes. Lo más normalmente, los anticuerpos quiméricos comprenden dominios de Ig variables de un anticuerpo monoclonal de roedor fusionados a dominios de Ig constantes de ser humano. Tales anticuerpos pueden generarse usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica (véase Morrison, S. L., *et al.* (1984) "Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6841-6855; y Boulianne, G. L., *et al.*, Nature 312, 643-646. (1984)). Aunque algunos anticuerpos quiméricos monoclonales han demostrado ser menos inmunogénicos en seres humanos, los dominios de Ig variables de roedor todavía pueden conducir a una respuesta anti-roedor en el ser humano significativa.

30 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo derivado de un anticuerpo no humano, normalmente un anticuerpo monoclonal de roedor. Alternativamente, un anticuerpo humanizado puede derivarse de un anticuerpo quimérico.

35 Pueden lograrse anticuerpos humanizados mediante una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo: (1) injertar las regiones determinantes de complementariedad (CDR) no humanas en una región constante y de entramado humana (un procedimiento denominado en la técnica humanización a través de "injerto de CDR") o, alternativamente, (2) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "encubriéndolos" con una superficie similar a la humana mediante reemplazo de residuos de superficie (un procedimiento denominado en la técnica "remodelación de la superficie"). Estos métodos se dan a conocer en, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522 525 (1986); Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol, 44:65 92 (1988); Verhoefer *et al.*, Science 239: 1534 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3): 169 217 (1994); y Kettleborough, CA. *et al.*, Protein Eng. 4(7):773 83 (1991).

45 El injerto de CDR implica introducir una o más de las seis CDR a partir de los dominios de Ig variables de cadena pesada y ligera de ratón en las regiones de entramado apropiadas de un dominio de Ig variable de ser humano. Esta técnica (Riechmann, L., *et al.*, Nature 332, 323 (1988)), utiliza las regiones de entramado conservadas (FR1-FR4) como armazón para soportar los bucles de CDR que son los contactos principales con el antígeno. Sin embargo, una desventaja significativa del injerto de CDR es que puede dar como resultado un anticuerpo humanizado que tiene una afinidad de unión sustancialmente menor que el anticuerpo de ratón original, debido a que los aminoácidos de las regiones de entramado pueden contribuir a la unión al antígeno, y debido a que los aminoácidos de los bucles de CDR pueden influir en la asociación de los dos dominios de Ig variables. Para mantener la afinidad del anticuerpo monoclonal humanizado, la técnica de injerto de CDR puede mejorarse eligiendo regiones de entramado humanas que se asemejan más estrechamente a las regiones de entramado del anticuerpo de ratón original, y mediante mutagénesis dirigida al sitio de aminoácidos individuales dentro del entramado o las CDR ayudada mediante modelado informático del sitio de unión a antígeno (por ejemplo, Co, M. S., *et al.* (1994), J. Immunol 152, 2968-2976).

55 Un método de humanización de anticuerpos comprende alinear las secuencias de cadena pesada y ligera no humanas con secuencias de cadena pesada y ligera humanas, seleccionar y sustituir el entramado no humano por un entramado humano basándose en tal alineación, modelar de manera molecular para predecir la conformación de la secuencia humanizada y comparar con la conformación del anticuerpo original. A este procedimiento le sigue retromutación repetida de residuos en la región de CDR que altera la estructura de las CDR hasta que la

conformación predicha del modelo de secuencia humanizada se aproxima estrechamente a la conformación de las CDR no humanas del anticuerpo no humano original. Tales anticuerpos humanizados pueden derivatizarse adicionalmente para facilitar la captación y el aclaramiento, por ejemplo, por medio de receptores Ashwell (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.530.101 y 5.585.089).

5 Se han notificado varias humanizaciones de anticuerpos monoclonales de ratón mediante diseño racional (véanse, por ejemplo, el documento 2002/0091240 publicado el 11 de julio de 2002, el documento WO 92/11018 y la patente estadounidense n.º 5.693.762, la patente estadounidense n.º 5.766.866).

C. Anticuerpos Human Engineered™ (anticuerpos humanos modificados por ingeniería genética)

10 La expresión "anticuerpo Human Engineered™" se refiere a un anticuerpo derivado a partir de un anticuerpo no humano, normalmente un anticuerpo monoclonal de roedor o posiblemente un anticuerpo quimérico. El procedimiento de Human Engineering™ de dominios variables de anticuerpo se ha descrito por Studnicka (véanse, por ejemplo, Studnicka *et al.* patente estadounidense n.º 5.766.886; Studnicka *et al.* Protein Engineering, 7: 805-814 (1994)) como método para reducir la inmunogenicidad al mismo tiempo que se mantiene la actividad de unión de moléculas de anticuerpo. Según el método, a cada aminoácido de la región variable se le ha asignado un riesgo de sustitución. Las sustituciones de aminoácidos se distinguen mediante una de tres categorías de riesgo: (1) cambios de riesgo bajo son los que tienen el mayor potencial para reducir la inmunogenicidad con la menor posibilidad de alterar la unión a antígeno; (2) cambios de riesgo moderado son los que reducirán adicionalmente la inmunogenicidad, pero tienen una mayor posibilidad de afectar a la unión a antígeno o al plegamiento de la proteína; (3) residuos de riesgo alto son los que son importantes para la unión o para mantener la estructura del anticuerpo y portan el mayor riesgo de que la unión a antígeno o el plegamiento de la proteína se vean afectados. Debido al papel de la estructura tridimensional de prolina, se considera generalmente que las modificaciones en prolina son cambios de riesgo al menos moderado, incluso si la posición es normalmente una posición de riesgo bajo.

25 Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo de roedor pueden convertirse en Human Engineered™ sustituyendo aminoácidos humanos en posiciones que se determina que es poco probable que afecten de manera adversa o bien a la unión a antígeno o bien al plegamiento de la proteína, pero que es probable que reduzcan la inmunogenicidad en un entorno humano. Aunque puede usarse cualquier región variable humana, incluyendo una secuencia de VH o VL individual o una secuencia de VH o VL consenso humana o una secuencia de línea germinal humana individual o consenso, generalmente se usa una secuencia humana con la identidad u homología máxima con la secuencia de roedor para minimizar el número de sustituciones. Pueden cambiarse los residuos de aminoácido en cualquier número de las posiciones de riesgo bajo, o en todas las posiciones de riesgo bajo. Por ejemplo, en cada posición de riesgo bajo en la que los residuos de aminoácido murinos y humanos alineados difieren, se introduce una modificación de aminoácido que reemplaza el residuo de roedor por el residuo humano. Además, pueden cambiarse los residuos de aminoácido en cualquier número o todas las posiciones de riesgo moderado. En algunas realizaciones, se cambian todas las posiciones de riesgo bajo y moderado desde la secuencia de roedor hasta la humana.

30 Se construyen genes sintéticos que contienen regiones variables de cadena pesada y/o ligera modificada y se unen a regiones constantes de cadena ligera kappa y/o cadena pesada y humanas. Puede usarse cualquier región constante de cadena pesada y cadena ligera humana de cualquier clase o subclase en combinación con las regiones variables del anticuerpo Human Engineered™.

40 D. Anticuerpos a partir de animales transgénicos modificados por ingeniería genética para contener loci de inmunoglobulinas humanas

45 También pueden producirse anticuerpos frente a ferroportina usando animales transgénicos que no tienen producción de inmunoglobulinas endógenas y se modifican por ingeniería genética para contener loci de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, el documento WO 98/24893 da a conocer animales transgénicos que tienen un locus de Ig humana en el que los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de loci de cadenas pesadas y ligeras endógenas. El documento WO 91/741 también da a conocer huéspedes mamíferos no primates transgénicos que pueden montar una respuesta inmunitaria frente a un inmunógeno, en los que los anticuerpos tienen regiones variables y/o constantes de primate, y en los que los loci que codifican para inmunoglobulinas endógenas se sustituyen o se inactivan. El documento WO 96/30498 da a conocer el uso del sistema Cre/Lox para modificar el locus de inmunoglobulina en un mamífero, tal como para reemplazar toda o una porción de la región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificada. El documento WO 94/02602 da a conocer huéspedes mamíferos no humanos que tienen loci de Ig endógenas inactivados y loci de Ig humana funcionales. La patente estadounidense n.º 5.939.598 da a conocer métodos de preparación de ratones transgénicos en los que los ratones carecen de cadenas pesadas endógenas y expresan un locus de inmunoglobulina exógena que comprende una o más regiones constantes xenogénicas.

55 Usando un animal transgénico descrito anteriormente, puede producirse una respuesta inmunitaria frente a una molécula antigénica seleccionada, y pueden retirarse células que producen anticuerpos del animal y usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales derivados de ser humano. En la técnica se conocen protocolos de inmunización, adyuvantes, y similares, y se usan en la inmunización de, por ejemplo, un ratón

transgénico tal como se describe en el documento WO 96/33735. Los anticuerpos monoclonales pueden someterse a prueba para determinar su capacidad para inhibir o neutralizar la actividad biológica o el efecto fisiológico de la proteína correspondiente.

5 Véanse también Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); y la patente estadounidense n.º 5.591.669, la patente estadounidense n.º 5.589.369, la patente estadounidense n.º 5.545.807; y la solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0199213. La solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0092125 describe métodos para influir en la respuesta inmunitaria de un animal frente al epítipo deseado. También pueden generarse anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vitro* (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.567.610 y 5.229.275).

10 E. Producción de anticuerpo mediante técnicas de presentación en fago

El desarrollo de tecnologías para preparar repertorios de genes de anticuerpos humanos recombinantes y la presentación de los fragmentos de anticuerpos codificados sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos ha proporcionado otro medio para generar anticuerpos derivados de ser humano. La presentación en fago se describe en, por ejemplo, Dower *et al.*, el documento WO 91/17271, McCafferty *et al.*, el documento WO 92/01047 y Caton y Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87:6450-6454 (1990). Los anticuerpos producidos mediante tecnología de fagos se producen habitualmente como fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo fragmentos Fv o Fab, en bacterias y por tanto carecen de funciones efectoras. Pueden introducirse funciones efectoras mediante una de dos estrategias: Los fragmentos pueden modificarse por ingeniería genética o bien para dar anticuerpos completos para su expresión en células de mamífero, o bien para dar fragmentos de anticuerpos biespecíficos con un segundo sitio de unión que puede desencadenar una función efectora.

Normalmente, el fragmento Fd (V_H-C_{H1}) y la cadena ligera (V_L-C_L) de anticuerpos se clonan por separado mediante PCR y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de presentación en fago combinatorias, que entonces pueden seleccionarse para la unión a un antígeno particular. Los fragmentos de anticuerpos se expresan sobre la superficie del fago, y se logra la selección de Fv o Fab (y por tanto del fago que contiene el ADN que codifica para el fragmento de anticuerpo) mediante la unión a antígeno a través de varias tandas de unión a antígeno y reamplificación, un procedimiento denominado cribado. Los fragmentos de anticuerpos específicos para el antígeno se enriquecen y finalmente se aíslan.

También pueden usarse técnicas de presentación en fago en un enfoque para la humanización de anticuerpos monoclonales de roedor, denominado "selección guiada" (véase Jaspers, L. S., *et al.*, Bio/Technology 12, 899-903 (1994)). Para esto, el fragmento Fd del anticuerpo monoclonal de ratón puede presentarse en combinación con una biblioteca de cadenas ligeras humanas, y la biblioteca de Fab híbrida resultante puede seleccionarse entonces con antígeno. El fragmento Fd de ratón proporciona de este modo un molde para guiar la selección. Posteriormente, se combinan las cadenas ligeras humanas seleccionadas con una biblioteca de fragmentos Fd humanos. La selección de la biblioteca resultante produce Fab completamente humano.

35 Se ha descrito una variedad de procedimientos para derivar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de presentación en fago (véanse, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol, 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); las patentes estadounidenses n.ºs 5.565.332 y 5.573.905; Clackson, T., y Wells, J. A., TIBTECH, 12, 173-184 (1994)). En particular, la selección y evolución *in vitro* de anticuerpos derivados de bibliotecas de presentación en fago se ha convertido en una herramienta potente (véanse Burton, D. R., y Barbas III, C. F., Adv. Immunol, 57, 191-280 (1994); y Winter, G., *et al.*, Annu. Rev. Immunol, 12, 433-455 (1994); la solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0004215 y el documento WO92/01047; la solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0190317 publicada el 9 de octubre de 2003 y la patente estadounidense n.º 6.054.287; la patente estadounidense n.º 5.877.293.

45 Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift", Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols, 178: 187-193, y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0044772 publicada el 6 de marzo de 2003 describen métodos para examinar bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos u otras moléculas de unión mediante levantamiento de captura (*capture lift*), un método que implica la inmovilización de las moléculas de unión candidatas sobre un soporte sólido.

F. Fragmentos de anticuerpos

50 Tal como se indicó anteriormente, los fragmentos de anticuerpos comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa intacto, preferiblemente una región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto, e incluye anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, anticuerpo de dominio (dAc), fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos recombinantes quelantes, tricuerpos o bicuerpos, intracuerpos, nanocuerpos, agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), una proteína de fusión de dominio de unión a antígeno-inmunoglobulina, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene VHH o muteínas o derivados de las mismas,

y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido, tal como una secuencia de CDR, siempre que el anticuerpo conserve la actividad biológica deseada. Tales fragmentos de antígeno pueden producirse mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizarse *de novo* usando tecnologías de ADN recombinante o síntesis de péptidos.

5 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H V_L). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:6444-6448 (1993).

15 Fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido, y comprendiendo opcionalmente un ligador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que Fv forme la estructura deseada para la unión a antígeno (Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988, y Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883, 1988). Un fragmento Fd consiste en los dominios V_H y C_{H1}.

Los fragmentos de anticuerpos adicionales incluyen un fragmento de anticuerpo de domino (dAc) (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989) que consiste en un dominio V_H.

20 "Anticuerpos lineales" comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos (Zapata *et al.*, Protein Eng., 8:1057-62 (1995)).

Un "minicuerpo" que consiste en scFv fusionado a CH3 por medio de un ligador de péptido (sin bisagra) o por medio de una bisagra de IgG se ha descrito en Olafsen, *et al.*, Protein Eng. Des. Sel., abril de 2004; 17(4):315-23.

25 El término "maxicuerpo" se refiere a scFv bivalentes unidos covalentemente a la región Fc de una inmunoglobulina, véanse, por ejemplo, Fredericks *et al.*, Protein Engineering, Design & Selection, 17:95-106 (2004) y Powers *et al.*, Journal of Immunological Methods, 251:123-135 (2001).

30 Los anticuerpos de cadena pesada funcionales que carecen de cadenas ligeras se producen de manera natural en determinadas especies de animales, tales como tiburones nodriza, oreotolóbidos y *Camelidae*, tales como camellos, dromedarios, alpacas y llamas. El sitio de unión a antígeno se reduce a un único dominio, el dominio V_{H_H}, en estos animales. Estos anticuerpos forman regiones de unión a antígeno que usan sólo la región variable de cadena pesada, es decir, estos anticuerpos funcionales son homodímeros de cadenas pesadas que tienen sólo la estructura H₂L₂ (denominados "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAC"). V_{H_H} camelizada se recombina según se indica con regiones constantes de IgG2 e IgG3 que contienen la bisagra, los dominios CH2 y CH3 y carecen del dominio CH1. Los fragmentos de sólo V_H clásicos son difíciles de producir en forma soluble, pero pueden obtenerse mejoras en la solubilidad y la unión específica cuando los residuos de entramado se alteran para que sean más similares a V_{H_H} (véase, por ejemplo, Reichman, *et al.*, J. Immunol. Methods, 1999, 231:25-38). Se ha encontrado que los dominios V_{H_H} camelizados se unen al antígeno con alta afinidad (Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001) y presentan alta estabilidad en disolución (Ewert *et al.*, Biochemistry 41:3628-36, 2002). Se describen métodos para generar anticuerpos que tienen cadenas pesadas camelizadas en, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.ºs 2005/0136049 y 2005/0037421. Pueden prepararse armazones alternativos a partir de dominios similares a variables humanas que coinciden más estrechamente con el armazón de V-NAR de tiburón y pueden proporcionar un entramado para una estructura de bucle de penetración larga.

45 Debido a que el dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada es el fragmento de unión a antígeno completamente funcional más pequeño con una masa molecular de sólo 15 kDa, esta entidad se denomina nanocuerpo (Cortez-Retamozo *et al.*, Cancer Research 64:2853-57, 2004). Puede generarse una biblioteca de nanocuerpos a partir de un dromedario inmunizado tal como se describe en Conrath *et al.*, (Antimicrob Agents Chemother, 45: 2807-12, 2001).

50 Los intracuerpos son anticuerpos de cadena sencilla que demuestran expresión intracelular y pueden manipular la función de proteínas intracelulares (Biocca, *et al.*, EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 101:17616-21, 2004). Los intracuerpos, que comprenden secuencias señal celulares que conservan el constructo del anticuerpo en regiones intracelulares, pueden producirse tal como se describe en Mhashilkar *et al.* (EMBO J 14:1542-51, 1995) y Wheeler *et al.* (FASEB J. 17:1733-5, 2003). Los transcuerpos son anticuerpos permeables en células en los que un dominio de transducción de proteínas (PTD) está fusionado con anticuerpos de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) Heng *et al.*, (Med Hypotheses., 64:1105-8, 2005).

55 Se contemplan adicionalmente anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina específicas para la proteína diana. Estos constructos son polipéptidos de cadena sencilla que comprenden dominios de unión a antígeno fusionados a dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo funciones efectoras de anticuerpos. Véanse por ejemplo, el documento WO03/041600, la publicación de patente

estadounidense n.º 2003/0133939 y la publicación de patente estadounidense n.º 2003/0118592.

G. Anticuerpos multivalentes

En algunas realizaciones, puede ser deseable generar un anticuerpo monoclonal multivalente o incluso uno multiespecífico (por ejemplo biespecífico, triespecífico, etc.). Tal anticuerpo puede tener especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes del antígeno diana, o alternativamente puede unirse a dos moléculas diferentes, por ejemplo al antígeno diana y a una proteína o un receptor de superficie celular. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico puede incluir un brazo que se une a la diana y otro brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para concentrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa la diana. Como otro ejemplo, pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan antígenos diana. Estos anticuerpos presentan un brazo de unión a la diana y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-60, alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Pueden prepararse anticuerpos multiespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Adicionalmente, los anticuerpos anti-ferroportina dados a conocer en el presente documento también pueden construirse para que se plieguen en formas multivalentes, que pueden mejorar la afinidad de unión, especificidad y/o aumentar la semivida en sangre. Pueden prepararse formas multivalentes de anticuerpos anti-ferroportina mediante técnicas conocidas en la técnica.

Los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. En la técnica se conocen agentes de reticulación adecuados, y se dan a conocer en la patente estadounidense n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación. Otro método está diseñado para preparar tetrámeros añadiendo una secuencia codificante de estreptavidina en el extremo C-terminal del scFv. La estreptavidina está compuesta por cuatro subunidades, de modo que cuando el scFv-estreptavidina se pliega, se asocian cuatro subunidades para formar un tetrámero (Kipriyanov *et al.*, Hum Antibodies Hybridomas 6(3): 93-101 (1995)).

Según otro enfoque para preparar anticuerpos biespecíficos, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo de células recombinantes. Una superficie de contacto comprende al menos una parte del dominio C_{H3} de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros. Véase el documento WO 96/27011 publicado el 6 de septiembre de 1996.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos o triespecíficos usando unión química. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden de manera proteolítica anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de complejación de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditiolos vecinos e impedir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se convierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas. Better *et al.*, Science 240: 1041-1043 (1988) dan a conocer la secreción de fragmentos de anticuerpos funcionales a partir de bacterias (véanse, por ejemplo, Better *et al.*, Skerra *et al.*, Science 240: 1038-1041 (1988)). Por ejemplo, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992); Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)).

Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado podía unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina, por ejemplo GCN4 (véase generalmente Kostelny *et al.*, J.

5 Immunol 148(5):1547-1553 (1992).) Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Se redujeron los homodímeros de anticuerpos en la región bisagra para formar monómeros y entonces volvieron a oxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos.

Los diacuerpos, descritos anteriormente, son un ejemplo de un anticuerpo biespecífico. Véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:6444-6448 (1993). Pueden estabilizarse diacuerpos bivalentes mediante unión de disulfuros.

10 También pueden generarse tetrámeros de Fv mono-específicos o biespecíficos estables mediante asociación no covalente en configuración (scFv₂)₂ o como bis-tetracuerpos. Alternativamente, dos scFv diferentes pueden unirse en tándem para formar un bis-scFv.

15 También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol 152: 5368 (1994). Un enfoque ha sido unir dos anticuerpos scFv con ligadores o enlaces disulfuro (Mallender y Voss, J. Biol. Chem., 269:199-2061994, documento WO 94/13806 y patente estadounidense n.º 5.989.830).

Alternativamente, el anticuerpo biespecífico puede ser un "anticuerpo lineal" producido tal como se describe en Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

20 También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos (Tutt *et al.*, J. Immunol 147:60 (1991)).

Un "anticuerpo recombinante quelante" es un anticuerpo biespecífico que reconoce epítomos adyacentes y no solapantes del antígeno diana, y es suficientemente flexible como para unirse a ambos epítomos simultáneamente (Neri *et al.*, J Mol Biol. 246:367-73, 1995).

25 La producción de Fab-scFv biespecífico ("bicuerpo") y Fab-(scFv)₂ triespecífico ("tricuerpo") se describe en Schoonjans *et al.* (J Immunol. 165:7050-57, 2000) y Willems *et al.* (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786: 161-76, 2003). Para bicuerpos o tricuerpos, se fusiona una molécula de scFv con una o ambas de las cadenas VL-CL (L) y VH-CH₁ (Fd), por ejemplo, para producir un tricuerpo, se fusionan dos scFv al extremo C-terminal de Fab mientras que en un bicuerpo se fusiona un scFv al extremo C-terminal de Fab.

30 Aún en otro método, se producen dímeros, trímeros y tetrámeros tras introducir una cisteína libre en la proteína original. Se usó un agente de reticulación basado en péptido con números variables (de dos a cuatro) de grupos maleimida para reticular la proteína de interés con las cisteínas libres (Cochran *et al.*, Immunity 12(3): 241-50 (2000)).

II. Agentes de unión específica

35 Pueden prepararse otros agentes de unión específica a ferroportina, por ejemplo, basándose en CDR de un anticuerpo o examinando bibliotecas de diversos péptidos o compuestos químicos orgánicos para péptidos o compuestos que presentan las propiedades de unión deseadas para ferroportina humana. Agentes de unión específica a ferroportina incluyen péptidos que contienen secuencias de aminoácidos que son al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 40 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o más idénticas a una o más CDR de anticuerpo humano 31A5 (SEQ ID NO: 5-10), anticuerpo humano 37A2 (SEQ ID NO: 29-34), anticuerpo humano 37B9 (SEQ ID NO: 39-44), anticuerpo humano 37C8 (SEQ ID NO: 49-54) anticuerpo humano 37G8 (SEQ ID NO: 59-64), anticuerpo humano 38A4 (SEQ ID NO: 69-74), anticuerpo humano 38C8 (SEQ ID NO: 79-84), anticuerpo humano 38D2 (SEQ ID NO: 89-94), anticuerpo humano 38E3 (SEQ ID NO: 99-104) o anticuerpo humano 38G6 (SEQ ID NO: 109-114).

45 Los agentes de unión específica a ferroportina también incluyen pepticuerpos. El término "pepticuerpo" se refiere a una molécula que comprende un dominio Fc de anticuerpo unido a al menos un péptido. La producción de pepticuerpos se describe de manera general en la publicación PCT WO 00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000. Cualquiera de estos péptidos puede estar unido en tándem (es decir, secuencialmente), con o sin ligadores. Pueden reticularse péptidos que contienen un residuo cisteínico con otro péptido que contiene Cys, cualquiera o ambos de los cuales puede estar unido a un vehículo. Cualquier péptido que tenga más de un residuo de Cys puede formar un enlace disulfuro intrapeptídico, además. Cualquiera de estos péptidos puede derivatizarse, por ejemplo, el extremo carboxilo terminal puede ocuparse con un grupo amino, las cisteínas pueden ocuparse o pueden sustituirse residuos de aminoácido mediante restos distintos de residuos de aminoácido (véase, por ejemplo, Bhatnagar *et al.*, J. Med. Chem., 39: 3814-9 (1996) y Cuthbertson *et al.*, J. Med. Chem., 40: 2876-82 (1997)). Las secuencias de péptidos pueden optimizarse, de manera análoga a la maduración por afinidad para anticuerpos, o alterarse de otra manera mediante mutagénesis de barrido de alanina o aleatoria o dirigida seguida por examen para identificar los mejores compuestos de unión. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 26: 401-24 (1997). Pueden insertarse diversas

moléculas en la estructura de agentes de unión específica, por ejemplo, dentro de la propia porción de péptido o entre las porciones de péptido y vehículo de los agentes de unión específica, al mismo tiempo que se conserva la actividad deseada del agente de unión específica. Pueden insertarse fácilmente, por ejemplo, moléculas tales como un dominio Fc o fragmento del mismo, polietilenglicol u otras moléculas relacionadas tales como dextrano, un ácido graso, un lípido, un grupo colesterol, un hidrato de carbono pequeño, un péptido, un resto detectable tal como se describe en el presente documento (incluyendo agentes fluorescentes, radiomarcadores tales como radioisótopos), un oligosacárido, oligonucleótido, un polinucleótido, ARN de interferencia (u otro), enzimas, hormonas, o similares. Los expertos en la técnica apreciarán otras moléculas adecuadas para su inserción de este modo y se abarcan dentro del alcance de la invención. Esto incluye la inserción de, por ejemplo, una molécula deseada entre dos aminoácidos consecutivos, opcionalmente unidos mediante un ligador adecuado.

También se contempla el desarrollo de peptidocuerpos frente a ferroportina. La interacción de un ligando de proteína con su receptor a menudo tiene lugar en una superficie de contacto relativamente grande. Sin embargo, tal como se demostró para la hormona de crecimiento humana y su receptor, sólo unos pocos residuos clave en la superficie de contacto contribuyen a la mayoría de la energía de unión. Clackson *et al.*, Science 267: 383-6 (1995). La masa del ligando de proteína simplemente presenta los epítopos de unión en la topología correcta o aporta funciones no relacionadas con la unión. Por tanto, pueden usarse moléculas de sólo la longitud del "péptido" (generalmente de 2 a 40 aminoácidos) a la proteína receptora de un ligando de proteína grande dado. Tales péptidos pueden imitar la bioactividad del ligando de proteína grande ("agonistas de péptido") o, a través de unión competitiva, inhibir la bioactividad del ligando de proteína grande ("antagonistas de péptido").

La tecnología de presentación en fago ha surgido como un método potente de identificación de tales agonistas y antagonistas de péptido. Véanse, por ejemplo, Scott *et al.* Science, 249: 386 (1990); Devlin *et al.*, Science 249: 404 (1990); la patente estadounidense n.º 5.223.409, expedida el 29 de junio de 1993; la patente estadounidense n.º 5.733.731, expedida el 31 de marzo de 1998; la patente estadounidense n.º 5.498.530, expedida el 12 de marzo de 1996; la patente estadounidense n.º 5.432.018, expedida el 11 de julio de 1995; la patente estadounidense n.º 5.338.665, expedida el 16 de agosto de 1994; la patente estadounidense n.º 5.922.545, expedida el 13 de julio de 1999; el documento WO 96/40987, publicado el 19 de diciembre de 1996; y el documento WO 98/15833, publicado el 16 de abril de 1998. En bibliotecas de presentación en fago de péptidos, pueden presentarse secuencias de péptidos al azar mediante fusión con proteínas de la cubierta del fago filamentoso. Los péptidos presentados pueden eluirse por afinidad frente a un dominio extracelular inmovilizado por anticuerpo de un receptor, si se desea. El fago retenido puede enriquecerse mediante tandas sucesivas de purificación por afinidad y repropagación. Los mejores péptidos de unión pueden secuenciarse para identificar residuos clave dentro de una o más familias de péptidos relacionadas estructuralmente. Véase, por ejemplo, Cwirla *et al.*, Science 276: 1696-9 (1997), en donde se identificaron dos familias distintas. Las secuencias de péptido también pueden sugerir qué residuos pueden reemplazarse de manera segura mediante barrido de alanina o mediante mutagénesis al nivel del ADN. Pueden crearse bibliotecas de mutagénesis y examinarse para optimizar adicionalmente la secuencia de los mejores compuestos de unión. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 26: 401-24 (1997).

También puede usarse el análisis estructural de la interacción proteína-proteína para sugerir péptidos que imitan la actividad de unión de ligandos de proteína grandes. En un análisis de este tipo, la estructura cristalina puede sugerir la identidad y la orientación relativa de residuos críticos del ligando de proteína grande, a partir de los cuales puede diseñarse un péptido. Véase, por ejemplo, Takasaki *et al.*, Nature Biotech 15: 1266-70 (1997). Estos métodos analíticos también pueden usarse para investigar la interacción entre una proteína receptora y péptidos seleccionados mediante presentación en fago, lo que puede sugerir una modificación adicional de los péptidos para aumentar la afinidad de unión.

Otros métodos compiten con la presentación en fago en la investigación de péptidos. Una biblioteca de péptidos puede fusionarse con el extremo carboxilo terminal del represor lac y expresarse en *E. coli*. Otro método basado en *E. coli* permite la presentación sobre la membrana externa de la célula mediante fusión con una lipoproteína asociada a peptidoglicano (PAL). A continuación en el presente documento, éstos y métodos relacionados se denominan colectivamente "presentación en *E. coli*". En otro método, se detiene la traducción de ARN al azar antes de la liberación del ribosoma, dando como resultado una biblioteca de polipéptidos con su ARN asociado todavía unido. A continuación en el presente documento, éste y métodos relacionados se denominan colectivamente "presentación en ribosomas". Otros métodos emplean unión química de péptidos a ARN. Véase, por ejemplo, Roberts y Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-303 (1997). A continuación en el presente documento, éste y métodos relacionados se denominan colectivamente "examen de ARN-péptido". Se han desarrollado bibliotecas de péptidos derivados químicamente en las que se inmovilizan péptidos sobre materiales estables, no biológicos, tales como varillas de polietileno o resinas permeables a disolventes. Otra biblioteca de péptidos derivados químicamente usa fotolitografía para explorar péptidos inmovilizados sobre portaobjetos de vidrio. A continuación en el presente documento, éstos y métodos relacionados se denominan colectivamente "examen químico de péptidos". La exploración química de péptidos puede ser ventajosa ya que permite el uso de D-aminoácidos y otros análogos no naturales, así como elementos no peptídicos. Se revisan métodos tanto biológicos como químicos en Wells y Lowman, Curr. Opin. Biotechnol, 3: 355-62 (1992).

Otras técnicas de presentación en célula para bibliotecas de péptidos incluyen presentación en la superficie de una levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae* (Boder y Wittrup, Nat. Biotechnol. 15:553-557, 1997). Por tanto, por

ejemplo, pueden presentarse anticuerpos sobre la superficie de *S. cerevisiae* por medio de fusión al receptor de adhesión de levadura a α -aglutinina, que se ubica en la pared celular de la levadura. Este método proporciona la posibilidad de seleccionar repertorios mediante citometría de flujo. Tiñendo las células mediante antígeno marcado fluorescentemente y un reactivo de etiqueta anti-epitopo, pueden clasificarse las células de levadura según el nivel de unión a antígeno sobre la superficie celular. Las plataformas de presentación en levadura también pueden combinarse con fagos (véase, por ejemplo, Van den Beucken *et al.*, FEBS Lett. 546:288-294, 2003).

Conceptualmente, pueden descubrirse miméticos de péptido de cualquier proteína usando presentación en fago y los otros métodos mencionados anteriormente. Estos métodos se han usado para el mapeo de epítopos, para la identificación de aminoácidos críticos en interacciones proteína-proteína y como líderes para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Véase, por ejemplo, Cortese *et al.*, Curr. Opin. Biotech., 7: 616-21 (1996). Actualmente se usan bibliotecas de péptidos lo más a menudo en estudios inmunológicos, tales como mapeo de epítopos. Véase Kreeger, The Scientist, 10(13): 19-20(1996).

Las fuentes de compuestos que pueden examinarse para determinar su capacidad para unirse a o modular (es decir, aumentar o disminuir) la actividad de ferroporfina incluyen (1) bibliotecas químicas inorgánicas y orgánicas, (2) bibliotecas de productos naturales y (3) bibliotecas combinatorias compuestas por péptidos o bien al azar o miméticos, oligonucleótidos o bien moléculas orgánicas.

Pueden sintetizarse fácilmente bibliotecas químicas u obtenerse a partir de varias fuentes comerciales, y pueden incluir análogos estructurales de compuestos conocidos o compuestos que se identifican como "coincidencias" o "líderes" por medio de examen de productos naturales.

Las fuentes de bibliotecas de productos naturales son microorganismos (incluyendo bacterias y hongos), animales, plantas u otra vegetación, u organismos marinos y pueden crearse bibliotecas de mezclas para examinar mediante: (1) fermentación y extracción de caldos a partir de microorganismos del suelo, de plantas o marinos o (2) extracción de los propios organismos. Las bibliotecas de productos naturales incluyen policétidos, péptidos no ribosómicos y variantes (que no se producen de forma natural) de los mismos. Para una revisión, véase Science 282:63-68 (1998).

Las bibliotecas combinatorias se componen de grandes números de péptidos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos y pueden prepararse fácilmente mediante métodos de síntesis automatizada tradicionales, PCR, clonación o métodos sintéticos patentados. De particular interés son bibliotecas combinatorias de péptidos y oligonucleótidos. Todavía otras bibliotecas de interés incluyen bibliotecas de péptidos, proteínas, peptidomiméticos, de colección sintética multiparalela, recombinatorias y de polipéptidos. Para una revisión de química combinatoria y bibliotecas creadas a partir de la misma, véase Myers, Curr. Opin. Biotechnol. 8:701-707 (1997). Para revisiones y ejemplos de bibliotecas de peptidomiméticos, véase Al-Obeidi *et al.*, Mol. Biotechnol., 9(3):205-23 (1998); Hruby *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., 1(1):114-19 (1997); Dorner *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 4(5):709-15 (1996) (dipéptidos alquilados).

Los agentes de unión específica a ferroporfina también incluyen proteínas de armazón, tal como se describen en Hays *et al.* Trends In Biotechnology, 23(10):514-522 (2005), y tecnología de proteínas de Avimer, tal como se describe en las publicaciones estadounidenses n.ºs 2006-0286603 y 2006-0223114.

III. Producción de variantes y derivados de anticuerpo

Los anticuerpos anti-ferroporfina de la invención pueden modificarse fácilmente mediante técnicas bien conocidas por un experto habitual en la técnica. Las posibles mutaciones incluyen inserción, delección o sustitución de uno o más residuos. Las inserciones o delecciones están preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos, más preferiblemente de 1 a 3 aminoácidos y lo más preferiblemente 1 ó 2 aminoácidos.

Variantes de delección son polipéptidos en los que se elimina al menos un residuo de aminoácido de cualquier secuencia de aminoácidos. Pueden efectuarse delecciones en uno o ambos extremos terminales de la proteína, o con eliminación de uno o más residuos dentro de (es decir, internos a) el polipéptido. Los métodos para la preparación de variantes de delección son de rutina en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que oscilan en longitud entre un residuo y polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como inserciones de secuencias internas de uno o más aminoácidos. Como con cualquiera de los diferentes tipos de variantes descritos en el presente documento, pueden diseñarse variantes de inserción de manera que el polipéptido resultante conserve las mismas propiedades biológicas o presente una nueva propiedad física, química y/o biológica no asociada con el polipéptido original del que se derivó. Los métodos para la preparación de variantes de inserción también son de rutina y se conocen bien en la técnica (Sambrook *et al.*, citado anteriormente).

Proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo (o una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las CDR del anticuerpo dado a conocer en el presente documento) y un polipéptido heterólogo, son un tipo específico de variante de inserción contemplado por la invención. Los ejemplos no limitativos de polipéptidos heterólogos que pueden fusionarse con polipéptidos de interés incluyen proteínas con semivida en circulación larga, tales como, pero sin limitarse a, regiones constantes de inmunoglobulina (por ejemplo, región Fc); secuencias marcadoras que permiten

la identificación del polipéptido de interés; secuencias que facilitan la purificación del polipéptido de interés; y secuencias que promueven la formación de proteínas multiméricas.

En la técnica se conocen bien métodos de preparación de proteínas de fusión de anticuerpos. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.306.393. En determinadas realizaciones, se producen proteínas de fusión que pueden incluir un ligador flexible, que conecta el anticuerpo scFv quimérico al resto de proteína heteróloga. Secuencias de ligador apropiadas son las que no afectan a la capacidad de la proteína de fusión resultante de ser reconocida y unirse específicamente al epítipo unido por el dominio V de la proteína (véase, por ejemplo, el documento WO 98/25965).

Variantes de sustitución son aquellas en las que se elimina al menos un residuo en la secuencia de aminoácidos del polipéptido y se inserta un residuo diferente en su lugar. Las modificaciones en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura principal de polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) la masa de la cadena lateral. En determinados aspectos de la divulgación, se diseñan variantes de sustitución, es decir, se sustituyen uno o más residuos de aminoácido específicos (al contrario que al azar) por un residuo de aminoácido específico. Los cambios típicos de estos tipos incluyen sustituciones conservativas y/o sustitución de un residuo por otro basándose en propiedades similares de los residuos nativo y de sustitución.

En la tabla 1 se muestran sustituciones conservativas. La sustitución más conservativa se encuentra bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones no dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales y examinarse los productos.

TABLA 1

Original	A modo de ejemplo	Sustituciones de residuos preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Los residuos de aminoácido que comparten propiedades comunes de cadena lateral se agrupan a menudo de la siguiente manera.

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

A. Variantes de anticuerpo

En determinados casos, se preparan variantes de anticuerpo con la intención de modificar aquellos residuos de aminoácido que están implicados directamente en la unión a epítopos. En otras realizaciones, es deseable la

modificación de residuos que no están implicados directamente en la unión a epítomos o residuos no implicados en la unión a epítomos de ninguna manera, para fines comentados en el presente documento. Se contempla la mutagénesis dentro de cualquiera de las regiones CDR y/o regiones de entramado.

5 Para determinar qué residuos de aminoácido de anticuerpo son importantes para el reconocimiento de y la unión a epítomos, puede realizarse mutagénesis por barrido de alanina para producir variantes de sustitución. Véase, por ejemplo, Cunningham *et al.*, Science, 244:1081-1085 (1989). En este método, se reemplazan residuos de aminoácido individuales uno cada vez por un residuo de alanina y se examina el anticuerpo anti-ferroportina resultante para determinar su capacidad para unirse a su epítomo específico con relación al anticuerpo sin modificar. Se secuencian anticuerpos modificados con capacidad de unión reducida para determinar qué residuo se cambió, 10 indicando su significación en las propiedades biológicas o de unión.

Pueden prepararse variantes de sustitución de anticuerpos mediante maduración de afinidad en la que se introducen cambios de aminoácidos al azar en la secuencia de anticuerpo original. Véanse, por ejemplo, Ouwehand *et al.*, Vox Sang 74 (supl. 2):223-232, 1998; Rader *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915, 1998; Dall'Acqua *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol., 8:443-450, 1998. La maduración de afinidad implica preparar y examinar los anticuerpos anti-ferroportina, o variantes de los mismos y seleccionar de las variantes resultantes aquéllas que tienen propiedades biológicas modificadas, tales como aumento de afinidad de unión con relación al anticuerpo anti-ferroportina original. Una manera conveniente para generar variantes de sustitución es la maduración de afinidad usando presentación en fago. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes así generadas se expresan de modo monovalente en la superficie de partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fago se examinan para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Véanse por ejemplo, los documentos WO 92/01047, WO 93/112366, WO 95/15388 y WO 93/19172.

Los métodos de maduración de afinidad de anticuerpos actuales pertenecen a dos categorías de mutagénesis: estocástica y no estocástica. La PCR propensa a errores, las cepas bacterianas de gen mutador (Low *et al.*, J. Mol. Biol. 260, 359-68, 1996) y la mutagénesis de saturación (Nishimiya *et al.*, J. Biol. Chem. 275: 12813-20, 2000; Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85, 2002) son ejemplos típicos de métodos de mutagénesis estocástica (Rajpal *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 102:8466-71, 2005). Las técnicas no estocásticas usan a menudo mutagénesis por barrido de alanina o dirigida al sitio para generar colecciones limitadas de muteínas específicas. Se describen algunos métodos en detalle adicional a continuación.

Maduración de afinidad a través de métodos de cribado - La maduración de afinidad de anticuerpos recombinantes se realiza comúnmente a través de varias tandas de cribado de anticuerpos candidatos en presencia de cantidades decrecientes de antígeno. La disminución de la cantidad de antígeno por tanda selecciona los anticuerpos con la mayor afinidad por el antígeno produciendo de ese modo anticuerpos de alta afinidad a partir de una gran reunión de material de partida. La maduración de afinidad a través de cribado se conoce bien en la técnica y se describe, por ejemplo, en Huls *et al.* (Cancer Immunol Immunother. 50:163-71, 2001). Se describen métodos de maduración de afinidad que usan tecnologías de presentación en fago en otra parte en el presente documento y se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Daugherty *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 97:2029-34, 2000).

Mutagénesis de revisión - La mutagénesis de revisión (LTM, *look-through mutagenesis*) (Rajpal *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71, 2005) proporciona un método para mapear rápidamente el sitio de unión a anticuerpo. Para LTM, nueve aminoácidos, representativos de las principales químicas de cadena lateral proporcionadas por los 20 aminoácidos naturales, se seleccionan para diseccionar las contribuciones funcionales de cadena lateral a la unión en cada posición en las seis CDR de un anticuerpo. LTM genera una serie de posiciones de mutaciones únicas dentro de una CDR en la que cada residuo "silvestre" se sustituye sistemáticamente por uno de nueve aminoácidos seleccionados. Las CDR mutadas se combinan para generar bibliotecas combinatorias de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de complejidad y tamaño crecientes sin llegar a ser prohibitivas para la presentación cuantitativa de todas las muteínas. Después de la selección positiva, los clones con unión mejorada se secuencian, y se mapean mutaciones beneficiosas.

PCR propensa a errores - La PCR propensa a errores implica la aleatorización de ácidos nucleicos entre diferentes tandas de selección. La aleatorización se produce a una baja tasa por la tasa de error intrínseca de la polimerasa usada, pero puede potenciarse por PCR propensa a errores (Zaccolo *et al.*, J. Mol. Biol. 285:775-783, 1999) usando una polimerasa que tiene una alta tasa de error intrínseca durante la transcripción (Hawkins *et al.*, J Mol Biol. 226:889-96, 1992). Después de los ciclos de mutación, los clones con afinidad mejorada por el antígeno se seleccionan usando métodos rutinarios en la técnica.

También pueden usarse técnicas que utilizan intercambio de genes y evolución dirigida para preparar y examinar anticuerpos anti-ferroportina, o variantes de los mismos, para determinar la actividad deseada. Por ejemplo, Jermutus *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A., 98(1):75-80 (2001) mostraron que se combinaron estrategias adaptadas a medida de selección *in vitro* basadas en presentación en ribosoma con diversificación *in vitro* mediante intercambio de ADN para evolucionar o bien la velocidad de disociación o bien la estabilidad termodinámica de scFv; Fermer *et al.*, Tumour Biol. Enero-abril de 2004; 25(1-2):7-13 notificaron que el uso de presentación en fago en combinación

con intercambio de ADN elevó la afinidad casi en tres órdenes de magnitud. Dougherty *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 29 de febrero de 2000; 97(5):2029-2034 notificaron que (i) se producen clones funcionales a una frecuencia inesperadamente alta en bibliotecas hipermutadas, (ii) los mutantes con ganancia de función están bien representados en tales bibliotecas, y (iii) la mayoría de las mutaciones de scFv que conducen a mayor afinidad corresponden a residuos alejados del sitio de unión.

Alternativamente, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno, o usar software informático para modelar tales puntos de contacto. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan tales variantes, se someten a examen tal como se describe en el presente documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para su desarrollo adicional.

B. Anticuerpo con hidrato de carbono modificado

También pueden producirse variantes de anticuerpo que tienen un patrón de glicosilación modificado con relación al anticuerpo original, por ejemplo, añadiendo o delecionando uno o más de los restos de hidrato de carbono unidos al anticuerpo o agente de unión específica, y/o añadiendo o delecionando uno o más sitios de glicosilación en el anticuerpo o agente de unión específica.

La glicosilación de polipéptidos, incluyendo anticuerpos es normalmente o bien con unión a N o bien con unión a O. La unión a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. La presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. Por tanto, pueden añadirse sitios de glicosilación con unión a N a un anticuerpo o agente de unión específica alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de estas secuencias de tripéptido. La glicosilación con unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxisilina. Pueden añadirse sitios de glicosilación con unión a O a un anticuerpo o agente de unión específica insertando o sustituyendo uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo o agente de unión específica original.

C. Función efectora alterada

Puede(n) retirarse o introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc de un anticuerpo o polipéptido que contiene Fc, eliminando o aumentando de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. Un anticuerpo o agente de unión específica homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véanse Caron *et al.*, J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B., J. Immunol 148: 2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos o agentes de unión específica homodiméricos usando agentes de reticulación heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *et al.*, Cancer Research, 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo o agente de unión específica puede modificarse mediante ingeniería genética de modo que tenga regiones Fc duales y puede tener de ese modo capacidades de ADCC y lisis del complemento potenciadas. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

Se ha mostrado que secuencias dentro de la CDR pueden hacer que un anticuerpo se una a CMH de clase II y desencadenar una respuesta de células T auxiliares no deseada. Una sustitución conservativa puede permitir que el anticuerpo o agente de unión específica conserve la actividad de unión aunque reduce su capacidad para desencadenar una respuesta de células T no deseada. También se contempla que se retiren uno o más de los 20 aminoácidos N-terminales de la cadena pesada o ligera.

En algunos aspectos, la invención también contempla la producción de moléculas de anticuerpo con estructura de hidrato de carbono alterada que dan como resultado una actividad efectora alterada, incluyendo moléculas de anticuerpo con fucosilación ausente o reducida que presentan una actividad ADCC mejorada. Se conocen una variedad de maneras en la técnica para lograr esto. Por ejemplo, la actividad efectora ADCC está mediada por la unión de la molécula de anticuerpo al receptor FcγRIII, lo que se ha mostrado que depende de la estructura de hidrato de carbono de la glicosilación con unión a N en la Asn-297 del dominio CH2. Anticuerpos no fucosilados se unen a este receptor con aumento de afinidad y desencadenan funciones efectoras mediadas por FcγRIII más eficazmente que anticuerpos fucosilados nativos. Por ejemplo, la producción recombinante de anticuerpo no fucosilado en células CHO en las que la enzima alfa-1,6-fucosil transferasa se ha desactivado da como resultado un anticuerpo con un aumento de 100 veces de la actividad ADCC (Yamane-Ohnuki *et al.*, Biotechnol Bioeng. 5 de septiembre de 2004; 87(5):614-22). Pueden obtenerse efectos similares a través de la disminución de la actividad de esta u otras enzimas en la ruta de fucosilación, por ejemplo, a través de tratamiento con ARN antisentido o ARNiip, modificando mediante ingeniería genética líneas celulares para desactivar la(s) enzima(s) o cultivando con inhibidores de la glicosilación selectivos (Rothman *et al.*, Mol Immunol. Diciembre de 1989; 26(12):1113-23). Algunas cepas de células huésped, por ejemplo la línea celular YB2/0 de hibridoma de rata o Lec13 producen de manera

natural anticuerpos con menores niveles de fucosilación. Shields *et al.*, J Biol Chem. 26 julio de 2002; 277(30):26733-40; Shinkawa *et al.*, J Biol Chem. 31 enero de 2003; 278(5):3466-73. También se ha determinado que un aumento en el nivel de hidrato de carbono bisecado, por ejemplo a través de la producción de manera recombinante de anticuerpo en células que sobreexpresan la enzima GnTIII, aumenta la actividad ADCC. Umana *et al.*, Nat Biotechnol. Febrero de 1999; 17(2): 176-80. Se ha predicho que la ausencia de sólo uno de los dos residuos de fucosa puede ser suficiente para aumentar la actividad ADCC. (Ferrara *et al.*, J Biol Chem. 5 de diciembre de 2005).

D. Otras modificaciones covalentes

Las modificaciones covalentes de un anticuerpo también se incluyen dentro del alcance de esta invención. Pueden realizarse mediante síntesis química o mediante escisión enzimática o química del polipéptido o anticuerpo, si es aplicable. Pueden introducirse otros tipos de modificaciones covalentes haciendo reaccionar residuos de aminoácido seleccionados como diana con un agente de derivatización orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales.

Lo más comúnmente se hacen reaccionar residuos cisteinilo con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también se derivatizan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo- β -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-piridildisulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Se derivatizan residuos histidilo mediante reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. En algunos aspectos, también es útil bromuro de para-bromofenacilo; y se realiza la reacción en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Se hacen reaccionar residuos lisinilo y amino-terminales con anhídridos de ácido succínico u otro ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y la reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Se modifican residuos arginilo mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos arginina requiere que se realice la reacción en condiciones alcalinas debido al alto pK_a del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo épsilon-amino de arginina.

La modificación específica de residuos tirosilo puede realizarse con particular interés en la introducción de marcadores espectrales en residuos tirosilo mediante reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Lo más comúnmente, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil-tirosilo y 3-nitroderivados, respectivamente. Se yodan residuos tirosilo usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo.

Se modifican selectivamente grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) mediante reacción con carbodiimidias (R-N.dbd.C.dbd.N-R'), en las que R y R' son diferentes grupos alquilo, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, se convierten residuos aspartilo y glutamilo en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

Frecuentemente se desamidán residuos glutaminilo y asparaginilo para dar los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Estos residuos se desamidán en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos se encuentra dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos alfa-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar química o enzimáticamente glicósidos al anticuerpo o agente de unión específica. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del polipéptido o anticuerpo en una célula huésped que tiene capacidades de glicosilación para la glicosilación con unión a N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el/los azúcar(es) puede(n) unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

La retirada de cualquier resto de hidrato de carbono presente en el anticuerpo o agente de unión específica puede lograrse química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo o agente de

unión específica al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayor parte de o todos los azúcares excepto el azúcar ligador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que deja intacto el anticuerpo o agente de unión específica. La desglicosilación química se describe por Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y por Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en un anticuerpo o agente de unión específica puede obtenerse mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas tal como se describe por Thotakura *et al.*, Met. Enzymol., 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de un anticuerpo o agente de unión específica dado a conocer en el presente documento comprende ligar el anticuerpo o agente de unión específica a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioles polioxietilados, sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado, polioxialquilenos o polímeros de polisacárido tales como dextrano. Tales métodos se conocen en la técnica, véanse, por ejemplo las patentes estadounidenses n.ºs 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192, 4.179.337, 4.766.106, 4.179.337, 4.495.285, 4.609.546 o el documento EP 315 456.

IV. Métodos de selección para anticuerpos o agentes de unión específica

También se proporcionan métodos de identificación de anticuerpos que se unen a ferroportina, que bloquean de manera cruzada anticuerpos a modo de ejemplo en el presente documento y/o que inhiben la actividad de ferroportina.

Pueden examinarse anticuerpos para determinar su afinidad de unión mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de desplazamiento en gel, inmunotransferencias de tipo Western, ensayos de competición radiomarcados, cofraccionamiento mediante cromatografía, coprecipitación, reticulación, ELISA, y similares, que se describen en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY.

Para seleccionar inicialmente anticuerpos que se unen al epítipo deseado sobre el antígeno diana, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. Harlow and David Lane (1988) y Harlow, Edward y David Lane. Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. También pueden usarse ensayos de unión competitiva rutinarios, en los que se caracteriza el anticuerpo desconocido por su capacidad para inhibir la unión de la diana a un anticuerpo específico de diana de la invención. Pueden usarse antígeno intacto, fragmentos del mismo tal como el dominio extracelular o epítopos lineales. Se describe el mapeo de epítopos en Champe *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 1388-1394 (1995).

En una variación de un ensayo de unión *in vitro*, se proporciona un método que comprende (a) poner en contacto una ferroportina inmovilizada con un anticuerpo candidato y (b) detectar la unión del anticuerpo candidato a la ferroportina. En una realización alternativa, el anticuerpo candidato se inmoviliza y se detecta la unión de ferroportina. Se logra la inmovilización usando cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo unión covalente a un soporte, una perla o una resina cromatográfica, así como interacción no covalente, de alta afinidad tal como unión de anticuerpo, o el uso de unión de estreptavidina/biotina en la que el compuesto inmovilizado incluye un resto de biotina. La detección de la unión puede lograrse (i) usando un marcador radiactivo en el compuesto que no está inmovilizado, (ii) usando un marcador fluorescente en el compuesto no inmovilizado, (iii) usando un anticuerpo inmunoespecífico para el compuesto no inmovilizado, (iv) usando un marcador en el compuesto no inmovilizado que excita un soporte fluorescente al que está unido el compuesto inmovilizado, así como otras técnicas bien conocidas y puestas en práctica de manera rutinaria en la técnica.

Pueden identificarse anticuerpos que inhiben o neutralizan la actividad de ferroportina humana poniendo en contacto ferroportina con un anticuerpo, comparando la actividad de ferroportina en presencia y ausencia del anticuerpo de prueba y determinando si la presencia del anticuerpo disminuye la actividad de la ferroportina. La actividad biológica de un anticuerpo particular, o combinación de anticuerpos, puede evaluarse *in vivo* usando un modelo animal adecuado, incluyendo cualquiera de los descritos en el presente documento.

En aspectos a modo de ejemplo, la descripción incluye ensayos de selección de alto rendimiento (HTS) para identificar anticuerpos que interaccionan con o inhiben la actividad biológica (es decir, inhiben la fosforilación, dimerización, activación de receptor inducida por ligando o señalización intracelular, etc.) del antígeno diana. Los ensayos de HTS permiten la selección de grandes números de compuestos de una manera eficaz. Se contemplan sistemas de HTS basados en células para investigar la interacción entre el antígeno diana y sus parejas de unión. Se diseñan ensayos de HTS para identificar "aciertos" o "compuestos de partida" que tienen la propiedad deseada, a partir de los cuales pueden diseñarse modificaciones para mejorar la propiedad deseada.

En otro aspecto de la descripción, se emplea selección de alto rendimiento para fragmentos de anticuerpo o CDR con 1, 2, 3 o más modificaciones en aminoácidos dentro de las CDR que tienen afinidad de unión adecuada por un polipéptido de antígeno diana.

V. Detección de Ferroportina

También se proporcionan métodos para detectar ferroportina. Para determinar la presencia o ausencia de ferroportina en una muestra, se pone en contacto una muestra biológica de un paciente con uno o más de los anticuerpos anti-ferroportina dados a conocer en el presente documento en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que se formen inmunocomplejos. Entonces se detectan los inmunocomplejos formados entre un anticuerpo anti-ferroportina y ferroportina en la muestra biológica. Se cuantifica la cantidad de ferroportina en la muestra midiendo la cantidad del inmunocomplejo formado entre el anticuerpo y ferroportina.

Pueden usarse diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a: sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o de radioisótopos, por ejemplo), análisis de inmunotransferencia de tipo Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, se detecta la unión al anticuerpo mediante la detección de un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, se detecta el anticuerpo primario mediante la detección de la unión de un reactivo o anticuerpo secundario al anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y están dentro del alcance de la presente invención. Antibodies: A Laboratory Manual (1988) por Harlow & Lane o y Harlow, Edward, y David Lane. Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, o ediciones más recientes; Immunoassays: A Practical Approach, Oxford University Press, Gosling, J. P. (ed.) (2001) o ediciones más recientes; y/o Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*), que se actualiza regularmente. Ejemplos de tales ensayos implican habitualmente unir el anticuerpo a una superficie o matriz, añadir una muestra biológica del paciente que se espera que contenga ferroportina tal como se describió anteriormente y permitir que pase tiempo para que se forme un complejo; procedimientos de lavado adecuados para retirar el complejo no unido, seguidos por o bien la adición de un segundo anticuerpo para permitir la detección del complejo (un ELISA de tipo sándwich) o bien una versión detectable de ferroportina para detectar sitios de unión a ferroportina libres en la superficie del anticuerpo (un ELISA competitivo).

Dentro de otros métodos, se somete a prueba una muestra biológica obtenida de un paciente para determinar el nivel de ferroportina. La muestra biológica se incuba con uno o más de los anticuerpos anti-ferroportina dados a conocer en el presente documento en condiciones y durante un tiempo suficientes como para permitir que se formen inmunocomplejos. Entonces se detectan los inmunocomplejos formados entre la ferroportina y los anticuerpos en la muestra biológica que se unen específicamente a la ferroportina. Una muestra biológica para su uso dentro de tales métodos puede ser cualquier muestra obtenida de un paciente que se espera que contenga ferroportina. Las muestras biológicas adecuadas incluyen células sanguíneas, otras células y muestras tisulares de biopsia, por ejemplo hígado, bazo o duodeno. Los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos de células humanas, roedor, conejo, cabra, camello o cualquier otra especie.

La muestra biológica se incuba con anticuerpos en una mezcla de reacción en condiciones y durante un tiempo suficientes como para permitir que se formen inmunocomplejos entre ferroportina y anticuerpos que son inmunoespecíficos para ferroportina. Por ejemplo, una muestra biológica y uno o más anticuerpos anti-ferroportina pueden incubarse a 4°C durante 24-48 horas.

Tras la incubación, la mezcla de reacción se somete a prueba para determinar la presencia de inmunocomplejos. La detección de los inmunocomplejos formados entre un anticuerpo anti-ferroportina y ferroportina presente en la muestra biológica puede lograrse mediante una variedad de técnicas conocidas, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Se conocen bien en la técnica ensayos adecuados y se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes (Harlow y Lane, 1988). Los ensayos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, la técnica de inmunoensayo de tipo sándwich de doble anticuerpo monoclonal (patente estadounidense n.º 4.376.110); ensayos de tipo sándwich de anticuerpo monoclonal-policlonal (Wide *et al.*, 1970); el método de la "inmunotransferencia de tipo Western" (patente estadounidense n.º 4.452.901); inmunoprecipitación de ligando marcado (Brown *et al.*, 1980); ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (Raines y Ross, 1982); técnicas de inmunocitoquímica, incluyendo el uso de fluorocromos (Brooks *et al.*, 1980); y neutralización de actividad (Bowen-Pope *et al.*, 1984). Otros inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 3.817.827, 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

Para fines de detección, un anticuerpo anti-ferroportina puede estar o bien marcado o bien no marcado. Pueden usarse anticuerpos no marcados en ensayos de aglutinación o en combinación con reactivos de detección marcados que se unen a los inmunocomplejos (por ejemplo, anti-inmunoglobulina, proteína G, proteína A o una lectina y anticuerpos secundarios, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que pueden unirse a los anticuerpos que se unen específicamente a la ferroportina). Si el anticuerpo anti-ferroportina está marcado, el grupo indicador puede ser cualquier grupo indicador adecuado conocido en la técnica, incluyendo radioisótopos, grupos fluorescentes (por ejemplo fluoresceína o rodamina), grupos luminiscentes, enzimas, biotina y partículas de colorante. Los marcadores que son detectables directamente por sí mismos incluyen colorantes fluorescentes o luminiscentes, metales o quelatos de metal, marcadores electroquímicos, radionúclidos (por ejemplo, ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H o ¹³¹I), marcadores

o perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS), marcadores paramagnéticos o marcadores colorimétricos (por ejemplo, oro coloidal, vidrio coloreado o perlas de plástico). Tales marcadores detectables pueden conjugarse directamente al reactivo de detección o anticuerpo anti-ferroportina o pueden asociarse con una perla o partícula que se une al reactivo de detección o anticuerpo anti-ferroportina. Los marcadores que son detectables a través de la unión de una pareja de unión específica marcada incluyen biotina, digoxigenina, maltosa, oligohistidina, 2,4-dinitrobenzato, arseniato de fenilo, ADNmc o ADNbc). Los marcadores indirectos que pueden detectarse indirectamente mediante su producción de un producto de reacción detectable incluyen diversas enzimas bien conocidas en la técnica, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, β -galactosidasa, xantina oxidasa, glucosa oxidasa u otras sacárido oxidasas, o luciferasas, que escinden un sustrato apropiado para formar un producto de reacción coloreado o fluorescente.

Dentro de determinados ensayos, se inmoviliza un anticuerpo anti-ferroportina no marcado sobre un soporte sólido, para su uso como "agente de captura" (o reactivo) que captura la ferroportina dentro de una muestra biológica. El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos habituales en la técnica al que puede unirse el anticuerpo. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pocillo de prueba en una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa u otra adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser un tubo, una perla, una partícula o un disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material de plástico tal como polietileno, polipropileno, poliestireno o poli(cloruro de vinilo) o una matriz porosa. Otros materiales incluyen agarosa, dextrano, poli(acrilamida), nailon, Sephadex, celulosa o polisacáridos. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tal como los dados a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.359.681. El anticuerpo anti-ferroportina inmovilizado puede ser un anticuerpo policlonal, o uno o más anticuerpos monoclonales tales como los descritos en el presente documento, o una combinación de un anticuerpo policlonal y uno o más anticuerpos monoclonales. El anticuerpo puede inmovilizarse sobre el soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes. En el contexto de la presente invención, el término "inmovilización" se refiere tanto a la asociación no covalente, tal como adsorción, como a la unión covalente (que puede ser una unión directa entre el antígeno y grupos funcionales en el soporte o puede ser una unión por medio de un agente de reticulación). Se contempla la inmovilización mediante adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. En tales casos, la adsorción puede lograrse mediante la puesta en contacto del anticuerpo anti-ferroportina, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero es normalmente de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día. En general, la puesta en contacto de un pocillo de una placa de microtitulación de plástico (incluyendo poliestireno o poli(cloruro de vinilo)) con una cantidad de péptido que oscila entre aproximadamente 10 ng y aproximadamente 10 μ g, de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 μ g, es suficiente para inmovilizar una cantidad adecuada de péptido.

Tras la inmovilización, normalmente se bloquean los sitios de unión a proteína restantes en el soporte. Puede usarse cualquier agente de bloqueo adecuado conocido por los expertos habituales en la técnica, incluyendo albúmina sérica bovina, TweenTM 20TM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), suero normal de cabra (NGS) inactivado por calor o BLOTTO (disolución tamponada de leche desnatada en polvo que también contiene un conservante, sales y un agente antiespumante). El soporte se incuba entonces con una muestra biológica sospechosa de contener ferroportina. La muestra puede aplicarse pura o, más a menudo, puede diluirse, habitualmente en una disolución tamponada que contiene una pequeña cantidad (el 0,1%-5,0% en peso) de proteína, tal como BSA, NGS o BLOTTO. En general, un tiempo de contacto (es decir, tiempo de incubación) apropiado es un periodo de tiempo que es suficiente para detectar la presencia de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que es inmuno-específico para la ferroportina dentro de una muestra que contiene ferroportina. Preferiblemente, el tiempo de contacto es suficiente para lograr un nivel de unión que es de al menos aproximadamente el 95% del que se logra en el equilibrio entre anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido y no unido. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que el tiempo necesario para lograr el equilibrio puede determinarse fácilmente sometiendo a ensayo el nivel de unión que se produce a lo largo de un periodo de tiempo. A temperatura ambiente, un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos es generalmente suficiente.

Entonces puede retirarse la muestra no unida mediante lavado del soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS que contiene TweenTM 20 al 0,1%. Entonces puede añadirse un reactivo de detección que se une a la ferroportina en los inmunocomplejos (formados mediante la unión del agente de captura y la ferroportina de la muestra). Tal reactivo de detección puede ser un anticuerpo policlonal, o uno o más anticuerpos monoclonales tales como los descritos en el presente documento, o una combinación de un anticuerpo policlonal y uno o más anticuerpos monoclonales tales como los descritos en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo. El reactivo de detección puede estar marcado directamente, es decir, comprende al menos un primer marcador detectable o molécula "indicadora". Alternativamente, el reactivo de detección puede ser un anticuerpo anti-ferroportina no marcado. Este anticuerpo anti-ferroportina no marcado (primario) se detecta entonces mediante la unión de un reactivo o anticuerpo secundario marcado al anticuerpo primario. Por ejemplo, si el anticuerpo primario es una inmunoglobulina murina, el anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo anti-inmunoglobulina murina marcado. De manera similar, si el anticuerpo primario es una inmunoglobulina de conejo, el anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo marcado.

El reactivo de detección se incuba con el inmunocomplejo durante una cantidad de tiempo suficiente para detectar el

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno unido del mismo. Una cantidad de tiempo apropiada puede determinarse generalmente sometiendo a ensayo el nivel de unión que se produce a lo largo de un periodo de tiempo. Entonces se retira el reactivo de detección o marcador no unido y se detecta el reactivo de detección o marcador unido usando un ensayo o instrumento analítico adecuado. El método empleado para detectar el grupo indicador depende de la naturaleza del grupo indicador. Para marcadores radiactivos, generalmente son apropiados métodos de recuento por centelleo o autorradiográficos. Pueden usarse métodos espectroscópicos para detectar colorantes, restos luminiscentes o quimioluminiscentes y diversos cromógenos, marcadores fluorescentes y similares. Puede detectarse biotina usando avidina, acoplada a un grupo indicador diferente (comúnmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores enzimáticos (incluyendo peroxidasa del rábano, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa) pueden detectarse generalmente mediante la adición de sustrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguido por análisis espectroscópico u otro análisis de los productos de reacción. Independientemente del método específico empleado, un nivel de reactivo de detección unido que es al menos dos veces mayor que el fondo (es decir, el nivel observado para una muestra biológica obtenida de un individuo con un nivel normal de ferroportina) indica la presencia de un trastorno asociado con la expresión de ferroportina.

En realizaciones alternativas, la muestra y el reactivo de detección pueden ponerse en contacto simultáneamente con el agente de captura, en vez de añadirse secuencialmente. Aún en otra alternativa, la muestra y el reactivo de detección pueden preincubarse juntos, luego añadirse al agente de captura. Otras variaciones resultan fácilmente evidentes a un experto habitual en la técnica.

En otra realización, la cantidad de ferroportina presente en una muestra se determina mediante un ensayo de unión competitiva. Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado (por ejemplo, un polipéptido de ferroportina, o una parte inmunológicamente reactiva del mismo) para competir con el analito de la muestra de prueba (un polipéptido de ferroportina) por la unión con una cantidad limitada de un anticuerpo anti-ferroportina. Tras la separación de ferroportina libre y unida, la ferroportina se cuantifica relacionando la razón de ferroportina unida/no unida con patrones conocidos. La cantidad de un polipéptido de ferroportina en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que llega a unirse a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que llega a unirse, los anticuerpos se inmovilizan normalmente sobre un soporte sólido de modo que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y el analito que permanecen sin unir. Por tanto, en tales realizaciones, también se contempla poner en contacto una muestra biológica con ferroportina marcada (o un fragmento marcado de la misma que conserva la antigenicidad de ferroportina) y un anticuerpo que se une a ferroportina, y detectar la cantidad de complejo anticuerpo-ferroportina marcada formado.

La preparación de conjugados a soportes sólidos o marcadores detectables a menudo comprende el uso de agentes de reticulación químicos. Los reactivos de reticulación contienen al menos dos grupos reactivos, y se dividen generalmente en agentes de reticulación homofuncionales (que contienen grupos reactivos idénticos) y agentes de reticulación heterofuncionales (que contienen grupos reactivos no idénticos). Están disponibles agentes de reticulación homobifuncionales que se acoplan a través de aminas, sulfhidrilos o no reaccionan específicamente de muchas fuentes comerciales. Las maleimidias, los haluros de alquilo y arilo, alfa-haloacilos y disulfuros de piridilo son grupos reactivos de tiol. Las maleimidias, los haluros de alquilo y arilo y alfa-haloacilos reaccionan con sulfhidrilos para formar enlaces tiol-éter, mientras que los disulfuros de piridilo reaccionan con sulfhidrilos para producir disulfuros mixtos. El producto de disulfuro de piridilo puede escindirse. Los imidoésteres son también muy útiles para reticulaciones proteína-proteína.

Los agentes de reticulación heterobifuncionales presentan dos o más grupos reactivos diferentes que permiten conjugaciones secuenciales con grupos de proteínas específicos, minimizando la polimerización o autoconjugación no deseables. Los reactivos heterobifuncionales también se usan cuando la modificación de aminas es problemática. A veces pueden encontrarse aminas en los sitios activos de macromoléculas, y la modificación de éstas puede conducir a la pérdida de actividad. Otros restos tales como sulfhidrilos, carboxilos, fenoles e hidratos de carbono pueden ser dianas más apropiadas. Una estrategia en dos etapas permite el acoplamiento de una proteína que puede tolerar la modificación de sus aminas a una proteína con otros grupos accesibles. Una variedad de agentes de reticulación heterobifuncionales, que combinan cada uno diferentes atributos para la conjugación satisfactoria, están disponibles comercialmente. Los agentes de reticulación que son reactivos con amina en un extremo y reactivos con sulfhidrilo en el otro extremo son bastante comunes. Si se usan reactivos heterobifuncionales, el grupo más lábil se hace reaccionar normalmente en primer lugar para garantizar la reticulación eficaz y evitar la polimerización no deseada.

Los trastornos de la homeostasis del hierro para los que los métodos de detección o monitorización pueden ser útiles incluyen sobrecarga de hierro africana, alfa-talasemia, enfermedad de Alzheimer, anemia, anemia de cáncer, anemia de enfermedad crónica, anemia de inflamación, arteriosclerosis o aterosclerosis (incluyendo arteriopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular o enfermedad arterial oclusiva periférica), ataxias, ataxias relacionadas con hierro, atranferrinemia, cáncer, deficiencia de ceruloplasmina, anemia inducida por quimioterapia, enfermedad renal/de riñón crónica (estadio I, II, III, IV o V), incluyendo enfermedad renal en fase avanzada o insuficiencia renal/de riñón crónica, cirrosis de hígado, hemocromatosis clásica, artritis inducida por colágeno (CIA), estados con exceso de hepcidina (hepcidina elevada), anemia diseritropoyética congénita, insuficiencia cardíaca congestiva,

5 enfermedad de Crohn, diabetes, trastornos de biodistribución del hierro, trastornos de la homeostasis del hierro, trastornos del metabolismo del hierro, enfermedad de ferroportina, hemocromatosis por mutación de ferroportina, deficiencia de folato, ataxia de Friedrich, mielosis funicular, síndrome GRACILE, infección por *H. pylori* u otras
 10 infecciones bacterianas, enfermedad de Hallervordan-Spatz, hemocromatosis, hemocromatosis que resulta de mutaciones en receptor de transferrina 2, hemoglobinopatías, hepatitis, hepatitis (Brock), hepatitis C, carcinoma hepatocelular, hemocromatosis hereditaria, VIH u otras enfermedades virales, enfermedad de Huntington, hiperferritinemia, anemia microcítica hipocrómica, hipoferremia, resistencia a la insulina, anemia por deficiencia de hierro, trastornos de deficiencia de hierro, trastornos de sobrecarga de hierro, estados de deficiencia de hierro con exceso de hepcidina, hemocromatosis juvenil (HFE2), esclerosis múltiple, mutación en receptor de transferrina 2,
 15 HFE, hemojuvelina, ferroportina u otros genes del metabolismo del hierro, hemocromatosis neonatal, enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el hierro, osteopenia, osteoporosis, pancreatitis, neurodegeneración asociada a pantotenato cinasa, enfermedad de Parkinson, pelagra, pica, porfiria, porfiria cutánea tardía, pseudoencefalitis, hemosiderosis pulmonar, trastornos de glóbulos rojos, artritis reumatoide, osteoartritis, septicemia, anemia sideroblástica, lupus eritematoso sistémico, talasemia, talasemia intermedia, sobrecarga de hierro transfusional, tumores, vasculitis, deficiencia de vitamina B6, deficiencia de vitamina B12, enfermedad de Wilson y/o trastornos
 20 cardiacos asociados con sobrecarga de hierro.

Durante el tratamiento con anticuerpos anti-ferroportina, puede monitorizarse el nivel de ferroportina en las células del sujeto, por ejemplo en muestras de células sanguíneas u otras células o en muestras tisulares de biopsia. Pueden tomarse opcionalmente muestras antes de la terapia, tras el comienzo del tratamiento y/o periódicamente durante el tratamiento

VI. Usos terapéuticos para anticuerpos anti-ferroportina

También se proporciona el uso de los anticuerpos descritos en el presente documento que se unen a ferroportina para tratar a sujetos que lo necesitan. En realizaciones a modo de ejemplo, el sujeto puede correr el riesgo de o padecer un trastorno de la homeostasis del hierro, un nivel elevado de hepcidina, un trastorno relacionado con hepcidina, aterosclerosis o anemia.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" se refiere tanto al tratamiento profiláctico de un sujeto que corre el riesgo de, o que tiene una predisposición hacia, una enfermedad o un trastorno, como al tratamiento terapéutico de un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno.

30 La administración de un agente terapéutico en un método profiláctico puede producirse antes de la manifestación de los síntomas de una enfermedad o un trastorno no deseado, de manera que la enfermedad o el trastorno se previene o, alternativamente, se retarda en su progresión. Por tanto, cuando se usa junto con métodos profilácticos, el término "terapéuticamente eficaz" significa que, tras el tratamiento, un menor número de sujetos (en promedio) desarrollan la enfermedad o el trastorno no deseado o progresan en la gravedad de los síntomas.

35 Cuando se usa junto con métodos terapéuticos que implican la administración de un agente terapéutico tras manifestar el sujeto los síntomas de una enfermedad o un trastorno, el término "terapéuticamente eficaz" significa que, tras el tratamiento, se mejoran o eliminan uno o más signos o síntomas de la enfermedad o el trastorno.

"Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es ser humano.

40 Tal como se usa en el presente documento, un "trastorno relacionado con hepcidina" se refiere a un estado provocado por o asociado con un nivel anómalo de hepcidina (por ejemplo, exceso de hepcidina o deficiencia de hepcidina con relación al grado de hierro almacenado) que altera la homeostasis del hierro. Una alteración en la homeostasis del hierro puede dar como resultado a su vez enfermedades secundarias tales como anemia.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad (o trastorno) de la homeostasis del hierro" se refiere a un estado en el que los niveles de hierro de un sujeto requieren modulación. Incluye trastornos relacionados con ferroportina, tales como enfermedad de ferroportina y hemocromatosis hereditaria de tipo IV; estados no asociados con niveles disminuidos de ferroportina que no obstante se beneficiarían de la conservación de ferroportina, trastornos relacionados con hepcidina; estados no asociados con niveles elevados de hepcidina que no obstante se beneficiarían de la inhibición de la actividad de hepcidina o la conservación de la actividad de ferroportina, tales como una alteración en la homeostasis del hierro no provocada por hepcidina; enfermedades en las que la absorción, recirculación, metabolismo o excreción aberrante de hierro provoca una alteración en la distribución tisular o los niveles sanguíneos de hierro normales; enfermedades en las que la desregulación del hierro es una consecuencia de otra enfermedad o estado, tal como inflamación, cáncer o quimioterapia; enfermedades o trastornos que resultan de la distribución tisular o los niveles sanguíneos de hierro anómalos; y enfermedades o trastornos que pueden tratarse mediante la modulación de la distribución o los niveles de hierro. Los ejemplos no limitativos de tales enfermedades o trastornos de la homeostasis del hierro, trastornos relacionados con hepcidina y estados inflamatorios que pueden dar como resultado exceso de hepcidina incluyen sobrecarga de hierro africana, alfa-talasemia, enfermedad de Alzheimer, anemia, anemia de cáncer, anemia de enfermedad crónica, anemia de

5 inflamación, arteriosclerosis o aterosclerosis (incluyendo arteriopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular o enfermedad arterial oclusiva periférica), ataxias, ataxias relacionadas con hierro, atranferrinemia, cáncer, deficiencia de ceruloplasmina, anemia inducida por quimioterapia, enfermedad renal/de riñón crónica (estadio I, II, III, IV o V), incluyendo enfermedad renal en fase avanzada o insuficiencia renal/de riñón crónica, cirrosis de hígado, hemocromatosis clásica, artritis inducida por colágeno (CIA), estados con exceso de hepcidina (hepcidina elevada), anemia diseritropoyética congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de Crohn, diabetes, trastornos de biodistribución del hierro, trastornos de la homeostasis del hierro, trastornos del metabolismo del hierro, enfermedad de ferroportina, hemocromatosis por mutación de ferroportina, deficiencia de folato, ataxia de Friedrich, mielosis funicular, síndrome GRACILE, infección por *H. pylori* u otras infecciones bacterianas, enfermedad de Hallervordan-Spatz, hemocromatosis, hemocromatosis que resulta de mutaciones en receptor de transferrina 2, hemoglobinopatías, hepatitis, hepatitis (Brock), hepatitis C, carcinoma hepatocelular, hemocromatosis hereditaria, VIH u otras enfermedades virales, enfermedad de Huntington, hiperferritinemia, anemia microcítica hipocrómica, hipoferremia, resistencia a la insulina, anemia por deficiencia de hierro, trastornos de deficiencia de hierro, trastornos de sobrecarga de hierro, estados de deficiencia de hierro con exceso de hepcidina, hemocromatosis juvenil (HFE2), esclerosis múltiple, mutación en el receptor de transferrina 2, HFE, hemojuvelina, ferroportina u otros genes del metabolismo del hierro, hemocromatosis neonatal, enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el hierro, osteopenia, osteoporosis, pancreatitis, neurodegeneración asociada a pantotenato cinasa, enfermedad de Parkinson, pelagra, pica, porfiria, porfiria cutánea tardía, pseudoencefalitis, hemosiderosis pulmonar, trastornos de glóbulos rojos, artritis reumatoide, osteoartritis, septicemia, anemia sideroblástica, lupus eritematoso sistémico, talasemia, talasemia intermedia, sobrecarga de hierro transfusional, tumores, vasculitis, deficiencia de vitamina B6, deficiencia de vitamina B12, enfermedad de Wilson y/o trastornos cardíacos asociados con sobrecarga de hierro.

25 Los estados no inflamatorios que están implicados en una alteración de la regulación del hierro incluyen, pero no se limitan a, deficiencia de vitamina B6, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de folato, pelagra, mielosis funicular, pseudoencefalitis, enfermedad de Parkinson (Fasano *et al.*, *J Neurochem.* 96:909 (2006) y Kaur *et al.*, *Ageing Res. Rev.*, 3:327 (2004)), enfermedad de Alzheimer, cardiopatía coronaria, osteopenia y osteoporosis (Guggenbuhl *et al.*, *Osteoporos. Int.* 16:1809 (2005)), hemoglobinopatías y otros trastornos del metabolismo de los glóbulos rojos (Papanikolaou *et al.*, *Blood* 105:4103 (2005)), y enfermedad arterial oclusiva periférica.

En la tabla 2, se enumeran diversos otros índices de hierro y sus intervalos normales de concentraciones.

Tabla 2

Índice de hierro	Nivel normal (intervalo)
Hierro sérico	50-170 µg/dl
Hemoglobina	11,5-18 g/dl
Hematocrito	37-54%
Recuento de glóbulos rojos (RBC)	4,6-6,2 x 10 ¹² células/l (hombres) 4,25-5,4 x 10 ¹² células/l (mujeres)
Hemoglobina corpuscular media (MCH)	27-32 pg
Concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC)	32-36%
Volumen corpuscular medio (MCV)	80-96 fl
Amplitud de distribución eritrocitaria (RDW)	11,5-14,5% (método de impedancia eléctrica) o 10,2-11,8% (método de luz láser)
Recuento de reticulocitos	18-158 x 10 ⁹ células/l (0,8-2,5% en hombres; 0,8-4% en mujeres)
Capacidad de unión a hierro total (TIBC)	250-450 µg/dl
Porcentaje de saturación de hierro de transferrina (Tsat)	15-50%
Ferritina	12-120 µg/l
Folato	3-16 ng/ml (suero) y 130-628 ng/ml (glóbulos rojos)
Vitamina B12	200-900 pg/ml

30 Un nivel de índice de hierro de un paciente fuera de los intervalos normales enumerados en la tabla 2 indica que el paciente puede beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo anti-ferroportina. Puesto que la ferroportina es el receptor para hepcidina, que desempeña un papel clave en la homeostasis del hierro, en algunas realizaciones de la invención la actividad y los niveles de hepcidina se correlacionarán con una alteración de la homeostasis del hierro y/o los índices de hierro. En algunas realizaciones, los niveles de hepcidina elevados se correlacionan con niveles de hierro sérico por debajo de los intervalos normales indicados en la tabla 2, valores bajos de hemoglobina y hematocrito, reducidos o normales de Tsat y altos o normales de ferritina, y estado inflamatorio elevado tal como se mide mediante la elevación de la proteína C-reactiva (CRP) u otros marcadores de inflamación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-hepcidina descrito en el presente documento se refiere a una cantidad que da como resultado el efecto terapéutico deseado (es decir que proporciona "eficacia terapéutica"). Los efectos terapéuticos a modo de ejemplo incluyen niveles aumentados de hierro circulante o disponibilidad aumentada de hierro, aumento del recuento de glóbulos rojos, aumento del volumen celular medio de glóbulos rojos, aumento del contenido en hemoglobina de los glóbulos rojos, aumento de la hemoglobina (por ejemplo, aumentada en $\geq 0,5$ g/dl), aumento del hematocrito, aumento de T_{sat}, aumento del recuento de reticulocitos, aumento o normalización del volumen celular medio de los reticulocitos, aumento del contenido en hemoglobina de los reticulocitos o reducción de los niveles de hepcidina libre en suero o plasma, o normalización de cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. No se requiere devolver un parámetro de este tipo a su intervalo normal para la eficacia terapéutica; por ejemplo, un cambio medible (aumento o reducción) en la dirección de lo normal puede considerarse que es un efecto terapéutico deseado por un médico clínico. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese componente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administren en combinación, en serie o simultáneamente. Por ejemplo, en aspectos en los que el anticuerpo anti-hepcidina se administra junto con un estimulador de la eritropoyesis, una cantidad terapéuticamente eficaz pretende referirse a la cantidad combinada que aumenta o normaliza cualquiera de los parámetros establecidos anteriormente.

Las composiciones para y los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden utilizar uno o más anticuerpos anti-hepcidina descritos en el presente documento usados individualmente o en combinación con otros agentes terapéuticos para lograr los efectos deseados.

En algunas realizaciones, se identifican en primer lugar posibles poblaciones de pacientes para el tratamiento de trastornos de la homeostasis del hierro evaluando el nivel de hepcidina en una muestra biológica. Un paciente que se identifica que tiene niveles elevados de hepcidina se consideraría como candidato para el tratamiento con los anticuerpos anti-ferroportina dados a conocer en el presente documento. En realizaciones a modo de ejemplo, se aísla una muestra biológica de un paciente y se incuba con uno o más anticuerpos anti-hepcidina. El nivel del complejo anticuerpo-hepcidina por encima de un umbral típico para la población convencional se considera un nivel de hepcidina elevado. Se dan a conocer anticuerpos frente a hepcidina adecuados para su uso en este método en la publicación de solicitud de patente estadounidense de propiedad conjunta n.º 2008-0213277. En otras realizaciones a modo de ejemplo, se determinan los niveles de hepcidina mediante técnicas de espectrometría de masas descritas en la solicitud de patente estadounidense de propiedad conjunta n.º 11/880.313 y la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2007/016477. Cuando se usan tales técnicas de espectrometría de masas, un nivel de hepcidina elevado en una muestra biológica es generalmente mayor de 10 ng/ml, pero variará dependiendo del ensayo y dependiendo del subconjunto de población sometido a prueba.

En algunas realizaciones, la terapia con un anticuerpo anti-ferroportina puede incluir la monitorización de cambios en el nivel de hepcidina en un sujeto tal como un paciente humano. Los métodos en los que los niveles de hepcidina se monitorizan pueden comprender (a) incubar una primera muestra biológica, obtenida de un paciente antes de la terapia con anticuerpo anti-ferroportina, con uno o más de anticuerpos anti-hepcidina o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en los que la incubación se realiza en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que se formen inmunocomplejo; (b) detectar los inmunocomplejos formados entre la hepcidina en la muestra biológica y anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; y opcionalmente (c) repetir las etapas (a) y (b) usando una segunda muestra biológica tomada del paciente a un tiempo posterior, tal como por ejemplo, tras la terapia con uno o más de los anticuerpos anti-ferroportina; y (d) comparar el número de inmunocomplejos detectados en las muestras biológicas primera y segunda. Un aumento en el número de inmunocomplejos en la segunda muestra en relación con la primera muestra indica un aumento en los niveles de hepcidina. Una muestra biológica para su uso dentro de tales métodos de monitorización puede ser cualquier muestra obtenida de un paciente que se esperaría que contuviese hepcidina. Las muestras biológicas a modo de ejemplo incluyen sangre, plasma, sueros, orina y médula ósea. Puede obtenerse una primera muestra biológica antes del inicio de la terapia o durante el transcurso de la terapia. La segunda muestra biológica debe obtenerse de una manera similar, pero a un tiempo tras la terapia adicional. La segunda muestra biológica puede obtenerse a la finalización de o durante el transcurso de la terapia, siempre que al menos una parte de la terapia tenga lugar entre el aislamiento de las muestras biológicas primera y segunda. Pueden realizarse generalmente procedimientos de incubación y detección para ambas muestras tal como se describe en la publicación de solicitud de patente provisional estadounidense de propiedad conjunta n.º 2008-0213277.

VII. Terapia de combinación

Puede resultar ventajoso además mezclar dos o más anticuerpos entre sí (que se unen a los mismos o a diferentes antígenos diana) o coadministrar un anticuerpo descrito en el presente documento con un segundo agente terapéutico para proporcionar una eficacia todavía mejorada. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de dos o más anticuerpos anti-ferroportina. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de uno o más anticuerpos anti-ferroportina y opcionalmente la administración de uno o más anticuerpos anti-hepcidina. Se han descrito anticuerpos monoclonales anti-hepcidina en la publicación de solicitud estadounidense 2008-0213277.

La administración concurrente de dos agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma vía, siempre que exista un solapamiento en el periodo de tiempo durante el cual los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, así como la administración en diferentes días o semanas.

5 En realizaciones a modo de ejemplo, los métodos descritos en el presente documento incluyen la administración de anticuerpos individuales, así como combinaciones, o "cócteles", de diferentes anticuerpos. Tales cócteles de anticuerpos pueden tener determinadas ventajas en la medida en que contienen anticuerpos que se aprovechan de diferentes mecanismos efectores. Tales anticuerpos en combinación pueden presentar efectos terapéuticos sinérgicos.

10 Se contempla específicamente la terapia de combinación que usa un anticuerpo anti-ferroportina y un estimulador de la eritropoyesis. En diversas realizaciones, pueden usarse anticuerpos anti-ferroportina y estimuladores de la eritropoyesis para mejorar el tratamiento de un paciente con anemia. En particular, pacientes con hiporreceptividad a, incluyendo sin receptividad a, terapia con estimulador de la eritropoyesis, tal como eritropoyetina o análogos de la misma (epoetina alfa, epoetina beta, darbepoetina alfa), entre otros, se beneficiarán del cotratamiento con un anticuerpo anti-ferroportina. En una realización, la terapia de combinación incluye tratamiento con al menos un anticuerpo que se une a ferroportina humana y al menos un estimulador de la eritropoyesis. En otra realización, la terapia de combinación incluye el tratamiento con al menos un anticuerpo que se une a ferroportina humana, al menos un anticuerpo que se une a hepcidina humana y al menos un estimulador de la eritropoyesis.

20 También se contempla terapia de combinación que usa un anticuerpo anti-ferroportina y un quelante de hierro para redistribuir o reducir las reservas de hierro en el cuerpo. Un quelante de hierro es un agente que puede unirse a hierro y retirarlo de un tejido o de la circulación. Los ejemplos incluyen deferoxamina (Desferal®) y deferasirox (Exjade®) y deferiprona (1,2-dimetil-3-hidroxipiridin-4-ona). En algunas realizaciones, pueden usarse anticuerpos frente a ferroportina y estimuladores de la eritropoyesis para mejorar el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de sobrecarga de hierro secundario a sobrecarga de hierro dependiente de transfusión, o que tiene un trastorno de mala distribución de hierro tal como ataxia de Friedreich.

25 También se contempla terapia de combinación que usa un anticuerpo anti-ferroportina y una flebotomía. Tal terapia de combinación puede usarse para mejorar el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno de sobrecarga de hierro, tal como hemocromatosis.

30 Tal como se usa en el presente documento, "estimulador de la eritropoyesis" significa un compuesto químico que produce directa o indirectamente la activación del receptor de eritropoyetina, por ejemplo, mediante la unión a y provocando un cambio conformacional del receptor o estimulando la expresión de eritropoyetina endógena. Los estimuladores de la eritropoyesis incluyen eritropoyetina y variantes, análogos o derivados de la misma que se unen a y activan el receptor de eritropoyetina; anticuerpos que se unen al receptor de eritropoyetina y activan el receptor; o péptidos que se unen a y activan el receptor de eritropoyetina; o compuestos químicos orgánicos pequeños, opcionalmente de menos de aproximadamente 1000 Dalton de peso molecular, que se unen a y activan el receptor de eritropoyetina. Los estimuladores de la eritropoyesis incluyen, pero no se limitan a, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega, epoetina iota, epoetina zeta, y análogos de las mismas, eritropoyetina pegilada, eritropoyetina carbamilada, péptidomiméticos (incluyendo EMP1/Hematide), anticuerpos miméticos e inhibidores de HIF (véase la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0020487). Los estimuladores de la eritropoyesis a modo de ejemplo incluyen eritropoyetina, darbepoetina, variantes de agonistas de eritropoyetina, y péptidos o anticuerpos que se unen a y activan el receptor de eritropoyetina (e incluyen compuestos notificados en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.ºs 2003/0215444 y 2006/0040858) así como moléculas de eritropoyetina o variantes o análogos de las mismas tal como se dan a conocer en las siguientes patentes o solicitudes de patente: las patentes estadounidenses n.ºs 4.703.008; 5.441.868; 5.547.933; 5.618.698; 5.621.080; 5.756.349; 5.767.078; 5.773.569; 5.955.422; 5.830.851; 5.856.298; 5.986.047; 6.030.086; 6.310.078; 6.391.633; 6.583.272; 6.586.398; 6.900.292; 6.750.369; 7.030.226; 7.084.245; 7.217.689; las publicaciones PCT n.ºs WO 91/05867; WO 95/05465; WO 99/66054; WO 00/24893; WO 01/81405; WO 00/61637; WO 01/36489; WO 02/014356; WO 02/19963; WO 02/20034; WO 02/49673; WO 02/085940; WO 03/029291; WO 2003/055526; WO 2003/084477; WO 2003/094858; WO 2004/002417; WO 2004/002424; WO 2004/009627; WO 2004/024761; WO 2004/033651; WO 2004/035603; WO 2004/043382; WO 2004/101600; WO 2004/101606; WO 2004/101611; WO 2004/106373; WO 2004/018667; WO 2005/001025; WO 2005/001136; WO 2005/021579; WO 2005/025606; WO 2005/032460; WO 2005/051327; WO 2005/063808; WO 2005/063809; WO 2005/070451; WO 2005/081687; WO 2005/084711; WO 2005/103076; WO 2005/100403; WO 2005/092369; WO 2006/50959; WO 2006/02646; WO 2006/29094; y las publicaciones estadounidenses n.ºs US 2002/0155998; US 2003/0077753; US 2003/0082749; US 2003/0143202; US 2004/0009902; US 2004/0071694; US 2004/0091961; US 2004/0143857; US 2004/0157293; US 2004/0175379; US 2004/0175824; US 2004/0229318; US 2004/0248815; US 2004/0266690; US 2005/0019914; US 2005/0026834; US 2005/0096461; US 2005/0107297; US 2005/0107591; US 2005/0124045; US 2005/0124564; US 2005/0137329; US 2005/0142642; US 2005/0143292; US 2005/0153879; US 2005/0158822; US 2005/0158832; US 2005/0170457; US 2005/0181359; US 2005/0181482; US 2005/0192211; US 2005/0202538; US 2005/0227289; US 2005/0244409; US 2006/0088906; y US 2006/0111279.

La eritropoyetina incluye, pero no se limita a, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta

en SEQ ID NO: 21. Los aminoácidos 1 a 165 de SEQ ID NO: 21 constituyen la proteína madura de cualquier molécula designada como epoetina, por ejemplo, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, epoetina omega, epoetina iota, epoetina gamma, epoetina zeta, y similares. Adicionalmente, una epoetina también incluye cualquiera de las epoetinas mencionadas anteriormente que se modifican químicamente, por ejemplo, con uno o más polímeros solubles en agua tales como, por ejemplo, polietilenglicol (incluyendo PEG-EPO-beta). También se contemplan análogos de eritropoyetina, con una identidad del 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% con SEQ ID NO: 21 que todavía conservan actividad eritropoyética.

Se describen secuencias, la fabricación, la purificación y el uso a modo de ejemplo de eritropoyetina humana recombinante en varias publicaciones de patente, incluyendo pero sin limitarse a la patente estadounidense 4.703.008 de Lin y la patente estadounidense 4.667.016 de Lai *et al.* La darbepoetina es un análogo de eritropoyetina hiperglicosilado que tiene cinco cambios en la secuencia de aminoácidos de rHuEPO que proporciona dos cadenas de hidrato de carbono adicionales. Más específicamente, la darbepoetina alfa contiene dos cadenas de hidrato de carbono con unión a N adicionales en los residuos de aminoácido 30 y 88 de SEQ ID NO: 21. Se describen secuencias, la fabricación, la purificación y el uso a modo de ejemplo de darbepoetina y otros análogos de eritropoyetina en varias publicaciones de patente, incluyendo el documento WO 91/05867 de Strickland *et al.*, el documento WO 95/05465 de Elliott *et al.*, el documento WO 00/24893 de Egrie *et al.* y el documento WO 01/81405 de Egrie *et al.* Los derivados de polipéptidos que se producen de manera natural o análogos incluyen aquéllos que se han modificado químicamente, por ejemplo, para unir polímeros solubles en agua (por ejemplo, pegilados), radionúclidos, u otros restos de diagnóstico o direccionamiento o terapéuticos.

El término "actividad eritropoyética" significa actividad para estimular la eritropoyesis tal como se demuestra en un ensayo *in vivo*, por ejemplo, el ensayo de ratón policitémico exhipóxico. Véase, por ejemplo, Cotes y Bangham, Nature 191:1065 (1961).

VIII. Administración y preparación de formulaciones farmacéuticas

En algunas realizaciones, los anticuerpos frente a ferroportina usados en la práctica de un método descrito en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un portador adecuado para el método de administración deseado. Los portadores adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con un anticuerpo frente a ferroportina, conserva la unión de alta afinidad de ferroportina y no es reactivo con los sistemas inmunitarios del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de varios portadores farmacéuticos convencionales tales como disoluciones estériles de solución salina tamponada con fosfato, agua bacteriostática, y similares. Puede usarse una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares, y pueden incluir otras proteínas para una estabilidad potenciada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc., sometidas a leves modificaciones químicas o similares.

Las concentraciones de anticuerpo a modo de ejemplo en la formulación pueden oscilar entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 180 mg/ml o entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, o entre aproximadamente 0,5 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, o alternativamente entre aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml. Puede prepararse una formulación acuosa del anticuerpo en una disolución de pH tamponado, por ejemplo, a un pH que oscila entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5, o entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,5, o alternativamente de aproximadamente 5,0. Los ejemplos de tampones que son adecuados para un pH dentro de este intervalo incluyen acetato (por ejemplo acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros tampones de ácidos orgánicos. La concentración del tampón puede ser de desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 200 mM, o desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 60 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y de la isotonicidad deseada de la formulación.

Puede incluirse un agente de tonicidad, que también puede estabilizar el anticuerpo, en la formulación. Los agentes de tonicidad a modo de ejemplo incluyen polioles, tales como manitol, sacarosa o trehalosa. Preferiblemente la formulación acuosa es isotónica, aunque pueden ser adecuadas disoluciones hipertónicas o hipotónicas. Las concentraciones a modo de ejemplo del poliol en la formulación pueden oscilar entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 15% p/v.

También puede añadirse un tensioactivo a la formulación de anticuerpo para reducir la agregación del anticuerpo formulado y/o minimizar la formación de materiales particulados en la formulación y/o reducir la adsorción. Los tensioactivos a modo de ejemplo incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbato (por ejemplo polisorbato 20 o polisorbato 80) o poloxámeros (por ejemplo poloxámero 188). Las concentraciones a modo de ejemplo de tensioactivo pueden oscilar entre aproximadamente el 0,001% y aproximadamente el 0,5%, o entre aproximadamente el 0,005% y aproximadamente el 0,2%, o alternativamente entre aproximadamente el 0,004% y aproximadamente el 0,01% p/v.

En una realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (es decir anticuerpo, tampón, poliol y tensioactivo) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y bencetonio Cl. En otra realización, puede incluirse un conservante en la formulación, por ejemplo, a concentraciones que oscilan entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 2%, o

alternativamente entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 1%. Pueden incluirse uno o más de otros portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en la formulación siempre que no afecten adversamente a las características deseadas de la formulación. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen; agentes tamponantes adicionales; codisolventes; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos de metal (por ejemplo complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal tales como sodio.

Se preparan formulaciones terapéuticas del anticuerpo frente a ferroportina para su almacenamiento mediante mezclado del anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, maltosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

En una realización, una formulación adecuada contiene un tampón isotónico tal como un tampón fosfato, acetato o TRIS en combinación con un agente de tonicidad tal como un poliol, sorbitol, sacarosa o cloruro de sodio que proporciona tonicidad y estabiliza. Un ejemplo de un agente de tonicidad de este tipo es sacarosa o sorbitol al 5%. Además, la formulación podría incluir opcionalmente un tensioactivo tal como para impedir la agregación y para la estabilización a del 0,01 al 0,02% peso/vol. El pH de la formulación puede oscilar entre 4,5-6,5 o 4,5-5,5. Pueden encontrarse otras descripciones a modo de ejemplo de formulaciones farmacéuticas para anticuerpos en el documento US 2003/0113316 y la patente estadounidense n.º 6.171.586.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que esté tratándose, preferiblemente aquéllos con actividades complementarias que no se afecten adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente inmunosupresor. Tales moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnica se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

También se contemplan suspensiones y formas cristalinas de anticuerpos. Un experto en la técnica conoce métodos para preparar suspensiones y formas cristalinas.

Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales. Por ejemplo, la esterilización se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las disoluciones resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución estéril antes de la administración.

A menudo se emplea el procedimiento de secado por congelación para estabilizar polipéptidos para su almacenamiento a largo plazo, particularmente cuando el polipéptido es relativamente inestable en composiciones líquidas. Un ciclo de liofilización se compone habitualmente de tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario; Williams y Polli, Journal of Parenteral Science and Technology, volumen 38, número 2, páginas 48-59 (1984). En la etapa de congelación, se enfría la disolución hasta que se congela de manera adecuada. El agua en volumen en la disolución forma hielo en esta fase. El hielo se sublima en la fase de secado primario, lo que se realiza reduciendo la presión de cámara por debajo de la presión de vapor del hielo, usando un vacío. Finalmente, se retira el agua sorbida o unida en la fase de secado secundario a presión de cámara reducida y una temperatura de anaquel elevada. El procedimiento produce un material conocido como torta liofilizada. Después de eso, puede reconstituirse la torta antes de su uso.

La práctica de reconstitución convencional para material liofilizado es añadir de nuevo un volumen de agua pura

(normalmente equivalente al volumen retirado durante la liofilización), aunque algunas veces se usan disoluciones diluidas de agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para la administración parenteral; Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, volumen 18, números 11 y 12, páginas 1311-1354 (1992).

5 Se han indicado excipientes en algunos casos para que actúen como estabilizadores para productos secados por congelación; Carpenter *et al.*, Developments in Biological Standardization, volumen 74, páginas 225-239 (1991). Por ejemplo, los excipientes conocidos incluyen polioles (incluyendo manitol, sorbitol y glicerol); azúcares (incluyendo glucosa y sacarosa); y aminoácidos (incluyendo alanina, glicina y ácido glutámico).

10 Además, a menudo también se usan polioles y azúcares para proteger los polipéptidos frente al daño inducido por la congelación y el secado y para potenciar la estabilidad durante el almacenamiento en el estado secado. En general, azúcares, en particular disacáridos, son eficaces tanto en el procedimiento de secado por congelación como durante el almacenamiento. También se han notificado otras clases de moléculas, incluyendo mono y disacáridos y polímeros tales como PVP, como estabilizadores de productos liofilizados.

15 Para inyección, la formulación farmacéutica y/o el medicamento puede ser un polvo adecuado para la reconstitución con una disolución apropiada tal como se describió anteriormente. Los ejemplos de éstos incluyen, pero no se limitan a, polvos secados por congelación, secados de manera giratoria o secados por pulverización, polvos amorfos, gránulos, precipitados o materiales particulados. Para inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de éstos.

20 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsula. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente estadounidense n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden concebirse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de disoluciones ácidas, el control del contenido en humedad, el uso de aditivos apropiados y el desarrollo de composiciones de matriz de polímero específicas.

En algunas realizaciones, las formulaciones de la invención pueden diseñarse para ser de acción rápida, de liberación rápida, de acción prolongada o de liberación sostenida tal como se describe en el presente documento. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas también pueden formularse para la liberación controlada o para la liberación lenta.

40 Las cantidades terapéuticamente eficaces de una composición variarán y dependerán de la gravedad de la enfermedad y el peso y el estado general del sujeto que esté tratándose, pero generalmente oscilan entre aproximadamente 1,0 µg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg por aplicación. La administración puede ser diaria, en días alternos, semanalmente, dos veces al mes, mensualmente o más o menos frecuentemente, según sea necesario dependiendo de la respuesta al trastorno o estado y la tolerancia del sujeto de la terapia. Pueden ser necesarias dosis de mantenimiento a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 10 ó 12 semanas o más, hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas del trastorno, y pueden ajustarse las dosificaciones según sea necesario. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

55 Pueden ajustarse dosificaciones específicas dependiendo de la enfermedad, la edad, el peso corporal, las condiciones de salud general, el sexo y la dieta del sujeto, los intervalos de dosis, las vías de administración, la tasa de excreción y las combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas farmacéuticas anteriores que contienen cantidades eficaces está bastante dentro de los límites de la experimentación rutinaria y, por tanto, bastante dentro del alcance de la presente invención.

El anticuerpo anti-ferroportina o agente de unión específica se administra mediante cualquier medio adecuado, o bien de manera sistémica o bien de manera local, incluyendo por vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las vías parenterales incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, epidural, intratecal. Además, el anticuerpo o

agente de unión específica se administra de manera adecuada mediante infusión pulsada, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo o agente de unión específica. Preferiblemente la dosificación se administra mediante inyecciones, lo más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan otros métodos de administración, incluyendo la administración tópica, particularmente transdérmica, transmucosa, rectal, oral o local por ejemplo a través de un catéter colocado próximo al sitio deseado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o agente de unión específica de la invención se administra por vía intravenosa en una disolución fisiológica a una dosis que oscila entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg a una frecuencia que oscila entre diariamente y semanalmente y mensualmente (por ejemplo cada día, cada dos días, cada tres días, o 2, 3, 4, 5 ó 6 veces a la semana), preferiblemente una dosis que oscila entre 0,1 y 45 mg/kg, entre 0,1 y 15 mg/kg o entre 0,1 y 10 mg/kg a una frecuencia de 2 ó 3 veces a la semana, o hasta 45 mg/kg una vez al mes.

IX. Kits de detección y kits terapéuticos

Por razones de conveniencia, un anticuerpo o agente de unión específica dado a conocer en el presente documento puede proporcionarse en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico o detección. Cuando se marca el anticuerpo con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el fluoróforo o cromóforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

También se proporcionan reactivos y kits de diagnóstico o detección que comprenden uno o más de tales reactivos para su uso en una variedad de ensayos de detección, incluyendo por ejemplo, inmunoensayos tales como ELISA (de tipo sándwich o formato competitivo). Los componentes del kit pueden unirse previamente a un soporte sólido, o pueden aplicarse a la superficie de un soporte sólido cuando se usa el kit. En alguna realización, los medios de generación de señales pueden venir asociados previamente con un anticuerpo de la invención o pueden requerir la combinación con uno o más componentes, por ejemplo, tampones, conjugados de anticuerpo-enzima, sustratos enzimáticos, o similares, antes de su uso. Los kits también pueden incluir reactivos adicionales, por ejemplo, reactivos de bloqueo para reducir la unión inespecífica a la superficie de la fase sólida, reactivos de lavado, sustratos enzimáticos, y similares. La superficie de la fase sólida puede estar en forma de un tubo, una perla, una placa de microtitulación, una microesfera u otros materiales adecuados para la inmovilización de proteínas, péptidos o polipéptidos. Preferiblemente, una enzima que cataliza la formación de un producto quimioluminiscente o cromogénico o la reducción de un sustrato quimioluminiscente o cromogénico es un componente de los medios de generación de señales. Tales enzimas se conocen bien en la técnica. Los kits pueden comprender cualquiera de los agentes de captura y reactivos de detección descritos en el presente documento. Opcionalmente el kit también puede comprender instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

También se proporciona un kit que comprende un anticuerpo anti-ferroportina descrito en el presente documento y un estimulador de la eritropoyesis envasado en un recipiente, tal como un vial o frasco, y que comprende además una etiqueta unida a o envasada con el recipiente, describiendo la etiqueta el contenido del recipiente y proporcionando indicaciones y/o instrucciones referentes al uso del contenido del recipiente para tratar uno o más estados patológicos tal como se describen en el presente documento.

En un aspecto, el kit es para tratar un trastorno de la homeostasis del hierro y comprende un anticuerpo anti-ferroportina y un estimulador de la eritropoyesis. El kit puede incluir además opcionalmente hierro para la administración oral o parenteral, por ejemplo intravenosa. En otro aspecto, el kit comprende un anticuerpo anti-ferroportina y una etiqueta unida a o envasada con el recipiente que describe el uso del anticuerpo anti-ferroportina con un estimulador de la eritropoyesis. Aún en otro aspecto, el kit comprende un estimulador de la eritropoyesis y una etiqueta unida a o envasada con el recipiente que describe el uso del estimulador de la eritropoyesis con un anticuerpo anti-ferroportina. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-hepcidina y un estimulador de la eritropoyesis, y opcionalmente el hierro, están en viales separados o se combinan entre sí en la misma composición farmacéutica. Aún en otro aspecto, un anticuerpo anti-ferroportina se combina con hierro en una única composición farmacéutica. Aún en otra realización, el estimulador de la eritropoyesis se combina con hierro en una única composición farmacéutica.

Tal como se comentó anteriormente en la sección de terapia de combinación, la administración concurrente de dos agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma vía, siempre que exista un solapamiento en el periodo de tiempo durante el cual los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, como lo es la administración en diferentes días o semanas.

Los kits terapéuticos y de detección dados a conocer en el presente documento también pueden prepararse para que comprendan al menos uno del anticuerpo, péptido, fragmento de unión a antígeno o polinucleótido dados a conocer en el presente documento e instrucciones para usar la composición como reactivo de detección o agente

terapéutico. Los recipientes para su uso en tales kits pueden comprender normalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro recipiente adecuado, en el que pueden colocarse uno o más de la(s) composición/composiciones de detección y/o terapéutica(s), y preferiblemente alicuotada(s) de manera adecuada. Cuando también se proporciona un segundo agente terapéutico, el kit también puede contener un segundo recipiente distinto en el que puede colocarse esta segunda composición de detección y/o terapéutica. Alternativamente, una pluralidad de compuestos pueden prepararse en una única composición farmacéutica, y pueden envasarse en un único medio de recipiente, tales como un vial, matraz, jeringa, frasco u otro único recipiente adecuado. Los kits de la presente invención también incluirán normalmente un medio para contener el/los vial(es) en estrecho confinamiento para la venta comercial, tal como, por ejemplo, recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se conservan el/los vial(es) deseado(s). Cuando se incluye un radiomarcador, marcador cromogénico, fluorogénico u otro tipo de medio de detección o marcador detectable dentro del kit, el agente de marcaje puede proporcionarse o bien en el mismo recipiente que la propia composición de detección o terapéutica, o bien alternativamente puede colocarse en un segundo medio de recipiente distinto en el que puede colocarse esta segunda composición y alicuotarse de manera adecuada. Alternativamente, el reactivo de detección y el marcador pueden prepararse en un único medio de recipiente, y en la mayor parte de los casos, el kit también incluirá normalmente un medio para contener el/los vial(es) en estrecho confinamiento para la venta comercial y/o el envasado y suministro convenientes.

También se proporciona un dispositivo o aparato para llevar a cabo los métodos de detección o monitorización descritos en el presente documento. Un aparato de este tipo puede incluir una cámara o un tubo en el que puede introducirse muestra, un sistema de manipulación de fluido que incluye opcionalmente válvulas o bombas para dirigir el flujo de la muestra a través del dispositivo, opcionalmente filtros para separar plasma o suero de la sangre, cámaras de mezclado para la adición de agentes de captura o reactivos de detección, y opcionalmente un dispositivo de detección para detectar la cantidad de marcador detectable unido al inmunocomplejo de agente de captura. El flujo de muestra puede ser pasivo (por ejemplo, mediante fuerzas capilares, hidrostáticas u otras fuerzas que no requieren la manipulación adicional del dispositivo una vez que se aplica la muestra) o activo (por ejemplo, mediante la aplicación de fuerza generada mediante bombas mecánicas, bombas electrosmóticas, fuerza centrífuga o aumento de la presión de aire), o mediante una combinación de fuerzas activas y pasivas.

En realizaciones relacionadas, también se proporciona un procesador, una memoria legible por ordenador y una rutina almacenada en la memoria legible por ordenador y adaptada para ejecutarse en el procesador para realizar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de configuraciones, entornos y/o sistemas informáticos adecuados incluyen ordenadores personales, ordenadores de servidor, dispositivos de mano o portátiles, sistemas multiprocesador, sistemas basados en microprocesador, módulos decodificadores, electrónica de consumo programable, PC en red, miniordenadores, ordenadores centrales, entornos informáticos distribuidos que incluyen cualquiera de los sistemas o dispositivos anteriores, o cualquier otro sistema conocido en la técnica.

35 X. Usos no terapéuticos para anticuerpos frente a ferroportina

Los anticuerpos dados a conocer en el presente documento pueden usarse como agentes de purificación por afinidad para antígeno diana o en ensayos de diagnóstico para antígeno diana, por ejemplo, detectar su expresión en tejidos o células (por ejemplo células sanguíneas) específicos. Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, para estos fines se marca el anticuerpo con un radionúclido (tal como ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ¹²⁵I, ³H, ³²P o ³⁵S) de modo que pueda localizarse el sitio usando inmunogammagrafía.

Los anticuerpos dados a conocer en el presente documento pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, tales como ELISA, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987); Zola, Heddy. Monoclonal Antibodies The Second Generation. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1995 y Zola, Heddy. Monoclonal Antibodies Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives. Oxford: BIOS, 2000. Los anticuerpos también pueden usarse para inmunohistoquímica, para marcar muestras de células usando métodos conocidos en la técnica.

XI. Ejemplos

Ejemplo 1 - Producción de anticuerpos monoclonales anti-ferroportina mediante inmunización genética

Se construyó un vector viral para la expresión de ferroportina humana (hFpn) fusionando ADN que codifica para el péptido PADRE, AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 24), en marco con el extremo terminal 3' del ADNc de ferroportina humana (SEQ ID NO: 15) tras delecionar su codón de terminación. Se insertó el ADN resultante que codifica para la fusión hFpn-PADRE en un vector adenoviral de entrada pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen V493-20, Carlsbad, CA) mediante reacción de recombinación LR. Se amplificó el vector adenoviral en células 293T, se purificó mediante centrifugación en gradiente de CsCl y se tituló mediante el kit de titulación rápida Adeno-X (n.º de cat. 631028, BD Biosciences, CA).

También se insertó un fragmento de ADN que codifica para la fusión hFpn-PADRE en phCMV1 (P003100, Gene Therapy Systems, San Diego, CA), y se usó el ADN de plásmido resultante para el refuerzo de ADN mediante

electroporación. Se purificaron los ADN de plásmido para la inmunización de ratones usando el kit EndoFree Plasmid Mega de QIAGEN (QIAGEN, Valencia, CA).

Se generaron preparaciones de membrana a partir de células 293E6 que expresan ferroportina humana-PADRE introduciendo ADN de ferroportina humana-PADRE en $1,1 \times 10^7$ células 293E6 usando técnicas de transfección convencionales. Se sedimentaron las células tras 48 horas y se resuspendieron en presencia de inhibidores de proteasas en un tampón hipotónico (HEPES 10 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 1 mM). Se lisaron las células mecánicamente y se separaron las membranas de los residuos celulares restantes usando un gradiente de sacarosa.

Se adquirieron ratones C57B1/6 de cinco a 6 semanas de edad de Charles Liver Laboratory. Para la inyección de adenovirus recombinante, rAd/CMV-hFpn-PADRE, se anestesiaron los ratones con isoflurano (Abbott, IL) y se les inyectaron por vía intradérmica 50 μ l de 2×10^9 i.f.u. (unidad infecciosa) en un único sitio. Se reforzaron los ratones 3 veces con electroporación de ADN de plásmido. Para la electroporación de ADN, se anestesiaron los ratones con isoflurano, se guardaron y se les inyectó por vía intradérmica 50 μ l de 50 μ g de pHCMV-hFpn-PADRE en solución salina y seguido por electroporación. Se llevó a cabo la electroporación usando BTX830 (BTX Inc., San Diego, CA) y electrodos Tweezertrode. Los ratones recibieron 4 pulsos discontinuos, de 200 ms cada uno, y se invirtieron los electrodos Tweezertrode y se administró el otro conjunto de pulsos. Se administró cada inmunización cada 3 semanas. Cinco días antes de la fusión, se les administró a los ratones un refuerzo final con 200 μ g de la preparación de membrana hFpn-PADRE.

Se recogieron los bazos de dos ratones y se examinaron los sobrenadantes de hibridoma resultantes en primer lugar para determinar la unión a ferroportina usando células que expresan ferroportina (ejemplo 3) y en segundo lugar para determinar la función (conservación de la actividad de flujo de salida de hierro de la ferroportina) usando un ensayo de respuesta a hierro (ejemplo 5). Se examinaron aproximadamente 4000 sobrenadantes y, de estos, se encontró que sólo 33 anticuerpos se unían a ferroportina y, de estos, sólo uno, 31A5, proporcionaba conservación de ferroportina en presencia de hepcidina.

Ejemplo 2 - Producción de otros anticuerpos anti-ferroportina

Se generaron anticuerpos anti-ferroportina adicionales tal como sigue. Se inmunizaron ratones Xenomouse™ IgG2 κ λ e IgG4 κ λ con o bien células que expresan ferroportina o bien membranas de células que expresan ferroportina. En resumen, se inmunizaron ratones IgG4 κ λ e IgG2 κ λ con células 293T que expresan de manera transitoria ferroportina o con preparaciones de membrana de células 293E6 que expresan ferroportina. Se suministraron antígenos o bien por vía subcutánea o bien por medio de la cavidad peritoneal. Se reforzaron los ratones usando alícuotas del antígeno inicial hasta que podían detectarse anticuerpos anti-ferroportina en el suero. Se recogieron los ratones con los títulos anti-ferroportina más altos y se examinaron en primer lugar los hibridomas para determinar la unión a ferroportina usando células que expresan ferroportina (ejemplo 4) y se examinaron en segundo lugar para determinar la función (conservación de la actividad de flujo de salida de hierro de la ferroportina) usando un ensayo de respuesta a hierro (ejemplo 5).

Se expone en la tabla 3 un resumen de las diversas campañas de anticuerpos. Queda claro que la generación de anticuerpos que proporcionan conservación de ferroportina no es una propiedad compartida por todos los anticuerpos frente a ferroportina. Los anticuerpos producidos mediante la inmunización tradicional de Xenomouse incluyeron 37A2 (figura 8E y SEQ ID NO: 25-34), 37B9 (figura 8D y SEQ ID NO: 35-44), 37C8 (figura 8D y SEQ ID NO: 45-54), 37G8 (figura 8C y SEQ ID NO: 55-64), 38A4 (figura 8C y SEQ ID NO: 65-74), 38C8 (figura 8B y SEQ ID NO: 75-84) 38D2 (figura 8B y SEQ ID NO: 85-94), 38E3 (figura 8A y SEQ ID NO: 95-104) y 38G6 (figura 8A y SEQ ID NO: 105-114).

Campañas de anticuerpos frente a ferroportina (Fpn) humana	Sobrenadantes examinados	Anticuerpos que se unen a Fpn	Anticuerpos que protegen posiblemente a Fpn
Inmunización genética de ratones	4000	37	1
Inmunización tradicional de XENOMOUSE™	7600	200	11

Ejemplo 3 - Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-ferroportina

Para confirmar la especificidad de 31A5 por ferroportina, se realizaron análisis de tipo Western usando preparaciones de membrana de células que expresan ferroportina.

Se sometieron aproximadamente 5 μ g de preparación de membrana en bruto de o bien células 293T que expresan ferroportina o bien células 293T silvestres a electroforesis en gel y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se estudiaron con sonda con o bien 31A5 500 ng/ml o bien anticuerpo policlonal de conejo anti-péptido de ferroportina 2 μ g/ml seguido por un anticuerpo secundario o bien anti-ratón o bien anti-conejo, respectivamente. Se generó el antisuero policlonal mediante inmunización con un péptido de ferroportina que abarca los residuos 247-265 de SEQ ID NO: 16 y se purificó con el mismo péptido.

31A5 reconoció una banda que migra a la masa molecular predicha de ferroportina, aproximadamente 63 kDa, y es similar a la detectada por un antisuero control positivo generado contra un péptido de ferroportina. Se predijo que ambas bandas relevantes reconocidas por 31A5 eran ferroportina, que a menudo aparece como un doblete (de Domenico *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:8955-8960, 2005). De los otros 31 anticuerpos anti-ferroportina identificados, menos de 10 reconocieron ferroportina mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western y ninguno de esos 10 conservó la actividad de exportación de hierro de la ferroportina en presencia de hepcidina.

Entonces se sometió a prueba 31A5 mediante análisis de tipo Western para determinar su capacidad para reconocer un panel de conjugados de péptido de ferroportina-Fc, en el que el resto de péptido se derivó de diferentes regiones no solapantes de la secuencia de ferroportina. Se ejecutaron 500 ng de los conjugados de péptido de ferroportina-Fc 1-5 (péptido 1: LGAIIGDWWDKNARLKVAQTSL, aminoácidos 75-96 de SEQ ID NO: 16; péptido 2: ITIQRDWIVVWAGEDRSKLANMNATIRRIDQL, aminoácidos 152-183 de SEQ ID NO: 16; péptido 3: GYAYTQGLS, aminoácidos 330-338 de SEQ ID NO: 16; péptido 4: MPGSPLDLSVSPFEDIRSRFIQGESITPTKIPEITTEIYMSNGSNSANIVPETS, aminoácidos 393-446 de SEQ ID NO: 16; y péptido 5: AQNTLGNKLFACGPDAKEVRKENQANTSVV, aminoácidos: 542-571 de SEQ ID NO: 16) en un gel NuPAGE al 4-12%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se estudiaron con sonda usando 31A5 200 mg/ml seguido por un anticuerpo secundario anti-ratón.

31A5 mostró unión significativa a sólo uno de los 5 péptidos sometidos a prueba, el péptido 4 que comprende los residuos de ferroportina 393-446 de SEQ ID NO: 16. Ninguno de los otros anticuerpos de unión a ferroportina se unieron de manera apreciable a este péptido. La ubicación del epítipo de 31A5 se limitó adicionalmente detectando la unión a péptidos de ferroportina que oscilaban en longitud entre 7 y 10 aminoácidos inmovilizados sobre una membrana de celulosa. A partir de estos estudios de unión, se determinó que el epítipo de 31A5 está dentro de la secuencia de péptido: ANIVPETPES (residuos de ferroportina 439-449 de SEQ ID NO: 16) (figura 2). Se ha mostrado recientemente que el residuo cisteína 326 es un componente del sitio de unión a hepcidina (Nemeth *et al.*, International Biolron Society Program Book and Abstracts, 2007: p. 28 y de Domenico *et al.* Cell Metab., 8: 146-156, 2008). El residuo de cisteína 326 de SEQ ID NO: 16 está ubicado en un bucle extracelular diferente del bucle que contiene el epítipo de 31A5 (es decir, el bucle 3 de la figura 1A).

Ejemplo 4 - Caracterización de anticuerpos anti-ferroportina humanos

El siguiente ejemplo describe el mapeo de epítipos para los anticuerpos humanos 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6.

Se usó la técnica PepSpot (Heiskanen *et al.*, Virology, 262:321-332, 1999) para identificar los epítipos de unión a ferroportina para los anticuerpos humanos 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6. En resumen, se sintetizó un alineamiento de péptidos de 10 meros solapantes sobre una membrana de celulosa mediante un método de posicionamiento de síntesis de péptidos en fase sólida. Se derivaron estas secuencias peptídicas de los aminoácidos 1-571 de SEQ ID NO: 16. Entonces se empapó el alineamiento en Tween-20 al 0,05%/PBS (PBS-T), se bloqueó con BSA al 5% en PBS-T durante 3 horas a temperatura ambiente y se lavó posteriormente tres veces con PBS-T. Entonces se incubó la matriz preparada durante 90 minutos a temperatura ambiente con disolución 1 µg/ml de los anticuerpos 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 o 38G6 en leche en polvo desnatada al 5%. Tras la unión, se lavó la membrana tres veces con PBS-T y se incubó posteriormente durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti-cadena ligera humana conjugado con peroxidasa del rábano diluido 1:50.000 en leche en polvo desnatada al 5%. Entonces se lavó la membrana tres veces con PBS-T y se determinó cualquier unión usando detección de quimioluminiscencia en película de rayos X.

Los anticuerpos 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6 se unieron a epítipos dentro de, solapándose o cerca de los bucles 1, 2, 3 y 4 de la secuencia de ferroportina expuesta en la figura 1A. En particular, 37A2 reconoció un fragmento de ferroportina que comprende los aminoácidos SITPTKIPEI (aminoácidos 417-426 de SEQ ID NO: 16); todos de 37B9, 37C8, 37G8, 38C8 y 38E3 reconocieron fragmentos de ferroportina que comprenden los aminoácidos AFLYMTVLGF (aminoácidos 315-324 de SEQ ID NO: 16); 38A4 reconoció fragmentos de ferroportina que comprenden los aminoácidos ITTEIYMSNGSNS (aminoácidos 426-438 de SEQ ID NO: 16); 38G6 reconoció fragmentos de ferroportina que comprenden los aminoácidos TEIYMSNGSNSA (aminoácidos 428-439 de SEQ ID NO: 16) y 38D2 reconoció fragmentos de ferroportina que comprenden los aminoácidos YHGWWLTSCY (aminoácidos 124-133 de SEQ ID NO: 16) y los aminoácidos RDGWVSYYNQ (aminoácidos 296-305 de SEQ ID NO: 16). Se ha mostrado recientemente que el residuo cisteína 326 de SEQ ID NO: 16 es un componente del sitio de unión a hepcidina (Nemeth *et al.*, International Biolron Society Program Book and Abstracts, 2007: p. 28; de Domenico *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:8955-8960, 2005). El residuo de cisteína 326 de SEQ ID NO: 16 está ubicado en un bucle extracelular diferente, el bucle 3, en comparación con los bucles que contienen los epítipos de 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6.

La figura 9 muestra los epítipos reconocidos por los diversos anticuerpos anti-ferroportina dados a conocer en el presente documento.

Ejemplo 5 - Un anticuerpo anti-ferroportina conserva la actividad de exportación de hierro de la ferroportina en un ensayo de respuesta a hierro *in vitro*

Este ensayo permite la detección de los niveles de hierro intracelular a través de la monitorización de la actividad de un gen indicador de beta lactamasa fusionado al elemento de respuesta a hierro ferritina. Bajos niveles de hierro intracelular en células que expresan ferroportina son indicativos de ferroportina activa, mientras que altos niveles de hierro intracelular son indicativos de actividad de ferroportina reducida. La hepcidina provoca que la ferroportina se internalice y se elimine de la superficie celular, inhibiendo por tanto la liberación de hierro y elevando las concentraciones de hierro intracelular. Se evaluó el efecto de anticuerpos anti-ferroportina humana sobre este secuestro de hierro *in vitro*.

Se construyó una línea de células 293 que contenía un constructo de expresión de ferroportina (Fpn) inducible por doxiciclina así como un constructo de expresión de beta-lactamasa (BLA) que contenía una copia del elemento de respuesta a hierro (IRE) en 5' a partir de ferritina que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos (tcggccccgctcctgccaccgcagattggcgcgtagccctccccgagcgcctgctccgagggccggcgcaccataaagaagccgcctagccacgtcccctcgagttcgccggtcccgcgggtctgtctcttgctcaacagttgttgacggaacagatccgggggactctctccagcctccgaccgcctccgattcctctccgcttgcaacctccgggaccatctctcgccatctctgctctctgggacctgccagcaccgtttttgtggttagctcctcttgccaacc) (SEQ ID NO: 23) que regula la traducción de ARNm. Se sembraron en placa estas células 293/Fpn/BLA, tomadas a partir de un cultivo confluyente al 70-80%, a $2,8 \times 10^5$ células/ml en DMEM (n.º de cat. de Invitrogen 11965) con FBS al 5% (n.º de cat. de Invitrogen 10099-141) y PSQ ((disolución de penicilina, estreptomina, glutamina, n.º de cat. de Invitrogen 10378-016), 90 µl/pocillo (25.000 células/pocillo) en placas recubiertas con poli-D-lisina BioCoat (n.º de cat. de Becton-Dickinson 35-6640) y se incubaron a 37°C con el 5% de CO₂. Al final del mismo día, se preparó una disolución de medio de ensayo (DMEM, FBS al 5%, PSQ) con doxiciclina 100 µg/ml, se añadieron 10 µl/pocillo de la misma a la placa y se incubó la placa durante la noche o durante al menos 20 horas. El día siguiente, se retiró el medio de los pocillos y se reemplazó por mezclas preparadas previamente de DMEM con FBS al 5% PSQ, citrato férrico 2,5 µg/ml, hepcidina humana sintética 36 nM y diluciones en serie de los anticuerpos (2.7: anticuerpo de ratón anti-hepcidina humana; 31A5: anticuerpo de ratón anti-ferroportina humana) y anticuerpo de control de IgG2 de ratón), preparados todos en una placa de bloqueo de pocillos profundos de polipropileno de 96 pocillos inmediatamente antes de la adición a la placa de ensayo. Se añadieron las mezclas a 100 µl/pocillo y se incubaron durante la noche a 37°C, el 5% de CO₂ en un incubador de cultivo celular. Entonces se retiraron las placas del incubador y se equilibraron hasta temperatura ambiente durante 10 minutos antes de añadir 20 µl/pocillo del reactivo de revelado preparado GeneBlazer CCF4 A/M de Invitrogen (n.º de kit de Invitrogen K1085) e incubar durante 90 minutos en la oscuridad. También se añadió reactivo de revelado a 16 pocillos de una placa de ensayo control sin células que contenía 100 µl de medio de ensayo (DMEM con FBS al 5% PSQ) y se incubó durante el mismo tiempo. Entonces se leyeron las señales de fluorescencia azul y verde en un lector multietiqueta Envision (Perkin-Elmer Inc.) mediante excitación a 409 nm y leyendo las emisiones a 447 nm (azul) y 520 nm (verde). Se representan los resultados en la figura 3. Se determinó que 2.7 y 31A5 disminuían la concentración intracelular de hierro con una CI₅₀ de 14 nM y 30 nM, respectivamente. Los anticuerpos 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2, 38E3 y 38G6 disminuían la concentración intracelular de hierro con una CI₅₀ de 4,5 nM, 3,6 nM, 0,8 nM, 1,6 nM, 0,4 nM, 0,9 nM, 10 nM, 15 nM y 4.3 nM, respectivamente.

Ejemplo 6 - Un anticuerpo anti-ferroportina protege a la ferroportina de la internalización y degradación por hepcidina

Se construyó una línea de células 293 que contiene un constructo de expresión de ferroportina (Fpn) inducible por doxiciclina con una secuencia C-terminal que codifica para una etiqueta de epítipo V5. Se sembraron en placa estas células 293/Fpn-V5, tomadas a partir de un cultivo confluyente al 70-80%, a $5,0 \times 10^5$ células/ml en DMEM (n.º de cat. de Invitrogen 11965), FBS al 10% (n.º de cat. de Invitrogen 10099-141), PSQ (n.º de cat. de Invitrogen 10378-016), doxiciclina 100 µg/ml, citrato férrico 2,5 µg/ml, 100 µl/pocillo (50.000 células) en placas recubiertas con poli-D Lisina (n.º de cat. de Becton-Dickinson 35-6640) y se incubaron durante la noche o durante al menos 20 horas a 37°C con el 5% de CO₂. El día siguiente, se eliminó el medio de los pocillos y se reemplazó por mezclas preparadas previamente de DMEM, FBS al 10%, PSQ, citrato férrico 2,5 µg/ml, hepcidina humana recombinante 37 nM y diluciones en serie de los anticuerpos (2.7, 31A5, 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2 y 38G6 y anticuerpo control de mIgG2), todos preparados en una placa de bloqueo de pocillos profundos de polipropileno de 96 pocillos inmediatamente antes de la adición a la placa de ensayo. Se añadieron las mezclas a 100 µl/pocillo y se incubaron durante la noche a 37°C, el 5% de CO₂ en un incubador de cultivo celular.

Se trataron células que expresan ferroportina-V5 con hepcidina 37 nM y diluciones en serie de los anticuerpos (anticuerpo de ratón 2.7 (anticuerpo anti-hepcidina), anticuerpo humano 31A5 y anticuerpo control de mIgG2) durante la noche. Se fijaron las células, se permeabilizaron y se detectó ferroportina-V5 usando un anticuerpo anti-V5 conjugado con FITC. Se detectó la expresión en superficie de ferroportina usando un microscopio de fluorescencia confocal y se exponen los resultados en la figura 4A. Se detectó la fluorescencia total usando un fluorómetro y se exponen los resultados en la figura 4B. Los resultados confirmaron que el 31A5 monoclonal conservaba la actividad de ferroportina impidiendo la internalización y degradación de ferroportina. Los anticuerpos 37A2, 37B9, 37C8, 37G8, 38A4, 38C8, 38D2 y 38G6 conservaban la actividad de ferroportina con una CI₅₀ de 2,5 nM, 0,2 nM, 0,2 nM, 0,8 nM, 2,8 nM, 0,3 nM, 5,4 nM y 1,9 nM, respectivamente.

Ejemplo 7 - Detección de ferroportina mediante inmunohistoquímica

Se ha detectado la expresión de ferroportina de mamífero en la membrana basolateral de enterocitos duodenales y

en macrófagos del sistema reticuloendotelial (Canonne-Hergaux, *et al.*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 290(1): p. G156-63, 2006; Donovan, A., *et al.*, Cell Metab, 1(3): p. 191-200, 2005). Usando 31A5, se ha confirmado este perfil de expresión en tejido humano mediante IHC (figuras 5A y 5B).

5 Se realizó la inmunohistoquímica (IHC) para ferroportina usando un método de tinción con inmunoperoxidasa libre de biotina (Immunohistochemical Staining Methods, 4ª ed., DAKO, 2006.); se usó tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. En resumen, se desparafinaron los portaobjetos en xileno, se hidrataron en grados ascendentes de alcohol con respecto a agua y se supercalentaron en tampón de recuperación de antígeno. Se usó una serie de etapas de bloqueo para eliminar peroxidasa endógena y receptores de Fc endógenos. 10 Entonces se incubaron los portaobjetos con el anticuerpo primario de ratón. Entonces se añadió un polímero de anticuerpo secundario conjugado con HRP y se reveló el color en DAB, un cromógeno marrón. Se contratificaron los portaobjetos en hematoxilina, de color azul, se deshidrataron, se aclararon y se cubrieron con un cubreobjetos.

15 Se han publicado datos adicionales que sugieren que se expresa ferroportina en regiones del SNC y placenta de mamíferos (Donovan *et al.*, citado anteriormente; Bastin *et al.*, Br. J. Haematol., 134:532-543, 2006); sin embargo, no se ha notificado aún una caracterización completa de la expresión de ferroportina en seres humanos usando un anticuerpo monoclonal. Un estudio preliminar usando 31A5 y un alineamiento de tejidos múltiples humanos Asterand sugiere que se expresa ferroportina en varios tejidos diferentes (tabla 3).

Tabla 3: Expresión de ferroportina tal como se evalúa mediante IHC usando 31A5 y un alineamiento de tejidos múltiples Asterand.

Tejido	Células
Corteza suprarrenal	Células corticales
	Células medulares
Cerebro	Astroцитos
	Neuronas
	Pericitos capilares
Hipófisis	Células de la pars distalis
	Células de la pars intermedia
Médula espinal	Axones
	Neuronas
Placenta	Sincitiotrofoblastos
	Células mononucleares intersticiales
Ganglio linfático	Células dendríticas en la corteza
	Macrófagos en la corteza, médula y seno subcapsular
Mama	Células mononucleares intersticiales
Trompa de Falopio	Células mononucleares intersticiales
Esófago	Células mononucleares intersticiales
Estómago	Células mononucleares intersticiales
Intestino delgado	Células mononucleares intersticiales
	Neuronas del plexo mesentérico
Colon	Células mononucleares intersticiales
Riñón	Células mononucleares intersticiales
Hígado	Células de Kupffer
Pulmón	Macrófagos alveolares/intersticiales
Próstata	Células mononucleares intersticiales
Piel	Células mononucleares intersticiales
Bazo	Macrófagos en la pulpa roja
Músculo esquelético estriado	Células mononucleares intersticiales
Testículos	Células mononucleares intersticiales
Uréter	Células mononucleares intersticiales
Cuello uterino	Células mononucleares intersticiales

* Las células mononucleares intersticiales pueden ser monocitos, macrófagos o células dendríticas.

20 Este ejemplo representa el primer análisis de la expresión realizado para ferroportina usando un anticuerpo monoclonal.

Lista de secuencias

<110> Arvedson *et al.*

5 <120> Anticuerpos frente a ferroportina y métodos de uso

<130> 01017/435658

<160> 137

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 336

15

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

gatgtttgtgc tgaccagac tccactcact ttgtcggcta ccattggaca accagcctcc 60

atctcttgta agtcaagtca gagcctotta catagtgatg gaatgacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgctgatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagaatag aggctgaaga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttcct 300

20

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 2

<211> 112

25

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 3
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 3
 caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcctc agtgaagctg 60
 tctgcaagg cttctggcta caccttcaca agctatggta tatcctgggt gaaacagaga 120
 actggacagg gcottgagtg gattggagag atttatccta gaagtggtaa tgcttactac 180
 aatgagaagt tcaaggtcaa ggccacactg actatagaca aatcctccag cacagcgtac 240
 atggaactcc gcagcctgac atctgaggat tctgcggtct atttctgtgg tggtactac 300
 tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tectca 336

15 <210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 4

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Gly Gly Asn Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

5 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

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

15 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6

20 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

25 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 7

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr
 1 5

atgatgagtc ctgcccagtt cctgtttctg ttagtgctct ggattcggga aaccaacggt 60
 gatgttgtgc tgaccagac tccactcact ttgtcggcta ccattggaca accagcctcc 120
 atctcttgta agtcaagtea gagcctctta catagtgatg gaatgacata tttgaattgg 180
 ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgctgatct atctgggtgc taaactggac 240
 tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 300
 agcagaatag aggctgaaga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttcct 360
 cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 420
 tccatcttcc caccatccag tgagcagta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 480
 ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 540
 caaatggcg tctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 600
 agcagcacc ccaagttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 660
 gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgt 717

<210> 12
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 12

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
 20 25 30

Ala Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu His Ser Asp Gly Met Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
 50 55 60

10

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
65 70 75 80

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp
165 170 175

Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys
195 200 205

Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys
210 215 220

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

<210> 13
<211> 1398
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

5

<400> 13

atggaatgga tctggatcct tctcttcatc ctgtcaggaa ctgcggtgt ccaatcccag 60
 gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg gcgaggcctg gggcctcagt gaagctgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac cttcacaagc tatggtatat cctgggtgaa acagagaact 180
 ggacagggcc ttgagtggat tggagagatt taccctagaa gtggtaatgc ttactacaat 240
 gagaagttca aggtcaaggc cacactgact atagacaaat cctccagcac agcgtacatg 300
 gaactccgca gctgacatc tgaggattct gcggtctatt tctgtggtgg taactactac 360
 tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcggctctat 420
 ccactggccc ctgtgtgtgg aggtacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc 480
 aagggttatt tcctgagcc agtgacctg acctggaact ctggatccct gtccagtgg 540
 gtgcacacct tcccagctct cctgcagtct ggctctaca ccctcagcag ctcaagtact 600
 gtaacctcga acacctggcc cagccagacc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc 660
 agcaccaaag tggacaagaa aattgagccc agagtgccca taacacagaa cccctgtcct 720
 ccactcaaag agtgtcccc atgocagct ccagacctct tgggtggacc atccgtcttc 780
 atottccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat ggtcacatgt 840
 gtggtggtgg atgtgagcga ggatgacca gacgtccaga tcagctgggt tgtgaacaac 900
 gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag tactctcgg 960
 gtggtcagtg cctccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc 1020
 aagggtcaaca acagagccct cccatcccc atcgagaaa ccatctcaa acccagaggg 1080
 ccagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag cagaagagat gactaagaaa 1140
 gagttcagtc tgacctgcat gatcacaggc ttcttacctg ccgaaattgc tgtggactgg 1200
 accagcaatg ggcgtacaga gcaaaactac aagaacaccg caacagtcct ggactctgat 1260
 ggttcttact tcatgtacag caagctcaga gtacaaaaga gcacttggga aagaggaagt 1320
 cttttgcct gctcagtggc ccacgagggt ctgcacaatc accttacgac taagaccatc 1380
 tcccggctctc tgggtaaa 1398

5 <210> 14
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 14

Met Glu Trp Ile Trp Ile Leu Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15

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

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

Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

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

Tyr Phe Cys Gly Gly Asn Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 115 120 125

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 130 135 140

Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 145 150 155 160

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu
 180 185 190

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Asn Thr Trp Pro Ser
 195 200 205

Gln Thr Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
 210 215 220

Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro
 225 230 235 240

Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 275 280 285

Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
 290 295 300

Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
 54

ES 2 500 066 T3

agctggctca gggcgtecgc taggctcgga cgacctgctg agcctoccaa accgcttcca	60
taaggctttg ctttccaact tcagctacag tgttagctaa gtttggaag aaggaaaaaa	120
gaaaatccct gggccccttt tcttttgctt tttgccaaag tcgtogttgt agtctttttg	180
cccaaggctg ttgtgttttt agaggtgcta tctccagttc cttgoactcc tgtaacaag	240
cacctcagcg agagcagcag cagcgatagc agccgcagaa gagccagcgg ggtcgctag	300
tgatcatgacc agggcgggag atcacaaccg ccagagagga tgctgtggat ccttgccga	360

ctacctgacc	tctgcaaaat	tccttctcta	ccttggtcat	tctctctcta	cttggggaga	420
tccgatgtgg	cactttgceg	tgtctgtggt	tctggtagag	ctctatggaa	acagcctcct	480
tttgacagca	gtctacgggc	tgggtggtgg	agggtctggt	ctggtcctgg	gagccatcat	540
cggtgactgg	gtggacaaga	atgctagact	taaagtggcc	cagacctcgc	tgggtgtaca	600
gaatgtttca	gtcatcctgt	gtggaatcat	cctgatgatg	gttttcttac	ataaacatga	660
gcttctgacc	atgtaccatg	gatgggttct	cacttctcgc	tatatcctga	tcatcactat	720
tgcaaatatt	gcaaatttgg	ccagtactgc	tactgcaatc	acaatccaaa	gggattggat	780
tgttgttgtt	gcaggagaag	acagaagcaa	actagcaaat	atgaatgcc	caatacgaag	840
gattgaccag	ttaaccaaca	tcttagcccc	catggctggt	ggccagatta	tgacatttgg	900
ctccccagtc	atcggctgtg	gctttatttc	gggatggaac	ttggtatcca	tgtgcgtgga	960
gtacgtcctg	ctctggaagg	tttaccagaa	aaccccagct	ctagctgtga	aagctggtct	1020
taaagaagag	gaaactgaat	tgaaacagct	gaatttacac	aaagatactg	agccaaaacc	1080
cctggagggg	actcatctaa	tgggtgtgaa	agactctaac	atccatgagc	ttgaacatga	1140
gcaagagcct	acttgtgcct	cccagatggc	tgagcccttc	cgtaccttcc	gagatggatg	1200
ggtctcctac	tacaaccagc	ctgtgttctt	ggctggcatg	ggtcttgctt	tcctttatat	1260
gactgtcctg	ggctttgact	gcatcaccac	agggtacgcc	tacactcagg	gactgagtgg	1320
ttccatcctc	agtattttga	tgggagcatc	agctataact	ggaataatgg	gaactgtagc	1380
ttttacttgg	ctacgtcgaa	aatgtggttt	ggttcggaca	ggtctgatct	caggattggc	1440
acagctttcc	tgtttgatct	tgtgtgtgat	ctctgtattc	atgcctggaa	gccccctgga	1500
cttgtccggt	tctccttttg	aagatatccg	atcaaggttc	attcaaggag	agtcaattac	1560
acctaccaag	atacctgaaa	ttacaactga	aatatacatg	tctaattgggt	ctaattctgc	1620
taatattgtc	ccggagacaa	gtcctgaatc	tgtgcccata	atctctgtca	gtctgctggt	1680
tgcaggcgtc	attgctgcta	gaatcggctc	ttggtccttt	gatttaactg	tgacacagtt	1740
gctgcaagaa	aatgtaattg	aatctgaaa	aggcattata	aatgggtgtac	agaactccat	1800
gaactatcct	cttgccttc	tgcatttcat	catggtcatc	ctggctccaa	atcctgaagc	1860
ttttggcttg	ctcgtattga	tttcagtctc	ctttgtggca	atgggccaca	ttatgtattt	1920
ccgatttgcc	caaaatactc	tgggaaacaa	gctctttgct	tgccgtcctg	atgcaaaaga	1980
agttaggaag	gaaaatcaag	caaatacatc	tgttgtttga	gacagtttaa	ctgttgctat	2040
cctgttacta	gatttatatg	agcacatgtg	cttattttgt	actgcagaat	tccaataaat	2100
ggctgggtgt	tttgcctctg	ttttaccaca	gctgtgcctt	gagaactaaa	agctgtttag	2160
gaaacctaa	tcagcagaaa	ttaactgatt	aatttccctt	atggtgaggc	atggaaaaaa	2220

aa

2222

5

<210> 16
<211> 571
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Met Thr Arg Ala Gly Asp His Asn Arg Gln Arg Gly Cys Cys Gly Ser
1 5 10 15

Leu Ala Asp Tyr Leu Thr Ser Ala Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Gly His
20 25 30

Ser Leu Ser Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp His Phe Ala Val Ser Val
35 40 45

Phe Leu Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr
50 55 60

Gly Leu Val Val Ala Gly Ser Val Leu Val Leu Gly Ala Ile Ile Gly
65 70 75 80

Asp Trp Val Asp Lys Asn Ala Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu
85 90 95

Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met
100 105 110

Val Phe Leu His Lys His Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val
115 120 125

Leu Thr Ser Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn
130 135 140

Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val
145 150 155 160

Val Val Ala Gly Glu Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asn Met Asn Ala Thr
165 170 175

Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val
180 185 190

Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile
195 200 205

Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Val Leu Leu Trp
 210 215 220

Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Gly Leu Lys
 225 230 235 240

Glu Glu Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Asn Leu His Lys Asp Thr Glu
 245 250 255

Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Val Lys Asp Ser Asn
 260 265 270

Ile His Glu Leu Glu His Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met
 275 280 285

Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn
 290 295 300

Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr
 305 310 315 320

Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly
 325 330 335

Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr
 340 345 350

Gly Ile Met Gly Thr Val Ala Phe Thr Trp Leu Arg Arg Lys Cys Gly
 355 360 365

Leu Val Arg Thr Gly Leu Ile Ser Gly Leu Ala Gln Leu Ser Cys Leu
 370 375 380

Ile Leu Cys Val Ile Ser Val Phe Met Pro Gly Ser Pro Leu Asp Leu
 385 390 395 400

Ser Val Ser Pro Phe Glu Asp Ile Arg Ser Arg Phe Ile Gln Gly Glu
 405 410 415

Ser Ile Thr Pro Thr Lys Ile Pro Glu Ile Thr Thr Glu Ile Tyr Met
 420 425 430

Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ala Asn Ile Val Pro Glu Thr Ser Pro Glu
 435 440 445

Ser Val Pro Ile Ile Ser Val Ser Leu Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala
 450 455 460

Ala Arg Ile Gly Leu Trp Ser Phe Asp Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu
 465 470 475 480

Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg Gly Ile Ile Asn Gly Val Gln
 485 490 495

Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu Leu His Phe Ile Met Val Ile
 500 505 510

Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly Leu Leu Val Leu Ile Ser Val
 515 520 525

Ser Phe Val Ala Met Gly His Ile Met Tyr Phe Arg Phe Ala Gln Asn
 530 535 540

Thr Leu Gly Asn Lys Leu Phe Ala Cys Gly Pro Asp Ala Lys Glu Val
 545 550 555 560

Arg Lys Glu Asn Gln Ala Asn Thr Ser Val Val
 565 570

- <210> 17
- <211> 3773
- <212> ADN
- <213> *Danio rerio*

5

<400> 17

acgagggtgcg agcgggctctg gccatttcgg gaattatatg tttttattca catagttggt 60
 ctagaaaggt tatttctctc cgacttcagc tacagtgata gctaagtttg gagaggagaa 120
 aagggagata ttcgtgattt ggcgaggaat atatttgcag cgaggattta ctttgcccga 180
 gccttacaaa ggagttcaaa tcccggcgag aaaaaaaciaa tcgataaaaa acgcacaatg 240
 gacagccctg catcaaagaa acctcgctgt gagaggttcc gcaattctt caagtctgca 300
 aaattcctca ttacgtcgg acatgccctc tcgacatggg gggatcggat gtggaatgtt 360
 gctgtggctg tgtttctggt ggagctgtat ggcaatagtt tactcctgac agccgtgtat 420
 ggactggtgg tcgcgggctc cgtgctctta ctgggcgcta ttattggtga ctgggttgac 480
 aaaaacocca gattgaaagt ggcacagacg tctttggttg tccagaacag tgctgtcatt 540
 ctctgtggtg cccttttgat ggctgttttc cagttcaaac aacagctttc tagcatgtat 600
 gatggatggt tgctgacaac atgctacata atggatcatc ccattgctaa tctcgctaac 660

10

ES 2 500 066 T3

ctggccagca cagctatgtc catcaccatc caaagagact gggttgtggt tgtggctgga 720
 gatgatcgga gcaaaattggc agatatgaat gcaactgtca gaataattga ccagttgacc 780
 aacattctgg caccgatgct tgtgggccag atcatggcat ttggctcaca cttcattggc 840
 tgtggtttta tctcgggctg gaacttgttc tccatgtgcc tggagtattt cctgctttgg 900
 aaagtttata agaaaactcc agcgcttgcc tttaaggcag gacagaagga tagcgatgac 960
 caagagctga aacacctcaa catacaaaaa gaaattggaa aactgaaaag cccggtcgaa 1020
 gcctcccaac tgatgactga aagctccgag cccaagaagg acaccggctg ctgctaccaa 1080
 atggcagagc ccatccgtac ctttaaagat ggctgggtag cctactacaa tcaatccatc 1140
 ttcttcgccc gcatgtctct ggctttccta tacatgaccg ttttgggctt cgactgcac 1200
 accacaggct atgcatacac tcagggcctg aatggctctg tgctcagtct cctcatggga 1260
 gcctcagctg tatctgggat ctgtgggaca gtggccttca cctggatccg aaagaagtgc 1320
 ggctcatca ggacgggctt cattgctgga gtcaccacg tgctcctgct cacgctgtgt 1380
 gtagcatctg tcttcgcccc tggtagccct ttcgatctca gcgtctcgcc cttcaaagag 1440
 gtcttaagac atctgtttgg agacagcggc tcgctgcgtg agagtcctac attcattcct 1500
 acaactgaac ccccgattca ggccaacgtc accgtttttg aggaagcccc cccagtagag 1560
 tcctacatgt ctgttgggct tctctttgcc ggtgttattg ctgctagagt tggcttttgg 1620
 tccttcgact tgaccgtgac ccaactgatc caagagaatg tgattgagtc cgagagagga 1680
 gtcaccaatg gcgccagaa ctccatgaat tatcttctcg atctcctgca cttcatcatg 1740
 gtcaccttg caccaaatcc tgaagccttt ggtcttcttg taatcatctc cgtttccttc 1800
 gtggctatgg gacatatgat gtatttcagg tttgcttata aaagccttgg aagccgactc 1860
 ttctgtttct gttcaccoga gcagaagcca gatcccaaca ttccctcact tccaaactct 1920
 gtatagcttt ttaaagagac cgtaggccat ttctacaaga gcgtggcttg ctgtgttctt 1980
 tcagaacctt gccaggatcc catctgtttt actaacatgc atgcttttgc tgcttgagtc 2040
 gctgtgcatt gagtaaatat cctctgcat aggctaaaaat aacaaagaga aggagctctt 2100
 cttagcatag catacttcac ttctcatatc atgttcaagg tgctgtaaaa atgccataga 2160
 agcaaccgta ggaggaaata tatacatgga aactacggtt ctatcatgct ttaatgactt 2220
 ttgtaagagc tccaaagcaa aaattagcat atttattcta cttttacgta ttatattgtt 2280
 tttttttttc aactttatgg tcgtagttaa ccttcagact ggttatgaca gttttgcaat 2340
 gtgctctact tatgatagt tagttttgta atgtttgtcc cttcttccaa gccttggtta 2400
 aagtctcttt aatagctatt aagagtgcgc tagttataca ttcaggtaag cctatataat 2460
 gcctatatat ttatatacac gtgtagtcag tattctttat ctcagcttcg gtggtgctac 2520

gttgtttcaa ctcltttggga aagccatgca ggcggtttat acatgtaacc aaagtggggtt 2580
 ttttttggca tcacgtggaa gtgagggaaat tgcogttttt ttatcgtggtt aaacattcca 2640
 tattattatt attaccgggtg tgatgatttc ttggagattt aggcgctgat aggcctccca 2700
 tcgcagcaag agatttttagc gctaggtatt tgtgctoctg tttgatttga aagtgatttt 2760
 cgcacataat tcttgttttt atttgcaaag attgttacac atgcacttta catgattaat 2820
 atacgttttc cattacgaaa caagcgcaac aagccctcag gtattacgat atttgcacaa 2880
 tacacaaaac ctgtcgccga agttcacggc caggcaggaa atctgatatt tttacatgca 2940
 aatttatttc aaaatgggat tttcaaagta cattaacctc aaacttcagc atttttacct 3000
 tcctatataa gacaccacac ctcatacgct aatctagatt ttctataata caaagtaaag 3060
 gttacagact gttctattag ctgagatgaa agccacaatc atagaagtac tactaacatc 3120
 cttttaaacc cacagctggc tcgacataga tatatagata tatatatatg aggtgtttta 3180
 taatagttgt gtaaatattga tgttggacac cagcgggaat ccaccatagc cacagaacag 3240
 agaagggatt attgagtcca gtgtgtgaaac ggctgggttg cagcgcagct ggttccaaac 3300
 acaggtgcca agtcacactt gacttgctaa gttagcgttt tctttaatgt gtgagaacta 3360
 ctctcatgagg cccaacgaa cacactgtca gtctttcatt gtgtcagctc ttctgtgaat 3420
 gtgaagcctt atttacatct gtaaaatatt tttttatatt cttatggtga ctagttttgt 3480
 ttcaatcggg tttatcctcc tttgtaaggc cacagatttc ccccttttag acaagagaag 3540
 taaacacatt tgcaataaat tgtactttcg acaccagtt gaatgtaaca gaagaaccta 3600
 gattattctt tatataagca tattgattct gttcatggtt ggtggcatat ttgcaataat 3660
 tgtggttcac actccatcgc agtgggagga ttatagaact ttagtcttgt attgtatctc 3720
 acttcgactg aaataaacag atttgtatct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3773

<210> 18
 <211> 562
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

5

<400> 18

Met Asp Ser Pro Ala Ser Lys Lys Pro Arg Cys Glu Arg Phe Arg Glu
 1 5 10 15

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

Thr Trp Gly Asp Arg Met Trp Asn Phe Ala Val Ala Val Phe Leu Val
 35 40 45

10

Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Leu Leu Leu Thr Ala Val Tyr Gly Leu Val
 50 55 60

Val Ala Gly Ser Val Leu Leu Leu Gly Ala Ile Ile Gly Asp Trp Val
 65 70 75 80

Asp Lys Asn Pro Arg Leu Lys Val Ala Gln Thr Ser Leu Val Val Gln
 85 90 95

Asn Ser Ala Val Ile Leu Cys Gly Ala Leu Leu Met Ala Val Phe Gln
 100 105 110

Phe Lys Gln Gln Leu Ser Ser Met Tyr Asp Gly Trp Leu Leu Thr Thr
 115 120 125

Cys Tyr Ile Met Val Ile Ser Ile Ala Asn Ile Ala Asn Leu Ala Ser
 130 135 140

Thr Ala Met Ser Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Val Val Val Val Ala
 145 150 155 160

Gly Asp Asp Arg Ser Lys Leu Ala Asp Met Asn Ala Thr Val Arg Ile
 165 170 175

Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Leu Val Gly Gln Ile
 180 185 190

Met Ala Phe Gly Ser His Phe Ile Gly Cys Gly Phe Ile Ser Gly Trp
 195 200 205

Asn Leu Phe Ser Met Cys Leu Glu Tyr Phe Leu Leu Trp Lys Val Tyr
 210 215 220

Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Phe Lys Ala Gly Gln Lys Asp Ser Asp
 225 230 235 240

Asp Gln Glu Leu Lys His Leu Asn Ile Gln Lys Glu Ile Gly Asn Thr
 245 250 255

Glu Ser Pro Val Glu Ala Ser Gln Leu Met Thr Glu Ser Ser Glu Pro
 260 265 270

Lys Lys Asp Thr Gly Cys Cys Tyr Gln Met Ala Glu Pro Ile Arg Thr
 275 280 285

Phe Lys Asp Gly Trp Val Ala Tyr Tyr Asn Gln Ser Ile Phe Phe Ala
 290 295 300

Gly Met Ser Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr Val Leu Gly Phe Asp Cys
 305 310 315 320

Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly Leu Asn Gly Ser Val Leu
 325 330 335

Ser Leu Leu Met Gly Ala Ser Ala Val Ser Gly Ile Cys Gly Thr Val
 340 345 350

Ala Phe Thr Trp Ile Arg Lys Lys Cys Gly Leu Ile Arg Thr Gly Phe
 355 360 365

Ile Ala Gly Val Thr Gln Leu Ser Cys Leu Thr Leu Cys Val Ala Ser
 370 375 380

Val Phe Ala Pro Gly Ser Pro Phe Asp Leu Ser Val Ser Pro Phe Lys
 385 390 395 400

Glu Val Leu Arg His Leu Phe Gly Asp Ser Gly Ser Leu Arg Glu Ser
 405 410 415

Pro Thr Phe Ile Pro Thr Thr Glu Pro Pro Ile Gln Ala Asn Val Thr
 420 425 430

Val Phe Glu Glu Ala Pro Pro Val Glu Ser Tyr Met Ser Val Gly Leu
 435 440 445

Leu Phe Ala Gly Val Ile Ala Ala Arg Val Gly Leu Trp Ser Phe Asp
 450 455 460

Leu Thr Val Thr Gln Leu Ile Gln Glu Asn Val Ile Glu Ser Glu Arg
 465 470 475 480

Gly Val Ile Asn Gly Val Gln Asn Ser Met Asn Tyr Leu Leu Asp Leu
 485 490 495

Leu His Phe Ile Met Val Ile Leu Ala Pro Asn Pro Glu Ala Phe Gly
 500 505 510

Leu Leu Val Ile Ile Ser Val Ser Phe Val Ala Met Gly His Met Met
 515 520 525

ES 2 500 066 T3

Tyr Phe Arg Phe Ala Tyr Lys Ser Leu Gly Ser Arg Leu Phe Leu Phe
530 535 540

Cys Ser Pro Glu Gln Lys Pro Asp Pro Asn Ile Pro Ser Leu Pro Asn
545 550 555 560

Ser Val

5 <210> 19
<211> 2130
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 19

agagcaggct gggggctctc tgogggccgg ggatcctcca acccgctccc ataaggcttt	60
ggctttccaa ctlcagctac agtgttagct aagtttggaa agaagacaaa aagaagaccc	120
cgtgacagct ttgctgttgt tgtttgccct agttgtcctt tggggctctt cggcataagg	180
ctgttggtct tatactgggtg ctatcttcgg ttccctctcac tccgtgtgaac aagctcccgg	240
gcaagagcag ctaaagctac cagcatcaga acaaacaagg ggagaacgcc tgggtgtoatg	300
accaaggcaa gagatcaaac ccatcaggaa ggatgctgtg gatccttagc aaactacctg	360
acctcagcaa aattcctcct ctaccttggc cactctctct ccaactgggg ggatcggatg	420
tggcactttg cagtgtctgt gtttctgggt gaactctatg gaaacagcct tctcttgaca	480
gctgtctatg gactgggtgt ggcaggctct gttctggctc tgggagccat cattgggtgac	540
tgggtggata agaatgccag acttaaagtg gccagacgt cactgggtgt tcagaatgtg	600
tccgtcatcc tctgoggaat catcctgatg atggtttcc tacacaagaa tgagctcctg	660
accatgtacc atggatgggt ccttactgtc tgctacatcc tgatcatcac tattgcaaac	720
attgcaaatt tggccagtac tgccactgcg atcacaatcc aaagggactg gattgttgtt	780
gtggcaggag aaaacaggag cagattagca gacatgaatg ctaccattag aaggattgac	840
cagctaacca acatcctggc ccccatggct gtcggccaga ttatgacatt tggttctcca	900
gtcattggct gtggttttat ttccggttgg aatttgggtg ccatgtgtgt ggagtacttc	960
ttgctctgga aggtttacca gaagaccctt gctctggctg taaaagctgc tctcaaggta	1020
gaggagtcag aactgaagca gctgacctca cctaaagata ctgagccaaa acctttggag	1080
ggaactcatc taatgggtga gaaagactcc aacatccgtg aacttgaatg tgaacaagag	1140
cccacctgtg cctcccagat ggagagccc ttccgcactt tccgagatgg atgggtctcc	1200
tactataacc agccagtgtt tctggctggc atgggcctgg ctttctctta tatgacagtc	1260
ctgggctttg actgtatcac tacaggttac gcctaacctc aggggctgag tggatccatc	1320

cttagtattt tgatgggagc atcagcaata actggaataa tgggaactgt ggccttcacc 1380
 tggctacgtc gaaaatgtgg ccttgttcgg actgggtctat totcaggact agcccagctt 1440
 tcctgtttta tcttgtgtgt gatctccgta ttcattgctg gaagcccctt ggacctgtct 1500
 gtttctccat ttgaagatat ccgttctagg tttgtgaatg tggagccagt gtcccact 1560
 accaaaatac ctgagaccgt ctttacaaca gaaatgcata tgtccaacat gtctaattgc 1620
 catgagatga gtactaaacc catcccata gtctctgtca gcctgctgtt tgcaggagtc 1680
 attgctgcta gaatcggctt ttggtccttt gatttgacgg tgacacagtt gctgcaagaa 1740
 aatgtaattg aatctgaaag aggcattatc aatgggtgtgc agaactccat gaactacctt 1800
 cttgaccttc tgcatttcat catggctcgc ttggccccaa atcctgaagc ttttggcttg 1860
 ctggtattga tttcagtctc ctttgtggca atgggacatc ttatgtattt ccgatttgcc 1920
 cagaagactc tgggcaacca gatttttgtt tgtggctctg atgaaaaaga agttacagat 1980
 gaaaatcaac cgaatacatc tgttgataa aaatagttta gctgtggccc ctgttactag 2040
 attgtggaga gcatgtgtgc ttattttgta ctgcagaatc ccaataaatg cctgcatttc 2100
 tctccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2130

<210> 20
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 20

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

10

Val Val Gln Asn Val Ser Val Ile Leu Cys Gly Ile Ile Leu Met Met
 100 105 110
 Val Phe Leu His Lys Asn Glu Leu Leu Thr Met Tyr His Gly Trp Val
 115 120 125
 Leu Thr Val Cys Tyr Ile Leu Ile Ile Thr Ile Ala Asn Ile Ala Asn
 130 135 140
 Leu Ala Ser Thr Ala Thr Ala Ile Thr Ile Gln Arg Asp Trp Ile Val
 145 150 155 160
 Val Val Ala Gly Glu Asn Arg Ser Arg Leu Ala Asp Met Asn Ala Thr
 165 170 175
 Ile Arg Arg Ile Asp Gln Leu Thr Asn Ile Leu Ala Pro Met Ala Val
 180 185 190
 Gly Gln Ile Met Thr Phe Gly Ser Pro Val Ile Gly Cys Gly Phe Ile
 195 200 205
 Ser Gly Trp Asn Leu Val Ser Met Cys Val Glu Tyr Phe Leu Leu Trp
 210 215 220
 Lys Val Tyr Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ala Val Lys Ala Ala Leu Lys
 225 230 235 240
 Val Glu Glu Ser Glu Leu Lys Gln Leu Thr Ser Pro Lys Asp Thr Glu
 245 250 255
 Pro Lys Pro Leu Glu Gly Thr His Leu Met Gly Glu Lys Asp Ser Asn
 260 265 270
 Ile Arg Glu Leu Glu Cys Glu Gln Glu Pro Thr Cys Ala Ser Gln Met
 275 280 285
 Ala Glu Pro Phe Arg Thr Phe Arg Asp Gly Trp Val Ser Tyr Tyr Asn
 290 295 300
 Gln Pro Val Phe Leu Ala Gly Met Gly Leu Ala Phe Leu Tyr Met Thr
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Phe Asp Cys Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Tyr Thr Gln Gly
 325 330 335
 Leu Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ile Leu Met Gly Ala Ser Ala Ile Thr

			340					345						350			
Gly	Ile	Met	Gly	Thr	Val	Ala	Phe	Thr	Trp	Leu	Arg	Arg	Lys	Cys	Gly		
		355					360					365					
Leu	Val	Arg	Thr	Gly	Leu	Phe	Ser	Gly	Leu	Ala	Gln	Leu	Ser	Cys	Leu		
	370					375					380						
Ile	Leu	Cys	Val	Ile	Ser	Val	Phe	Met	Pro	Gly	Ser	Pro	Leu	Asp	Leu		
385					390					395					400		
Ser	Val	Ser	Pro	Phe	Glu	Asp	Ile	Arg	Ser	Arg	Phe	Val	Asn	Val	Glu		
				405					410					415			
Pro	Val	Ser	Pro	Thr	Thr	Lys	Ile	Pro	Glu	Thr	Val	Phe	Thr	Thr	Glu		
			420					425					430				
Met	His	Met	Ser	Asn	Met	Ser	Asn	Val	His	Glu	Met	Ser	Thr	Lys	Pro		
		435					440					445					
Ile	Pro	Ile	Val	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Ala		
	450					455					460						
Arg	Ile	Gly	Leu	Trp	Ser	Phe	Asp	Leu	Thr	Val	Thr	Gln	Leu	Leu	Gln		
465					470					475					480		
Glu	Asn	Val	Ile	Glu	Ser	Glu	Arg	Gly	Ile	Ile	Asn	Gly	Val	Gln	Asn		
				485					490					495			
Ser	Met	Asn	Tyr	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	His	Phe	Ile	Met	Val	Ile	Leu		
			500					505					510				
Ala	Pro	Asn	Pro	Glu	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Ile	Ser	Val	Ser		
		515					520					525					
Phe	Val	Ala	Met	Gly	His	Leu	Met	Tyr	Phe	Arg	Phe	Ala	Gln	Lys	Thr		
	530					535					540						
Leu	Gly	Asn	Gln	Ile	Phe	Val	Cys	Gly	Pro	Asp	Glu	Lys	Glu	Val	Thr		
545					550					555					560		
Asp	Glu	Asn	Gln	Pro	Asn	Thr	Ser	Val	Val								
				565					570								

<211> 193
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 21

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

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 22
 <211> 193
 <212> PRT

5

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

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

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 23
 <211> 301
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 23
 10
 tcggccccgc ctctgccac cgcagattgg ccgctagccc tccccgagcg ccttgccccc 60
 gagggccggc gcaccataaa agaagccgcc ctagccacgt cccctcgcag ttcgggcggtc 120
 ccgcggtgtc gtctcttgc tcaacagtgt ttggacggaa cagatccggg gactctcttc 180
 cagcctccga ccgcctccg atttctctc cgcttgcaac ctccgggacc atcttctcgg 240
 ccatctctg cttctgggac ctgccagcac cgtttttgtg gttagctcct tcttgccaac 300
 c 301
 <210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 20
 <400> 24
 Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10
 25
 <210> 25
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 25
 tcctatgagt tgacacagcc accctcgggtg tcagtgtccc ctggacagac ggccaggatc 60
 acctgctctg gagatgaatt gccaaagcaa tatgcttatt ggtaccagca gaaggcaggc 120
 caggccccctg taatgggtgat tcataaagac agtgagaggg cctcagggat ccttgagcga 180
 ttctctggct ccagcgcagg gacaattgtc acgttgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240
 gacgaggctg actattactg tcaatcacca gacagcagac gtactgtgat attcggcgga 300
 gggaccaagc tgaccgtcct a 321
 35
 <210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 26

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ala Pro Val Met Val Ile His
 35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ala Gly Thr Ile Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Pro Asp Ser Arg Arg Thr Val
 85 90 95

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

5 <210> 27
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 27

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt ggctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaggg ggctggagtg ggtggcagtt atatggcctg atggaactaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa caaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attaactgtgc gagaggggga 300
 gcaacagcag ttttcggtat gaacgtctgg ggccaagggga ccacggtcac cgtctctagt 360

15 <210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Ala Thr Ala Val Phe Gly Met Asn Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 29
 Ser Gly Asp Glu Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr
 1 5 10

15 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 30
 Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

25 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

Gln Ser Pro Asp Ser Arg Arg Thr Val Ile
 1 5 10

5 <210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 32

10 Gly Tyr Gly Met His
 1 5

15 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33

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

20 Gly
 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 34

30 Gly Gly Ala Thr Ala Val Phe Gly Met Asn Val
 1 5 10

35 <210> 35
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggtea gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt gggacagggg cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggt tatttctgca tgcaagctac acaatttccg 300
 tggacgttcg gcccaaggac caaggtggaa atcaaa 336

40 <210> 36
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

5

<210> 37
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 37

caggtgcagt tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggata caccctcacc ggctactaca tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc aactggtgg caaaaactat 180
 gcacagaggt ttcagggcag ggtcaccctg accagggaca cgcccgtaa cacggcctac 240
 atggagctga acaccttgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagagatcct 300
 agtctagtag tgactgggcc ttccttctac tactacggtt tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacggtca ccgtctctag t 381

15

<210> 38
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 38

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Pro Ser Leu Val Val Thr Gly Pro Ser Phe Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

5 <210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 39
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

15 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 40
 Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 20 1 5

25 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5

5 <210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 42
 Gly Tyr Tyr Met His
 1 5

15 <210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 43

Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 1 5 10 15

20 Gly
 <210> 44
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44

Asp Pro Ser Leu Val Val Thr Gly Pro Ser Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu
 1 5 10 15

30 Asp Val
 <210> 45
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 45

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggcca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gctccaaga ctctagttt ataagatttc taaccggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac attgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccg 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

40 <210> 46

<211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 46

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 47
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 47

caggtgcagt tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60
 tcctgtaagg cttctggata caccctcacc ggctactaca tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc aactggtgg caaaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccctg accagggaca cgtccatcaa cacagcctac 240
 atggagctga acaccttgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcct 300
 agtatagcag tggctgggcc ttccttctac tactacggtt tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacggtca cgtctctag t 381

20 <210> 48
 <211> 127

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 48

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

10 <210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 49

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

20 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

25 Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 51

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 51

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5

10 <210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 52

Gly Tyr Tyr Met His
 1 5

20 <210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

25 Gly

30 <210> 54
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

Asp Pro Ser Ile Ala Val Ala Gly Pro Ser Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu
 1 5 10 15

35 Asp Val

40 <210> 55
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 55

gatattgtga tgaccacagac tccactctcc tcacctgtca cccatgggtca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagatttc taaccgggtg 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt gggacaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgcgggggtt tatgtctgca tgcaagctac acaatttccg 300
 tggacgttcg gcccaaggac caaggtggaa atcaaaa 336

<210> 56
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 56

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

10

<210> 57
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 57

caggtgcagt tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60
 tcttgaagg cttctggata caccctcacc ggctactaca tgcactgggt gcgccaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc aactgggtgg caaaaactat 180
 gccagaagt ttcagggcag ggtcaccctg accagggaca cgtccatcaa cacggcctac 240
 atggaactga acacottgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgagatcct 300
 agtctagtag tgactgggcc ttccttctac tactacggtt tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacgggtca ccgtctctag t 381

<210> 58
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 58

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

<210> 59
 <211> 16
 <212> PRT

15

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

5 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

Lys Ile Ser Asn Arg Leu Ser

1 5

15

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 61

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

25

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

Gly Tyr Tyr Met His

1 5

35

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 64

45 <211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

50

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

Glu

5 <210> 67
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 67

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtacagc ctgggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacttttagc agctttgccg tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attggtggta gtggtaggaa cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtac 240
 ctgcaaatga gcagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagagggg 300
 gctatggctc ggctccgag gggtttggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
 tctagt 366

10
 15 <210> 68
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 68

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Phe
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Glu Gly Ala Met Ala Arg Pro Pro Arg Gly Leu Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 69

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

15 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 70

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccgggtc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttccg 300
 tggacgttcg gcccaaggac caaggtggaa atcaaa 336

5 <210> 76
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 76
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10
 15 <210> 77
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 77

cagggtgcagt tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccctcacc ggctactaca tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc aactgggtgg caaaaactat 180
 ggacagaagt ttcagggcag ggtcaccctg accagggaca cgtccatcaa cacagcctac 240
 atggagctga acagcttgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcct 300
 agtatatcag tggctgggcc ttccttctac tacttcggtt tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacggtea ccgtctctag t 381

5 <210> 78
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 78

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

15 <210> 79
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 79

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

5 <210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 80

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

15 <210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 81

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5

25 <210> 82
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 82

30 Gly Tyr Tyr Met His
 1 5

35 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 83

Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Gly Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

40 Gly
 <210> 84
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 84

Asp Pro Ser Ile Ser Val Ala Gly Pro Ser Phe Tyr Tyr Phe Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 85
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 85
 gatattgtga tgaccagac tocattctct tcacctgtca cccttgaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctogta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccoggttc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagggg cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggt tattttotgca tgcaagetac acaatttctc 300
 tggacgttcg gcccaaggac caaggtggaa atcaaa 336

10 <210> 86
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 86
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

20 <210> 87
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 87

```

caggtgcagt tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ccggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccctcacc ggctactatc tgcactgggt ggcacaggcc      120
cctggacaag agottgagtg gatgggatgg atcaaccctt tcaactgggtc cacagactat      180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg acccgggaca cgtccatcaa tacagcccac      240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagacccc      300
tctctacaaa attcctacca ttactacgtc atggacgttt ggggccaaagg gaccacggtc      360
accgtctcta gt                                                                372

```

5

<210> 88

<211> 124

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 88

```

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

```

15

<210> 89

<211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 89

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

10 <210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 90

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

20 <210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 91

25 Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5

30 <210> 92
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 92

35 Gly Tyr Tyr Leu His
 1 5

40 <210> 93
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 93

Trp Ile Asn Pro Phe Thr Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

45 <210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 94

Asp Pro Ser Leu Gln Asn Ser Tyr His Tyr Tyr Val Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 95
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5
 <400> 95
 gatgttgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggtca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagatttc taaccgattc 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggt tattactgca tgcaagctac acaatttccg 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaaa 336

<210> 96
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10
 <400> 96
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 97
 <211> 381
 <212> ADN

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 97

5 caggtgcagt tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggata caccctcacc ggctactaca tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc aactgggtgg caaaaactat 180
 gcccagaagt ttcagggcag ggtcacctg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga acagcttgag atctgacgac acggcogtgt attactgtgc gagagatcct 300
 agtttatcag tgactgggcc ttccttctac tactacggtt tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacggtea ccgtctctag t 381

<210> 98

<211> 127

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 98

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Ser Leu Ser Val Thr Gly Pro Ser Phe Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

15

<210> 99
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 99
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15
 10
 <210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 100
 Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 20
 <210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 101
 Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5
 30
 <210> 102
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 102
 Gly Tyr Tyr Met His
 35 1 5
 40
 <210> 103
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 103
 Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 45
 Gly
 <210> 104
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 104

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

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

Val Asp Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Arg Gly Pro Arg Phe Val Met
 35 40 45

Arg Val Gly Thr Gly Gly Ile Val Gly Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro
 50 55 60

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

Lys Asn Ile Gln Glu Glu Asp Glu Ser Asp Tyr His Cys Gly Ala Asp
 85 90 95

His Ala Ser Gly Asn Asn Phe Val Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys
 100 105 110

Val Thr Val Leu
 115

<210> 107
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 107

gaagtgcagg tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagcg tgaactgggt cgcaccaggct 120
 ccagggaagg gcctggagtg ggtctcatac attagtggta gtagtagtac cgtacactac 180
 gcagactctg tgaagggcgc attcaccatt tccagagaca ctgccaagaa ttcagtgtat 240
 ctgcaactga acagcctgag agacgaggac acggctctgt attactgtgc gagatgggga 300
 actcgtcagg gccactactt cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
 tctagt 366

10

<210> 108
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 108

Glu Val Gln Val 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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 109
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 109
 Thr Leu Ser Ser Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Val Asp
 1 5 10

15 <210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 110
 Val Gly Thr Gly Gly Ile Val Gly Ser Lys Gly Asp
 1 5 10

<210> 111
 <211> 13

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 111
 5 Gly Ala Asp His Ala Ser Gly Asn Asn Phe Val Tyr Val
 1 5 10
 <210> 112
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 112
 Ser Tyr Ser Val Asn
 1 5
 15
 <210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 113
 Tyr Ile Ser Gly Ser Ser Ser Thr Val His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25
 <210> 114
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 114
 Trp Gly Thr Arg Gln Gly His Tyr Phe Gly Met Asp Val
 1 5 10
 35 <210> 115
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) . . (3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 45 <400> 115
 Gly Tyr Xaa Met His
 1 5
 50 <210> 116
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) . . (4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <400> 116

10 Gly Tyr Tyr Xaa His
 1 5

15 <210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) . . (12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) . . (14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 <400> 117

Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Xaa Gln Xaa Phe Gln
 1 5 10 15

30 Gly
 <210> 118
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) . . (5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) . . (7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) . . (14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

50 <400> 118

Asp Pro Ser Xaa Xaa Val Xaa Gly Pro Ser Phe Tyr Tyr Xaa Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Val

5 <210> 119
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) . . (6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<400> 119

15 Lys Ile Ser Asn Arg Xaa Ser
 1 5

20 <210> 120
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 120

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 420
 gaggtccat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 121
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 121

5

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

5 <210> 122
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 122

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcoct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
 tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttogg cacccagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aaatgttgtg tcgagtgcc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtgggtggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggtg cgtggacggc 480
 gtggagggtg ataatgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tctcacctg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaoccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccattgct ggactccgac 840
 ggtctcttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tccctgtctc cgggtaaa 978

10

<210> 123
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 123

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 124
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 124

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcata ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctggttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120
 tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

10

<210> 125
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

5 <210> 126
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 126
 ggtcagccca aggcccaacc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa 60
 gcccaacaagg ccacactagt gtgtctgac agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg 120
 gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180
 cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240
 tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
 gccctacag aatgttca 318

15 <210> 127
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 127

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

5 <210> 128
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 128

ggtcagccca aggetgcccc ctcggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagettcaa 60

gcccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120

gcttggaagg cagatagcag cccogtcaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180

caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240

tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300

gcccctacag aatgttca 318

10 <210> 129
 <211> 106
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 126

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

5 <210> 130
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 130

10 ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccac cctcctctga ggagcttcaa 60
 gccacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
 gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
 caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
 toccacaaaa gctacagctg ccaggtcacg catgaagggg gcaccgtgga gaagacagtg 300
 gccctacag aatgttca 318

15 <210> 131
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 131

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

5 <210> 132
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 132

ggtcagccca aggctgcccc atcgggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa 60
 gccacaagg ccacactggt gtgcctgatc agtgacttct acccgggagc tgtgaaagtg 120
 gcctggaagg cagatggcag ccccgtaaac acgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
 10 cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
 tcccacagaa gctacagctg ccagggtcag catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
 gccctgcag aatgtgca 318

15 <210> 133
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 133

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

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

Val Asn Thr Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ala
 100 105

<210> 134
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 134

ggtcagccca aggetgcccc ctcggtcact ctgttcccac cctcctctga ggagcttcaa 60
 gccacaagg ccacactggt gtgtctcgta agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
 gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gtgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180
 caaagcaaca acaagtatgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240
 tcccacagaa gctacagctg ccgggtcagc catgaagggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
 gccctgcag aatgctct 318

10

<210> 135
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 135

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Val Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Arg Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 100 105

5 <210> 136
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (12)
 <223> en la que X es A, G, K, R, cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos;

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> en la que X es A, G, K, R, cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos;

<400> 136

Trp Ile Asn Pro His Thr Gly Gly Lys Asn Tyr Xaa Gln Xaa Phe Gln
 1 5 10 15

20 Gly

25 <210> 137
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature

<222> (4) .. (5)

<223> en la que X es A, F, I, L, V, S, T, Y, cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos;

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 <223> en la que X es A, F, I, L, V, S, T, Y, cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos;

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (14)
 <223> en la que X es A, F, I, L, V, S, T, Y, cualquier combinación de los mismos, o sustitución conservativa de los mismos;

15 <400> 137

Asp Pro Ser Xaa Xaa Val Xaa Gly Pro Ser Phe Tyr Tyr Xaa Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Val

20

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 5-10.
- 5 2. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 29-34.
3. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 39-44.
4. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 49-54.
- 10 5. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 59-64.
6. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 69-74.
- 15 7. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 79-84.
8. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 89-94.
9. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 99-104.
- 20 10. Anticuerpo aislado que se une a un dominio extracelular de ferroportina, en el que dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NO: 109-114.
11. Anticuerpo monoclonal aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende los aminoácidos 18-466 de SEQ ID NO: 14 y la cadena ligera comprende los aminoácidos 21-239 de SEQ ID NO: 12.
- 25 12. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4.
13. Anticuerpo según la reivindicación 2, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y 28.
14. Anticuerpo según la reivindicación 3, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y 38.
- 30 15. Anticuerpo según la reivindicación 4, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 y 48.
16. Anticuerpo según la reivindicación 5, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y 58.
- 35 17. Anticuerpo según la reivindicación 6, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y 68.
18. Anticuerpo según la reivindicación 7, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y 78.
19. Anticuerpo según la reivindicación 8, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 y 88.
- 40 20. Anticuerpo según la reivindicación 9, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 96 y 98.
21. Anticuerpo según la reivindicación 10, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 106 y 108.
22. Ácido nucleico que codifica para el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21.
- 45 23. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 22.
24. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 23 o el ácido nucleico según la

- reivindicación 22.
25. Método para producir un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende
- (a) administrar a un mamífero no humano un ácido nucleico que codifica para ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, opcionalmente
- 5 (b) administrar a dicho mamífero no humano un ácido nucleico igual o diferente que codifica para ferroportina tal como se expone en SEQ ID NO: 16, opcionalmente
- (c) administrar a dicho mamífero no humano una composición que comprende membrana celular que expresa ferroportina, y
- (d) obtener células que expresan el anticuerpo a partir de dicho mamífero no humano.
- 10 26. Método de producción de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 20 de manera que el ácido nucleico se exprese para producir el anticuerpo.
27. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21 y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 28. Método para detectar la presencia de ferroportina en una muestra que comprende incubar la muestra con al menos uno de los anticuerpos monoclonales según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en condiciones que permiten la unión del anticuerpo monoclonal a ferroportina; y detectar el anticuerpo monoclonal unido o la ferroportina unida.
- 20 29. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto que tiene un trastorno de la homeostasis del hierro, en el que el trastorno de la homeostasis del hierro se selecciona del grupo que consiste en anemia, septicemia, anemia de inflamación, anemia de cáncer, anemia inducida por quimioterapia, anemia inflamatoria crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, trastorno renal en fase avanzada, enfermedad renal crónica (estadio I, II, III, IV o V), anemia por deficiencia de hierro, enfermedad de ferroportina, hemocromatosis, diabetes, inflamación, artritis reumatoide, arteriosclerosis, tumores, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, hemoglobinopatías y trastornos de los glóbulos rojos.
- 25 30. Cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno de la homeostasis del hierro, en el que el trastorno de la homeostasis del hierro se selecciona del grupo que consiste en anemia, septicemia, anemia de inflamación, anemia de cáncer, anemia inducida por quimioterapia, anemia inflamatoria crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, trastorno renal en fase avanzada, enfermedad renal crónica (estadio I, II, III, IV o V), anemia por deficiencia de hierro, enfermedad de ferroportina, hemocromatosis, diabetes, inflamación, artritis reumatoide, arteriosclerosis, tumores, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, hemoglobinopatías y trastornos de los glóbulos rojos.
- 30 31. Método de selección de un régimen de tratamiento para un sujeto que necesita tratamiento que comprende:
- (a) examinar *in vitro* una muestra biológica obtenida a partir de dicho sujeto para determinar una disminución del nivel de hierro circulante;
- (b) prescribir a dicho sujeto un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-21.
- 35 32. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21 y estimulador de la eritropoyesis en cantidades terapéuticamente eficaces para su uso en una terapia de combinación para el tratamiento de un trastorno de la homeostasis del hierro en un sujeto que necesita tal tratamiento, en el que el trastorno de la homeostasis del hierro se selecciona del grupo que consiste en anemia, septicemia, anemia de inflamación, anemia de cáncer, anemia inducida por quimioterapia, anemia inflamatoria crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, trastorno renal en fase avanzada, enfermedad renal crónica (estadio I, II, III, IV o V), anemia por deficiencia de hierro, enfermedad de ferroportina, hemocromatosis, diabetes, inflamación, artritis reumatoide, arteriosclerosis, tumores, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, hemoglobinopatías y trastornos de los glóbulos rojos.
- 40 45 33. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21 y anticuerpo anti-hepcidina en cantidades terapéuticamente eficaces para su uso en una terapia de combinación para el tratamiento de un trastorno de la homeostasis del hierro en un sujeto que lo necesita, en el que el trastorno de la homeostasis del hierro se selecciona del grupo que consiste en anemia, septicemia, anemia de inflamación, anemia de cáncer, anemia inducida por quimioterapia, anemia inflamatoria crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, trastorno renal en fase avanzada, enfermedad renal crónica (estadio I, II, III, IV o V), anemia por deficiencia de hierro, enfermedad de ferroportina, hemocromatosis, diabetes, inflamación, artritis reumatoide, arteriosclerosis,
- 50

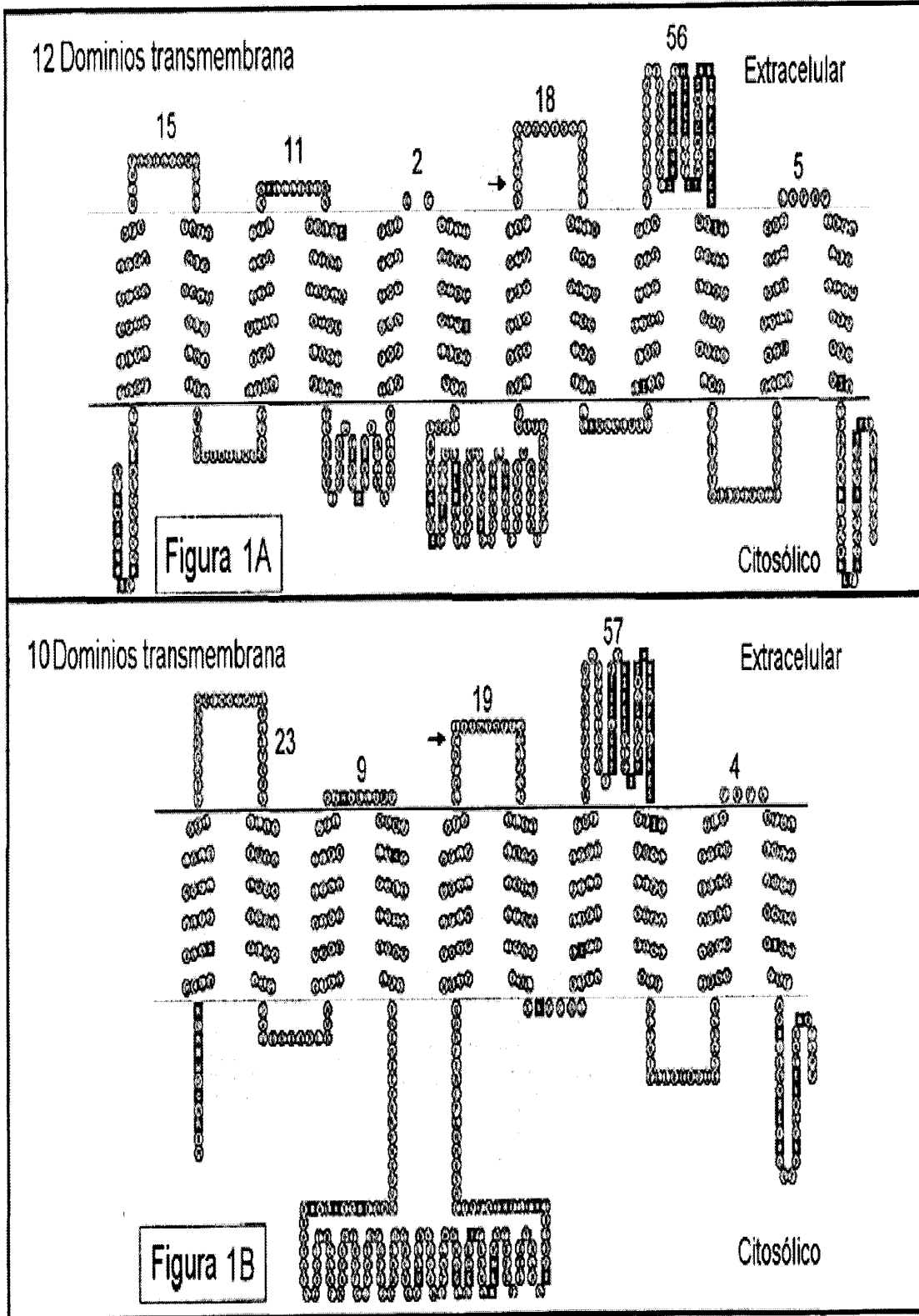
tumores, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, hemoglobinopatías y trastornos de los glóbulos rojos.

34. Uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto que es hiposensible a la terapia con un estimulador de la eritropoyetina.

5 35. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, para su uso en el tratamiento de un sujeto que es hiposensible a la terapia con un estimulador de la eritropoyetina.

36. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21 y quelante del hierro en cantidades terapéuticamente eficaces para su uso en una terapia de combinación para el tratamiento de sobrecarga de hierro en un sujeto que necesita tal tratamiento.

10



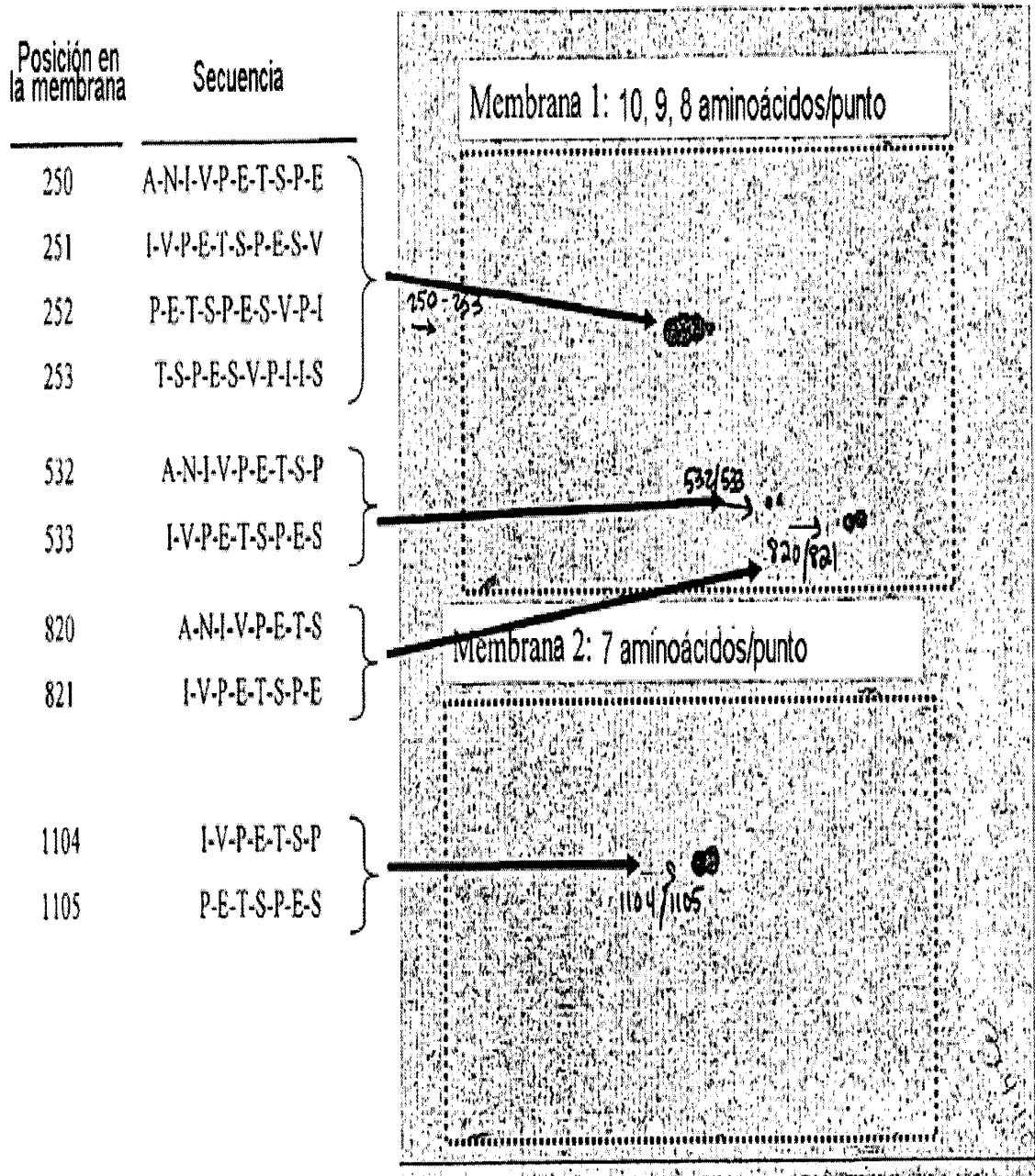
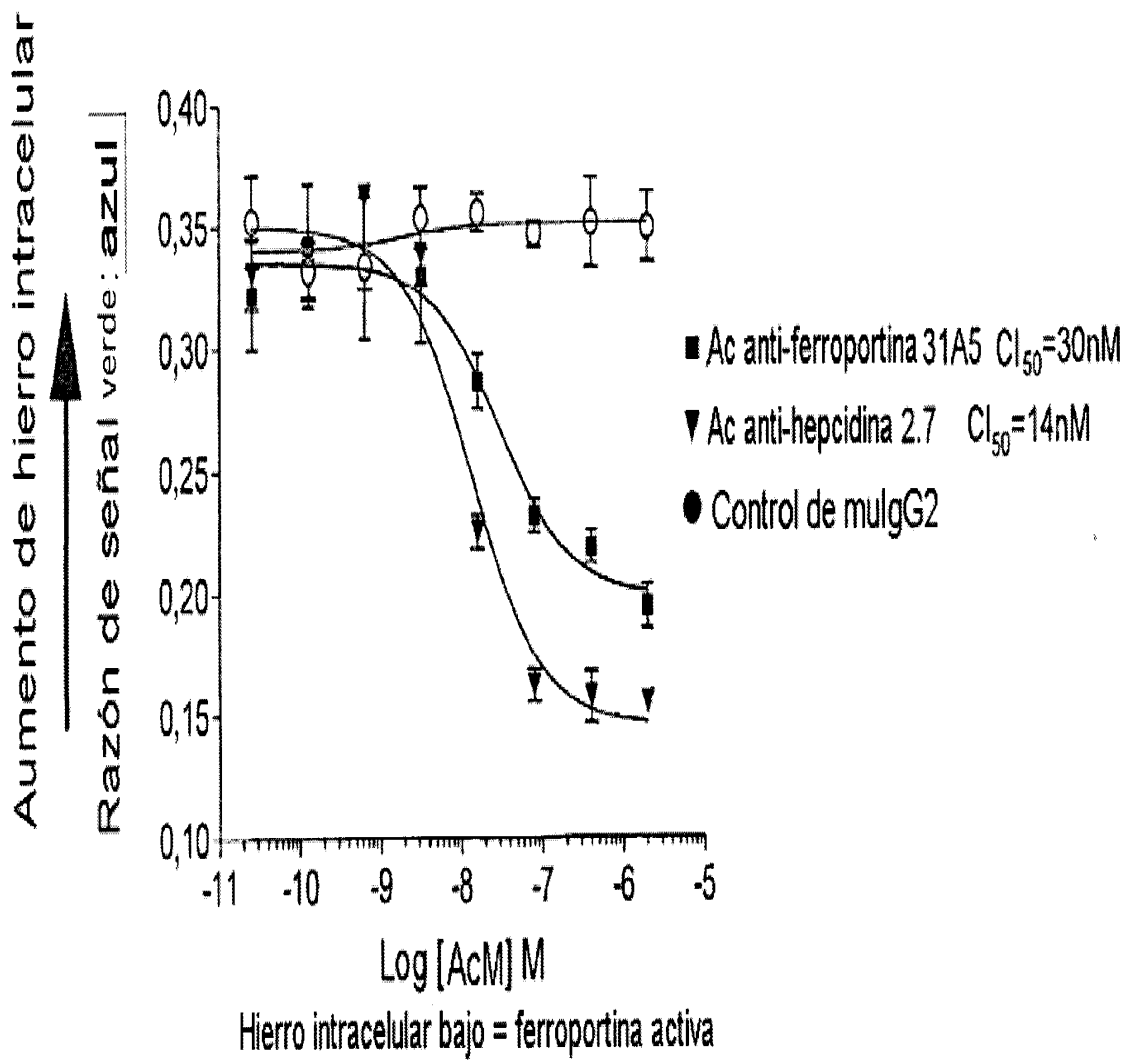


Figura 2

Figura 3



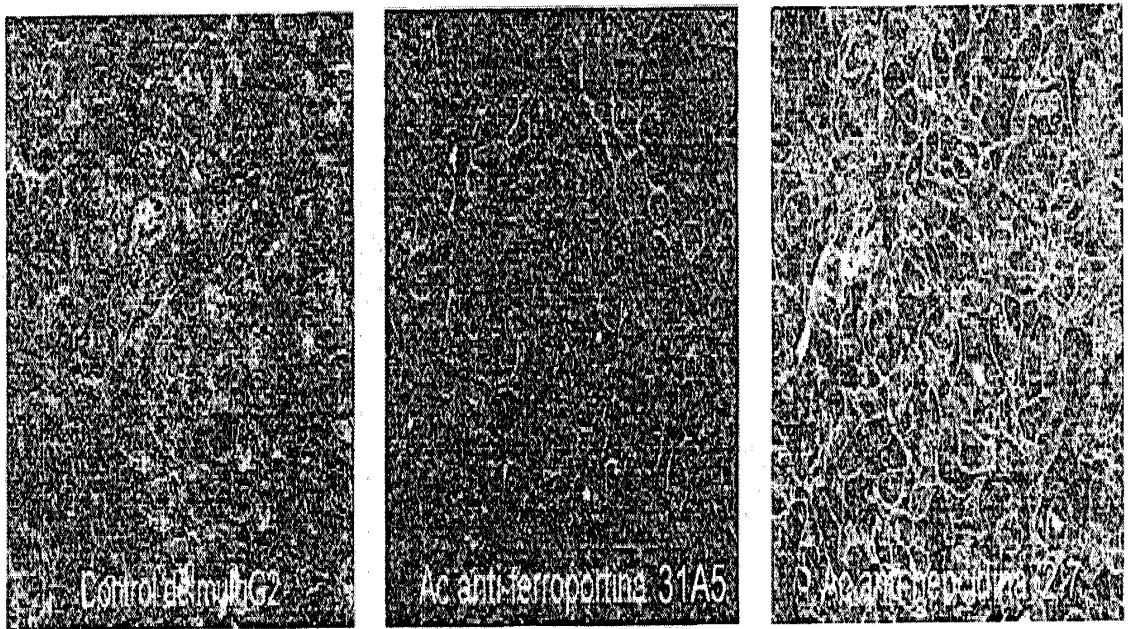


Figura: 4A

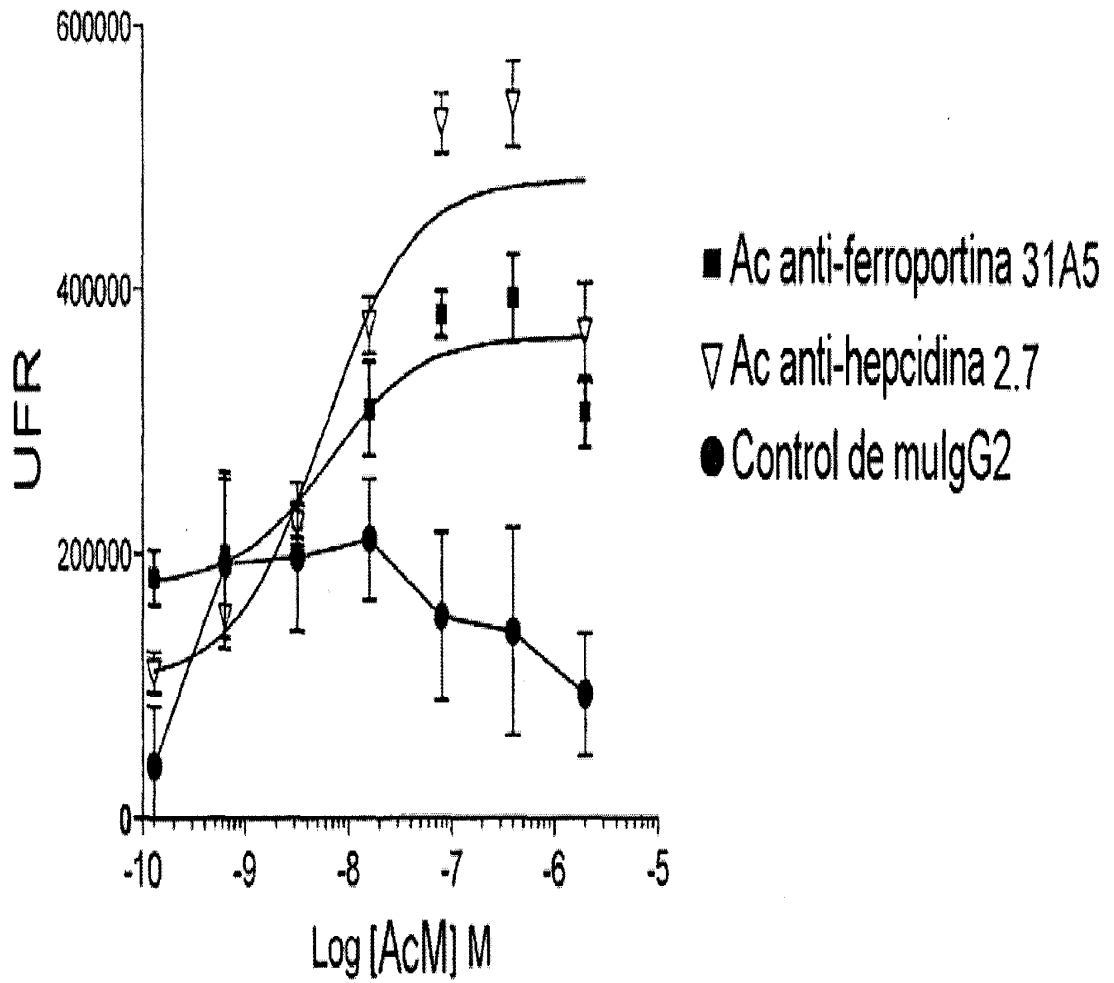
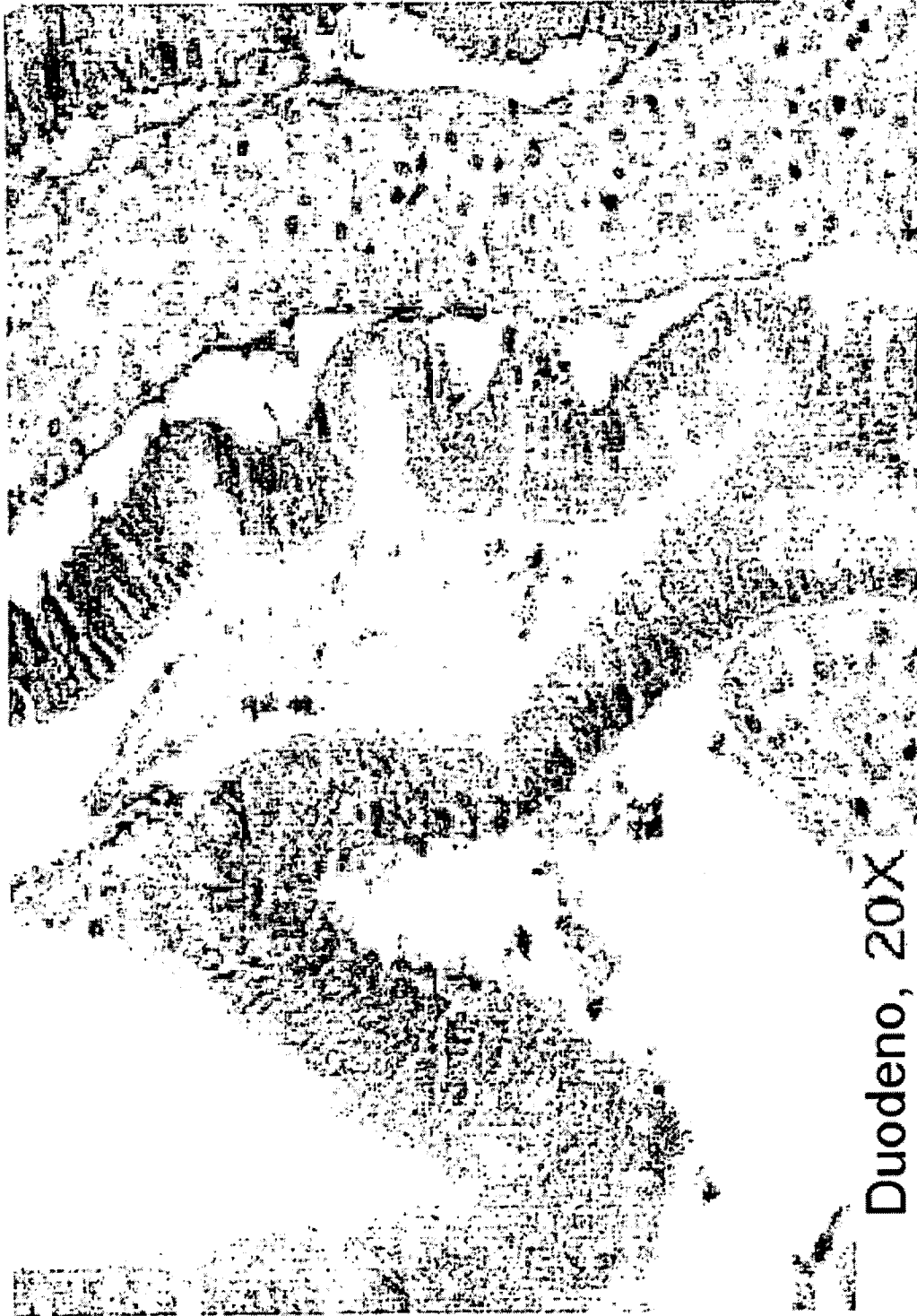


Figura 4B



Duodeno, 20X

Figura 5A



Figura 5B

Figura 6
CDR de cadenas pesadas de anticuerpos

	<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>	<u>CDR3</u>
37C8	GYMH	WINPHTGGKNYAQKFQG	DPSIAVAGPSFYYYGLDV
37G8	GYMH	WINPHTGGKNYAQKFQG	DPSLVVTGPSFYYYGLDV
38C8	GYMH	WINPHTGGKNYGQKFQG	DPSISVAGPSFYYFGLDV
37B9	GYMH	WINPHTGGKNYAQRFQG	DPSLVVTGPSFYYYGLDV
38E3	GYMH	WINPHTGGKNYAQKFQG	DPSLSVTGPSFYYYGLDV
38D2	GYLH	WINPFTGATDYAQKFQG	DPSL--Q-NSYHYVMDV
38A4	SFAMT	AIGGSGRNTYYADSVKG	EGAMA-R-PP-R--GLDV
38G6	SYSVN	YISGSSSTVHYADSVKG	WGTRQ--G-H--YFGMDV
37A2	GYGMH	VIWPDGTNKYYADSVKG	GG---ATA-VF---GMNV

Figura 7

CDR de cadenas ligeras de anticuerpos

	<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>	<u>CDR3</u>
37C8	RSSQSLVYSDGNTYLS	KISNRFS	MQATQFPWT
37G8	RSSQSLVHSDGNTYLS	KISNRLS	MQATQFPWT
38C8	RSSQSLVHSDGNTYLS	KISNRFS	MQATQFPWT
37B9	RSSQSLVHSDGNTYLS	KISNRFS	MQATQFPWT
38E3	RSSQSLVHSDGNTYLS	KISNRFS	MQATQFPWT
38D2	RSSQSLVHSDGNTYLS	KISNRFS	MQATQFPWT
38A4	KSSQSILYSSNNKNYLA	GASTRES	QQYYFTPFS
38G6	TLSSGYNNYKVD	VGTGGIVGSKGD	GADHASGNNEFVYV
37A2	SGDELPKQYAY	KDSERPS	QSPDSRRTVI

VL de 38G6:

cagcctgtgctgactcagccacctctgcatcagccctccctgggagcctcggteacactcaacctgcaccctgagcagcggctacaata
attataaagtggactgggtccagcagcaccagggaggggccccctgtttggtatgcgagtgggcactgggtgggattgtgggatccaa
gggggatggcaccctgatcgctctcagcttgggctcagggcctgaalcggglacctgaccatcaagaacatccaggaagaggatgag
agtgaclaccactgtggggcagaccatgccagtggaacaactcgtgtatgtctcgggaactgggaccaaggtcaccgtccia
(SEQ ID NO: 105)

QPVLQPPSASASLGASVLTCTLSSGYNNYKVDWFQQRPRGPRFVMRVGTGGIV
GSKGDGIPDRFSVLGSLNRYLTIKNIQEEDES DYHCGADHASGNFVYVFGTGTKV
TVL (SEQ ID NO: 106)

VH de 38G6

gaagtgcaggtggaggctggggaggcctgggtacagcctggggggctccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctca
gtagctatagcgtgaactgggtccgccaggctccaggaaggcctggagtggtctcatacaltagtggtagtagtaccglaca
ctacgcagactctgtgaaggccgattcaccattccagagacactccaagaattcagtgatctgcaactgaacagcctgagagac
gaggacacggctctgtattactgtgcgagatggggaactcgtcagggccactacttcggtatggacgtctggggccaaggaccacg
gtcaccgtctctagt (SEQ ID NO: 107)

EVQVVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYSVNWVRQAPGKGLEWVSYISGSSST
VHYADSVKGRFTISRDTAKNSVYLQLNSLRDEDTALYYCARWGTRQGHYFGMDVW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 108)

VK de 38E3

Gatgtgtgatgaccagactccactctcctcacctgtcaccctgggtcagccggcctccatctcctgcaggctctagtaaagcctcgta
cacagtgatggaacacctacttgagttggctcagcagaggccaggccagcctccaagactcctaattataagattctaaccgattct
ctggggctccagacagattcagtggcagtggggcagggacagattcactgaaaatcagcaggggtggaagctgaggatgtcggg
gttattactgcatgcaagctacacaattccgtggacgllcggccaaggaccgaaggtggaatcaaa (SEQ ID NO: 95)

DVVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYKISN
RFSGVPRDRFSGSAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQFPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 96)

VH de 38E3

caggtgcagttgggtcaatctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcagtgaaaggtctcctgcaaggctctggatacacccctca
ccggctactacatgcactgggtgcgacagggccccggacaaggcctgagtggtggtggatgataaccctcacactggtggcaaa
aactatgccagaagttcagggcagggcaccctgaccagggacacgltccatcagcacagcctacatggagctgaacagcttgaga
tctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagagatcctagtftatcagtgacigggcctctcctactactacggttggacgtctggg
gccaaggaccacgggtcaccgtctctagt (SEQ ID NO: 97)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTLTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPH
TGGKNYAQKFQGRVTLTRDTSISTAYMELNSLRSDDTAVYYCARDPSLSVTGPSFY
YGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 98)

Figura 8A

VK de 38D2:

gatattgatgaccagactccattctctcaccctgacacccctggacagccggcctccatctcctgcaggctcagcaagcctcgtac
acagtgatggaaacacctacttgagttggcttcagcagagggccaggccagcctccaagactcctaattataagatttctaaccggttct
ctggggtcccagacagattcagtgagcagtgaggcagggacagattcacactgaaaatcagcaggggtggaagctgaggatgctggg
gtttattctgcatgcaagctacacaatttcctggacgttcggccaaggggaccaaggtggaatcaaa (SEQ ID NO: 85)

DIVMTQTTPFSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPELLIYKISNR
FSGVPDRFSGGAGTDFTLKISRVEAEDVGVVFCMQATQFPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 86)

VH de 38D2:

caggigcagttggtgcagictggggctgaggtgaagaagccccggggcctcagtgaaaggtctcctgcaaggcttctggatacacccctc
accggctactatctgcactgggtgcgacagggccccctggacaagagcttgagtgatgggatggatcaacccttactgggtgccacag
actatgcacagaagttcagggcagggcaccatgacccgggacacgtccatcaafacagcccacatggagctgagcagggctgaga
tctgacgacacggccgtgtattactgtgagagacccctctctcaaaaatcctaccattactacgtcatggacgtttggggccaaggg
accacggtcaccgtctcragt (SEQ ID NO: 87)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTGYYLHWVRQAPGQELEWMGWINPFT
GATDYAQKFQGRVTMTRDTSINTAHMELSRLSDDTAVYYCARDPSLQNSYHYVY
MDVWQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 88)

VK de 38C8:

gatattgatgaccagactccactctctcaccctgacacccctggcagccggcctccatctcctgcaggctcagcaagcctcgtac
acagtgatggaaacacctacttgagttggcttcagcagagggccaggccagcctccaagactcctaattataagatttctaaccggttct
ctggggtcccagacagattcagtgagcagtgaggcagggacagattcacactgaaaatcagcaggggtggaagctgaggatgctggg
gtttattactgcatgcaagctacacaatttcctggacgttcggccaaggggaccaaggtggaatcaaa (SEQ ID NO: 75)

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPELLIYKISNR
FSGVPDRFSGGAGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQATQFPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 76)

VH de 38C8:

caggigcagttggtgcaatctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcagtgaaaggtctcctgcaaggcttctggatacacccctca
ccggctactacatgcactgggtgcgacagggccccctggacaagggcttgagtgatgggatggatcaaccctcacactgggtggcaaa
aactatggacagaagttcagggcagggcaccctgaccagggacacgtccatcaacacagcctacatggagctgaacagcttgaga
tctgacgacacggccgtgtattactgtgagagatcctagatatacagtgagctgggcttcccttactacttgggttgacgtctggg
gccaagggaaccaggcaccgtctcragt (SEQ ID NO: 77)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTLTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPH
TGGKNYGQKFQGRVTLTRDTSINTAYMELNSLRSDDTAVYYCARDPSISVAGPSFY
FGLDVWQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 78)

Figura 8B

VK de 38A4:

gacatcgtgatgaccagctcagactccctggctgtctctgggagagggccaccatcaactgcaagtcagccagagatattt
atacagctccaacaataagaactacttagcatgtaccagcagaaactcggacagccctcctaagttgctcattacggggcatctacc
gggaatcgggggtccctgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagattcactctcaccatcagtagcctgcaggctgaagatgt
ggcagtttattactgtcagcaatactatttactccattctcttccggccctgggaccaaagtggatcga (SEQ ID NO: 65)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSILYSSNNKNYLAWYQQKLGQPPKLLIYGAS
TRESGVPDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYFTPFSGPGTKVDIE (SEQ
ID NO: 66)

VH de 38A4:

gaggtgcagctgttgagctcggggagggcctgggtacagcctggggggtctctgagactctcctgtgcagcctctggattcactttag
cagcfttgccatgacctgggtccgaggtccaggggaaggggctggagtggtctcagctattggtagtgtaggaacacata
ctacgcagactccgtgaagggccgggtcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtacctgcaaatgagcagcctgagagc
cgaaggacacggccgtatattactgtgcgaaagagggggctatggctcggcctccgagggggttggacgtctggggccaagggacca
cggtcaccgtctctagt (SEQ ID NO: 67)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMTWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGR
NTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKEGAMARPPRGLDV
WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 68)

VK de 37G8:

gatattgtgatgaccagactccaactctcctcaccctgtcaccatgggtcagccggcctccatctcctgcaggtctagtcaaagcctcgt
cacagtgatggaaacacctacttgagttggcttcagcagagggccaggccagcctccaagactcctaattataagatttcaaccggtg
tctgggtcccagacagattcagtgccagtgggacagggacagattcacactgaaaatcagcaggggtggaagctgaggatgtcgg
ggtttatgtctcatgcaagctacacaatttccgtggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO: 55)

DIVMTQTPLSSPVTHGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNR
LSGVPDRFSGSGTGTDFTLKISRVEADVGVYVCMQATQFPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 56)

VH de 37G8:

caggtgcagttggtgcaatctgggctgaggtgaagaagcctgggtcctcagtgaggctcctcctcaaggcttctgatacaccctca
ccggctactacatgcactgggtcggccagggcctggacaagggccttgagtgatgggatggatcaaccctcacactggggcaaa
aactatgccagaagttcagggcagggcaccctgaccagggacacgtccatcaacacggcctacatggaactgaacaccttgaga
tctgacgacagggcgtglaftactgtgcgagatcctagctagtagtactgggcctcctctactactacgggttgacgtctggg
gccaagggaccacgggtcaccgtctctagt (SEQ ID NO: 57)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTLTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPH
TGGKNYAQKFQGRVTLTRDTSINTAYMELNLRSDDTAVYYCARDPSLVVTGSPFY
YYGLDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 58)

Figura 8C

VK de 37C8:

gatattgtatgaccagactccactctcctcacctgtcacccttggcagccggcctccatctcctgcaggctagtagcaagcctcgtat
acagtgatggaaacacclacttgagttggctcagcagaggccaggccagcctccaagactcctagtataagatttctaaccggttct
ctggggtcccagacagattcagtgaggcagtgaggacagattcacattgaaaatcagcaggggtggaagctgaggatgtcggg
gtttattctgcatgcaagctacacaatttccgtggacgttcggccaagggaccaaggtggaatcaaa (SEQ ID NO: 45)

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLVYKISN
RFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQATQFPWTFGQGTKVEIK
(SEQ ID NO: 46)

VH de 37C8:

caggtgcagttgtgcaatctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcagtggaaggtctcctglaaggcttctggatacacccca
ccggctactacatgcactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtgatggatggatggaalcaaccctcacactggggcaaa
aactatgcacagaagttcagggcagggcaccctgaccagggacacgctccatcaacacagcctacatggagctgaacacctgaga
tctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagagatcctaglatagcagtggtcggcctccttctactactacggtttgacgtctggg
gccaagggaccacggcaccgtctctagt (SEQ ID NO: 47)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTLTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPH
TGGKNYAQKFQGRVTLTRDTSINTAYMELNLRSDDTAVYYCARDPSIAVAGPSFY
YYGLDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 48)

VK de 37B9:

gatattgtatgaccagactccactctcctcacctgtcacccttggcagccggcctccatctcctgcaggctagtagcaagcctcgtac
acagtgatggaaacacclacttgagttggctcagcagaggccaggccagcctccaagactcctaattataagatttctaaccggttct
ctggggtcccagacagattcagtgaggcagtgaggacagattcacactgaaaatcagcaggggtggaagctgaggatgtcggg
gtttattctgcatgcaagctacacaatttccgtggacgttcggccaagggaccaaggtggaatcaaa (SEQ ID NO: 35)

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNR
FSGVPDRFSGSGTGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCMQATQFPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 36)

VH de 37B9:

caggtgcagttgtgcaatctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcagtggaaggtctcctgcaaggcttctggatacacccca
ccggctactacatgcactgggtgcgacagggccctggacaagggcttgagtgatggatggatggaalcaaccctcacactggggcaaa
aactatgcacagaggtttcagggcagggcaccctgaccagggacacgctccgtcaacacggcctacatggagctgaacaccttgag
atctgacgacacggccgtttattactgtgcgagagatcctagtagtagtgactggcctccttctactactacggtttgacgtctggg
gccaagggaccacggcaccgtctctagt (SEQ ID NO: 37)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTLTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPH
TGGKNYAQRFQGRVTLTRDTSVNTAYMELNLRSDDTAVYYCARDPSLVVTGPSFY
YYGLDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 38)

Figura 8D

VL de 37A2:

tcctatgagttgacacagccaccctcgggtgtcagtggtccctggacagacggccaggatcacctgctctggagatgaattgccaagc
aataatgcttattgggtaccagcagaaggcaggccaggccctgtaatggtgattcataaagacagtgagaggccctcagggatccctga
gcgattctctggctccagcgcagggacaattgtcacgttgaccatcagtgaggatccaggcagaagacgaggctgactattactgtcaat
caccagacagcagacgtactgtgatattcggcggagggaccaagctgaccgtccta (SEQ ID NO: 25)

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDELPKQYAYWYQQKAGQAPVMVIHKDSERPSGI
PERFSGSSAGTIVTLTISGVQAEDYCYCQSPDSRRTVIFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO: 26)

VH de 37A2:

caggtgcagctgggtggagtctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcgtctggattcacctca
gtggctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcagggggctggagtgggtggcagttatatggcctgatggaactataaat
actatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacaaactgtatctgcaaatgaacagcctgagagc
cgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagggggagcaacagcagtttcggtatgaacgtctggggccaagggaccacgggtca
ccgtctctagt (SEQ ID NO: 27)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLEWVAVIWPDG
TNKYYADSVKGRFTISRDNKLNKLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGATAVFGMNV
WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 28)

Figura 8E

Figura 9

