



CSA836286

Industria y C**SUPERINTEN**

Organización y

Digitalización CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-093896-00000-0000

Fecha: 2010-08-02 16:12:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEYII Lve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 169

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION**10-93896**

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

ANTICUERPOS HUMANIZADOS ESPECIFICOS PARA EL FACTOR

VON WILLEBRAND

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K 16/36; A61K 39/395;

C12N 15/13; A61P 7/02

71. SOLICITANTE

GLENNMARK PHARMACEUTICALS S.A.

DOMICILIO

LA CHAUX-DE-FONDS, SUIZA

74. APODERADO

GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D. C.,

PETITORIO

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-093896- -00000-0000

Fecha: 2010-08-02 16:12:27
Tra 11 PATENTE IYI
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVASOR
Eve: 378 FASE NACIONAL
Folios: 169**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTES**
PCT**ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE

Nombre:

GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

Dirección:

Chemin de la Combeta, 5

Nacionalidad o Domicilio:

La Chaux-de-Fonds,
Suiza

Lugar de Constitución:

Suiza

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION☐ C.C.☐ NIT☐ C.E.☐ Otro

Cúal

Número

3

REPRESENTANTE O
APODERADO

Nombre:

GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección:

Carrera 13 No. 37 - 43 Piso 12

Teléfono:

285 7460

Fax:

285 9267

E-mail:

info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN☒ C.C.☐ NIT☐ C.E.☐ Otro

Cúal

Número

17.017.671

TP 2.978

de Bogotá

del C.S.J.

4

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre:

Elias Lazarides; Catherine Woods; Xiaomin Fan; Samuel Hou;
Harald Mottl; Stanislas Blein; Martin Bertschinger

Dirección:

7260 Romero Drive; 7260 Romero Drive; 12240 Katydid
Circle; Chemin de la Combeta, 5; Chemin de la Combeta, 5;
Chemin de la Combeta, 5; Chemin de la Combeta, 5.

Nacionalidad o Domicilio:

La Jolla, California, E.U.A.; San Diego,
California, E.U.A.; La Chaux-de-Fonds, Suiza

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/IB2009/000124

Fecha

Enero 22, 2009

Solicitud Internacional No.

WO 2009/093133 A1

Fecha

Julio 30, 2009

6

Título (54)**ANTICUERPOS HUMANIZADOS ESPECÍFICOS PARA EL FACTOR VON**
WILLEBRAND

7

Clasificación Internacional (51)**C07K 16/36; A61K 39/395; C12N 15/13; A61P 7/02**

8

Prioridad☒ SI ☐ NO

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

E.U.A.

Enero 23, 2008

61/023,025

E.U.A.

Abril 14, 2009

61/044,787

9

Comprobante de pago No.**Fecha**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

2

		EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN	
		☒ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☐ PCT	
(21) No. De solicitud		(51) int. Cl: C07F 16/36; A61K 39/395; C12N 15/13; A61P 7/02	
(22) Fecha de solicitud		(71) Solicitante (s) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.	
(30) Prioridad		(72) Interventor (es)	
(31) No. Prioridad 61/023,025 61/044,787		Elias Lazarides; Catherine Woods; Xiaomin Fan; Samuel Hou; Harald Mottl; Stanislas Blein; Martin Bertschinger	
(32) Fecha Enero 23, 2008 Abril 14, 2008			
(33) País E.U.A. E.U.A.		(74) Apoderado (s) GERMAN CASTILLO GRAU	
(54) Título ANTICUERPOS HUMANIZADOS ESPECÍFICOS PARA EL FACTOR VON WILLEBRAND			
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT			
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional			
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		(87) Publicación internacional	
Fecha de presentación de la solicitud		Fecha Fecha (Julio 30, 2009)	
Fecha Enero 22, 2009		No. Publicación WO 2009/093138 A1	
No. de solicitud PCT PCT/B2009/000124			
Resumen reivindicación (es):			
La presente revelación hace referencia a anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos específicos para el factor Von Willebrand humano (vWF), a métodos para su reparación y uso, que incluyen métodos para tratar enfermedades o trastornos mediados por vWF.			

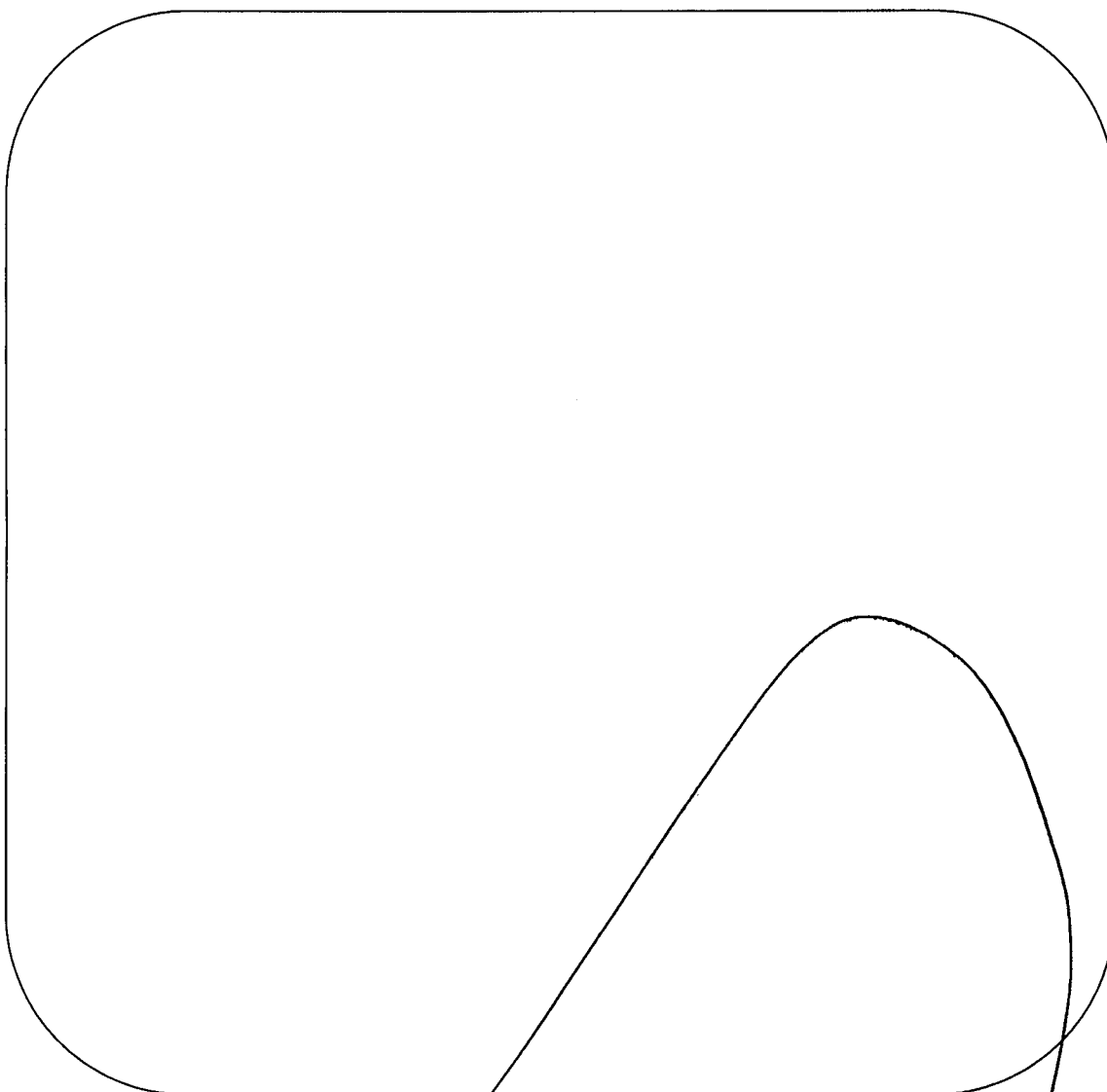
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Copia auténtica**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la (IPEA)
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA:

C.C.

17.017.671 de
Bogotá

TP

2.979
de C.S.J.

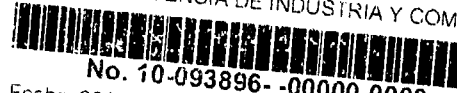
Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 62,360
FECHA : AGOSTO 2 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-093896- -00000-0000

Fecha: 2010-08-02 16:12:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Acc. 411 PRESENTACION Folios: 169

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754307	378456654	02/08/2010	14,005,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

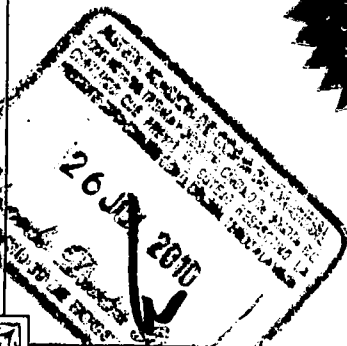
1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
KATHLEEN A DONOVAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
COUNTY CLERK
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
COUNTY OF BERGEN

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 2ND DAY OF JULY 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A296133
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow



Castillo Grau & Associates

Law Offices
P.O. Box 251473
Bogotá, Colombia

FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN**COLOMBIA****PODER GENERAL****(1) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.**

domiciliado en (2) Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-De-Fonds-Suiza

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12 en Bogotá, D.C., Colombia como sus representantes con poder especial amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la Obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Diseños Industriales, de Nombres y Enseñas Comerciales, lo mismo que traspasos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre y domicilio, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares, aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir, y tomar en fin todas las medidas que creyeren convenientes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones para que intervengamos como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades legales necesarias. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extra-judiciales

Dado y firmado en (4)
Ciudad de Mahwah, País de Bergen
Estado de New Jersey, Estados Unidos de América

Firma/Signature By:

Name: Sean E. Ryder, Esq.

Title: Director of Intellectual Property

Corporate Seal to be Affixed

Director de Propiedad Intelectual

POWER OF ATTORNEY**(1) GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.**

domiciled in (2) Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-De-Fonds-Switzerland

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe Castillo-Gibsone

with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in Bogotá, Colombia as our representatives with special ample and sufficient power to obtain from the offices and Colombian authorities, administrative, judicial and police, in first or in second instance, Patents of Invention, registration of Trade or Service Marks, Industrial Designs, of Commercial Names and Ensigns, as well as assignments, extensions, renewals, changes of names and addresses, registration of licences of exploitation and licences of use referring to said actions who are empowered to take before said authorities all of the necessary steps for the purposes indicated, to file applications, to formulate descriptions, corrections, protests, declarations, appeals and claims, apply for precautionary measures, to accept on our behalf and representation the assignment of rights on invention and titles of invention that may be given to us by any person, to pay all taxes, quotas and payments prescribed by law, to receive all the documents and proceeds giving the respective acquiescence or receipt, to fulfill any other requisites to desist and take in fact any other measures that may be deemed conducive to the safeguard of our interests, and in case oppositions are presented to intervene as plaintiff or defendant, with all necessary legal faculties. This power includes the faculties to receive, desist, compromise, transact, substitute it in all or in part, to revoke substitutions, to receive notifications and to appoint judicial or extra-judicial attorneys.

Given and signed in (4)
City of Mahwah, County of Bergen
State of New Jersey, United States of America

glenmark PHARMACEUTICALS S.A.
Chemin de la Combeta 5
CH-2300 La Chaux-de-Fonds
+41 (0)32 729 3550 - +41 (0)32 729 3560

STATE OF NEW JERSEY,
COUNTY OF BERGEN; SS.:

I, Kathleen A. Donovan, Clerk of the County of Bergen
(the same being an office of Record of the aforesaid County,
having by law a seal)

DO HEREBY CERTIFY, That, Jennifer E. Byrne,
whose name is subscribed to the attached certificate of acknowledgement, proof or affidavit, was at the time of taking said
acknowledgement, proof or affidavit, a NOTARY PUBLIC, duly commissioned and sworn and residing in said State, and was, as such
NOTARY PUBLIC, an officer of said State duly authorized by the laws thereof to take and certify the same, as well as to take and certify
the proof and acknowledgement of deeds for the conveyance of land, tenements or hereditaments, and other instruments in writing to be
recorded in said State, and that the said acknowledgement is duly executed and taken according to the laws of said State, and that I am
well acquainted with his/her handwriting and verily believe the signature to the attached certificate is his/her genuine signature.

And I do further certify that the impression of the seal of such NOTARY PUBLIC is not required by the laws of this State to be
filed in my office.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my official seal this

27th day of June A.D., 20 07

Kathleen A. Donovan

Clerk

Deputy



DECLARACION NOTARIAL

(Individual)

A los 19 días del mes de Junio de 2007 compareció personalmente ante mí, Notario Público el/la señor(a) Sean E. Ryder, Esq.

A quien(es) doy fé de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s) del documento que precede, declarando ante mí que otorga(n) el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

El Notario Público

(Sociedades)

El infrascrito Notario certifica: que la firma que antecede y dice

SEAN E. RYDER, ESQ.
es auténtica; que el signatario desempeña el

cargo de

Director de Propiedad Intelectual

de GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

que tiene facultad para otorgar este poder;

y que dicha compañía está domiciliada en

Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-De-Fonds, Suiza

y actualmente existe y está organizada de

acuerdo a las leyes de Suiza

Todos los hechos anteriores se constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fé

Dado y firmado en Ciudad de Mahwah, País de Bergen, Estado de New Jersey, Estados Unidos de América

El Notario Público

(Con Apostilla)

NOTARIAL CERTIFICATE

(Individuals)

On this 19th day of June of 2007 personally appeared before me, a Notary Public, Sean E. Ryder, Esq.

to me known, and known to me be the person(s) described in and who executed the foregoing document, and he(they) duly acknowledged to me that he(they) executed same for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public

(Corporations)

The undersigned Notary Public certifies: that

The preceding signature reading

Sean E. Ryder, Esq.
is authentic; that the signor at present fills the

post of

Director of Intellectual Property
of GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

and that he/she is empowered to grant this power;

and that said company is domiciled in

Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-De-Fonds, Switzerland

and actually exists and is organized in

accordance with the laws of Switzerland

All the foregoing facts are known to the Notary due to his/her having examined the respective documents to which he/she, the Notary, attests.

Granted and signed in City of Mahwah, County of Bergen, State of New Jersey, United States of America.

Notary Public

(With Apostille)

JENNIFER E. BYRNE

Notary Public of New Jersey

My Commission Expires July 7, 2009

9

ANTICUERPOS HUMANIZADOS ESPECÍFICOS PARA EL FACTOR VON WILLEBRAND

CAMPO DE LA INVENCION

La presente revelación hace referencia en general a anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos específicos para el factor von Willebrand. En forma más específica, la revelación hace referencia en general a anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos específicos para el factor von Willebrand, que incluyen aquellos que comprenden CDR correspondientes a las CDR presentes en el anticuerpo murino NMC-4.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La regulación de la adhesión plaquetaria a sitios de lesión vascular implica la interacción bien orquestada de diversas proteínas y desempeña un papel importante en la hemostasis y la trombosis. Una de tales proteínas que contribuye a la adhesión plaquetaria es el Factor von Willebrand (vWF), una glicoproteína multimérica de gran tamaño presente en el plasma sanguíneo. Se presume que el VWF interactúa con el receptor plaquetario GPIIb- α a través de su dominio A1 promoviendo así el rodamiento y adhesión plaquetarios (Moake et al. (1986) J. Clin. Invest. 78:1456-61). Luego del rodamiento y adhesión plaquetarios, puede formarse un tapón plaquetario/de fibrina que produce la cesación del sangrado. Sin embargo, una respuesta plaquetaria y/o de coagulación excesiva puede dar lugar a condiciones trombóticas patológicas.

Dado que las terapias actuales dirigidas a la inhibición de la activación plaquetaria (por ej., GPIIb/IIIa, receptor de ADP, antagonistas de ciclo-oxigenasa o fosfodiesterasa) o de la coagulación (por ej., inhibidores de trombina y del factor Xa) están asociadas con complicaciones hemorrágicas, existe una necesidad de desarrollar agentes capaces de inhibir en forma sustancial la trombosis sin alterar significativamente la hemostasis.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente revelación hace referencia en general a anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos específicos para el factor von Willebrand (vWF), a métodos para su preparación y uso, que incluyen métodos para tratar enfermedades o trastornos mediados por vWF. Los anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos específicos para vWF humano

10

pueden comprender regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano (por ej., CDR de ratón) y regiones de entramado humanas.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende (a) regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y liviana correspondientes a las CDR presentes en las regiones variables de cadena pesada y liviana del anticuerpo murino NMC-4 (SEC ID NO: 1 y 2, respectivamente); y (b) una región de entramado de cadena pesada correspondiente a la región de entramado presente en la región variable de anticuerpos humanos derivados de VH 4-59, tal como el anticuerpo AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y/o una región de entramado de cadena liviana correspondiente a la región de entramado presente en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (VL 018) (SEC ID NO: 6).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEC ID NO: 9).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEC ID NO: 9). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede además

comprender una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede además comprender una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: las CDR de cadena pesada HCDR1: GFSLTGYVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEC ID NO: 9); y las CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede además comprender una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6) y/o una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado específico para vWF que comprende una o más de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID

NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146); y una o más de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

Por ejemplo, anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos pueden comprender L5 (SEC ID NO: 23) y H2 (SEC ID NO: 13); L5 (SEC ID NO: 23) y H4 (SEC ID NO: 14); L5 (SEC ID NO: 23) y H5 (SEC ID NO: 15); L5 (SEC ID NO: 23) y H6 (SEC ID NO: 16); L5 (SEC ID NO: 23) y H7 (SEC ID NO: 17); L5 (SEC ID NO: 23) y H8 (SEC ID NO: 18); L4 (SEC ID NO: 24) y H2 (SEC ID NO: 13); L6 (SEC ID NO: 25) y H2 (SEC ID NO: 13); L11 (SEC ID NO: 30) y H2 (SEC ID NO: 13); L7 (SEC ID NO: 26) y H2 (SEC ID NO: 13); L9 (SEC ID NO: 28) y H9 (SEC ID NO: 19); L8 (SEC ID NO: 27) y H9 (SEC ID NO: 19); L7 (SEC ID NO: 26) y H9 (SEC ID NO: 19); L6 (SEC ID NO: 25) y H9 (SEC ID NO: 19); L4 (SEC ID NO: 24) y H9 (SEC ID NO: 19); L5 (SEC ID NO: 23) y H9 (SEC ID NO: 19); L10 (SEC ID NO: 29) y H9 (SEC ID NO: 19); L9 (SEC ID NO: 28) y H9 (SEC ID NO: 19); L9 (SEC ID NO: 28) y H12 (SEC ID NO: 20); L9 (SEC ID NO: 28) y H13 (SEC ID NO: 21); L9 (SEC ID NO: 28) y H14 (SEC ID NO: 22); L11 (SEC ID NO: 30) y H9 (SEC ID NO: 19); o L11 (SEC ID NO: 30) y H14 (SEC ID NO: 22).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9); y una o más de las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede



además comprender una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6) y/o una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente, que se une a vWF con una afinidad (K_d) de 10 nM o menor, preferentemente 5 nM o menor, más preferentemente 1 nM o menor, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 0,4 nM. La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente, que compete para unirse a vWF con una afinidad (K_i) de 100 nM o menor, preferentemente 50 nM o menor, más preferentemente 10 nM o menor, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 5,0 nM.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo que se une al dominio A1 de vWF con una afinidad (K_d) de 10 nM o menor, preferentemente 5 nM o menor, más preferentemente 1 nM o menor, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 0,4 nM. La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo que compete para unirse al dominio A1 de vWF con una afinidad (K_i) de 100 nM o menor, preferentemente 50 nM o menor, más preferentemente 10 nM o menor, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 5,0 nM.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo que tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que 65°C.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1 (GFSLTGYGVG; SEC ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEC ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNIDYALDY; SEC ID NO: 9) y una CDR1 de cadena liviana, una CDR2 de cadena liviana y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEC ID NO: 12), con la condición de que al menos una de LCDR1 y/o LCDR2 no sea SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10) o YTSSLHS (SEC ID NO: 11), respectivamente.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende HCDR1 (GFSLTGYGVD; SEC ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEC ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNVDYALDY; SEC ID NO: 9), LCDR1 (SASQDINKYLN; SEC ID NO: 10), LCDR2 (YTSSLHS; SEC ID NO: 11) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEC ID NO: 12); las regiones de entramado de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 de la familia VH4 de línea germinal de anticuerpos humanos; y las regiones de entramado de cadena liviana 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 de la familia VK1 de línea germinal de anticuerpos humanos.

La presente revelación también hace referencia en general a ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos humanizados específicos para vWF humano revelados en la presente. En algunas realizaciones, un vector puede comprender los ácidos nucleicos revelados en la presente. En otra realización, una célula huésped puede comprender los ácidos nucleicos revelados.

La presente revelación también hace referencia en general a métodos para producir un anticuerpo humanizado específico para vWF que comprende cultivar la célula huésped de la presente revelación de modo que se exprese el ácido nucleico y se produzca el anticuerpo. En algunas realizaciones, el método además comprende recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped. En algunas realizaciones, el anticuerpo se recupera del medio de las células huésped. En algunas realizaciones, antes del cultivo, la célula huésped se co-transfecta con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena liviana.

La presente revelación hace referencia en general a composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado específico para vWF y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

También se proveen composiciones que comprenden un primer anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente y un segundo anticuerpo que se une al dominio A1 de vWF. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo es AJW-200.

La presente revelación también hace referencia en general a métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno trombótico) en un sujeto (por ej., un paciente) mediante la administración al sujeto de una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo específico para vWF. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, una cantidad efectiva para uso terapéutico es suficiente para inhibir la agregación plaquetaria pero insuficiente para causar signos clínicos significativos de sangrado.

La presente revelación también provee usos de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente como medicamento. La presente revelación también provee usos de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF. En algunas realizaciones, una cantidad efectiva para uso terapéutico es suficiente para inhibir la agregación plaquetaria pero insuficiente para causar signos clínicos significativos de sangrado.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno mediado por vWF es una enfermedad o trastorno trombótico. En algunas realizaciones, el trastorno trombótico es una enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular tal como apoplejía isquémica. En algunas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con la diabetes. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno trombótico es inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad falciforme, rechazo de xenoinjerto, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes. En algunas realizaciones, la enfermedad cerebrovascular es demencia vascular, apoplejía isquémica o prevención de apoplejías recurrentes.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF carece de función efectora. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado comprende una región Fc derivada de IgG4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF se une al dominio A1 del factor von Willebrand.

En algunas realizaciones, el fragmento de unión del anticuerpo específico para vWF es un Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ o un diacuerpo.

En algunas realizaciones, el fragmento de unión al anticuerpo específico para vWF no es un Fab.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado específico para vWF es un anticuerpo de longitud completa.

En algunas realizaciones el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones F27G, L29I, T30S y/o V34W, en HCDR1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones S61P y/o A62S, en HCDR2. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones S24Q, N30S y/o K31N, en LCDR1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones Y50D, T51A, S53N, H55E y/o S56T, en LCDR2. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones F27G, L29I, T30S y/o V34W, en HCDR1; una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones S61P y/o A62S, en HCDR2; una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones S24Q, N30S y/o K31N, en LCDR1; y una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones Y50D, T51A, S53N, H55E y/o S56T, en LCDR2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la actividad inhibitoria de un anticuerpo quimérico NMC-4 comparada con el anticuerpo monoclonal original NMC-4 y un anticuerpo anti-vWF diferente, AJW200, en un ensayo de aglutinación plaquetaria mediada por vWF inducida por ristocetina.

La Figura 2A-B muestra la competencia para la unión a NMC-4 marcado con Eu entre un anticuerpo quimérico NMC-4 no marcado (competencia homóloga) y AJW200, solos y combinados (Figura 2A). La competencia de un anticuerpo quimérico NMC-4 marcado con Eu por el anticuerpo monoclonal NMC-4 no marcado, el isotipo IgG control, AJW200 y un derivado humanizado del anticuerpo NMC-4 con regiones variables denominadas H9, L9 (Figura 2A).

Gráfico de Hill de la competencia de NMC-4 en presencia o ausencia de AJW200 20 nM (Figura 2B).

La Figura 3A-E muestra la capacidad de NMC-4 para bloquear la adhesión plaquetaria al vWF endotelial en condiciones de flujo de cizallamiento, que incluyen fotomicrografías de plaquetas adheridas a células HUVEC. Las monocapas de células HUVEC se trataron con PBS (Figura A) o histamina 25 μ M (Figuras B-E), más 10 μ g/ml de anticuerpo anti-vWF, NMC-4 (Figura C), 18 μ g/ml de anticuerpo anti-GPIIb α , AK2 (Figura D), o 18 μ g/ml de IgG de ratón IgG (Figura E). Los diferentes anticuerpos también se incluyeron en las suspensiones plaquetarias correspondientes inmediatamente antes de la perfusión a través de las monocapas.

La Figura 4A-C muestra la actividad de la quimera NMC-4 (Figura 4A) y un anticuerpo humanizado con regiones variables denominadas H14, L10 (Figura 4B) en el modelo de cloruro férrico en rata de trombosis arterial, comparada con AJW200 (Figura 4C). Se compararon los tres anticuerpos en un estudio de respuesta a la dosis.

La Figura 5 muestra el efecto de dosis crecientes (0,03 – 10 mg/kg) de GBR600 sobre las reducciones del flujo cíclico (CFR) en mandriles.

La Figura 6 muestra el efecto de dosis crecientes (0,01 – 10 mg/kg) de GBR600 sobre las CFR en mandriles.

La Figura 7 muestra el efecto de dosis acumulativas (0,005 – 0,07 mg/kg) de GBR600 sobre las CFR en mandriles.

La Figura 8 muestra la curva de respuesta a la dosis de dosis acumulativas de GBR600 sobre las CFR en mandriles.

La Figura 9 muestra el efecto de dosis crecientes (1 – 10 mg/kg) de clopidogrel en mandriles.

La Figura 10 muestra una comparación del efecto de la infusión de dosis crecientes de GBR600 y clopidogrel sobre el ensayo de sangrado incisional. Las dosis se han expresado como múltiplos de la dosis efectiva (por ej., la dosis acumulativa, en la que las CFR se reducen a cero).

La Figura 11 muestra la termoestabilidad de variantes humanizadas de NMC-4 por calorimetría diferencial de barrido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

156

La presente revelación provee anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos específicos para el Factor von Willebrand humano (vWF), que incluyen aquellos que comprenden regiones CDR correspondientes a una o más de las CDR o porciones de las CDR presentes en el anticuerpo murino NMC-4. El anticuerpo NMC-4 se une al sitio de unión GP1b- α sobre el dominio A1 de vWF (ver, por ej., Fujimura et al Blood, 77:113-20, 1991; Shima et al, J Nara Med Assoc., 36:662, 1985). Los anticuerpos humanizados de la presente revelación pueden además comprender regiones de entramado humanas modificadas o no modificadas, tales como una región de entramado de cadena pesada correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y una región de entramado de cadena liviana correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6). Una gran variedad de regiones de entramado humanas, que incluyen aquellas que demostraron alta homología con las subfamilias a las que pertenecían las regiones de cadena pesada y liviana del NMC-4 murino, se consideraron moléculas aceptoras potenciales para las CDR de NMC-4. Lo más sorprendente es que el injerto de CDR de NMC-4 en uno de los entremados humanos de región variable de cadena pesada seleccionados y en uno de los entremados humanos de región variable de cadena liviana seleccionados sin cambios adicionales (por ej., mutación de residuos de entramado humano en residuos murinos), es suficiente para retener la potencia del anticuerpo humanizado en el bloqueo de respuestas plaquetarias mediadas por vWF.

El término "anticuerpo quimérico" incluye anticuerpos donde las secuencias de región variable derivan de una especie y las secuencias de región constante derivan de otra especie, tal como un anticuerpo donde las secuencias de región variable derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante derivan de un anticuerpo humano.

El término "anticuerpo humanizado" incluye anticuerpos donde se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas. Pueden realizarse modificaciones adicionales de la región de entramado dentro de las

secuencias de entramado humanas así como dentro de las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero.

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables donde las regiones de entramado y CDR derivan secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Más aún, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina humana de línea germinal (por ej., mutaciones introducidas por mutagénesis in vitro al azar o de sitio específico o por mutación somática in vivo). Sin embargo, con el término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, no se pretenden incluir anticuerpos donde se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, sobre secuencias de entramado humanas.

Según se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende secuencias variables de cadena pesada o liviana que "derivan de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar a un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o rastrear una genoteca de inmunoglobulina humana desplegada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal por comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y selección de la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana más cercana en secuencia (es decir, con mayor identidad porcentual) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias en aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, a causa de, por ejemplo, mutaciones somáticas naturales o introducción intencional de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado o fragmento del mismo típicamente es al menos idéntico en un 80% en la secuencia de aminoácidos a

una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como "humano" en comparación con secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otra especie (por ej., secuencias de línea germinal murinas). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos idéntico en un 90%, o incluso al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal, incluyendo, por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo (por ej., Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, un diacuerpo o un anticuerpo de cadena única) específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28. La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, que comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9); y una o más de las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9); o una o más de las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: CDR de cadena pesada, HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9); y CDR de cadena liviana, LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: CDR de cadena pesada, HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9); o CDR de cadena pesada, LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender una región variable de entramado de cadena pesada donde la región de entramado comprende una o más (por ej., una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de entramado de cadena pesada (por ej., entramado 1 (FW1), entramado 2 (FW2), entramado 3 (FW3) y/o entramado 4 (FW4)) presentes en un anticuerpo de la familia VH4 humana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender una región variable de entramado de cadena liviana donde la región de entramado comprende una o más (por ej., una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de entramado de cadena liviana (por ej., entramado 1 (FW1), entramado 2 (FW2), entramado 3 (FW3) y/o entramado 4 (FW4)) presentes en un anticuerpo de la familia VK1 humana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender una o más (por ej., una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de región de entramado de cadena pesada (por ej., entramado 1 (FW1), entramado 2 (FW2), entramado 3 (FW3) y/o entramado 4 (FW4)) presentes en un anticuerpo de la familia VH4 humana y una o más (por ej., una, dos, tres y/o cuatro) secuencias de región de entramado de cadena liviana (por ej., entramado 1 (FW1), entramado 2 (FW2), entramado 3 (FW3) y/o entramado 4 (FW4)) presentes en un anticuerpo de la familia VK1 humana.

2

Los miembros de la familia VH4 y sus regiones de entramado de cadena pesada 1, 2 y 3 respectivas incluyen: 4-04 (SEC ID NO: 147, 148 y 149, respectivamente), 4-28 (SEC ID NO: 150, 151 y 152, respectivamente), 4-30.1 (SEC ID NO: 153, 154 y 155, respectivamente), 4-30.2 (SEC ID NO: 156, 157 y 158, respectivamente), 4-30.4 (SEC ID NO: 159, 160 y 161, respectivamente), 4-31 (SEC ID NO: 162, 163 y 164, respectivamente), 4-34 (SEC ID NO: 165, 166 y 167, respectivamente), 4-39 (SEC ID NO: 168, 169 y 170, respectivamente), 4-59 (SEC ID NO: 171, 172 y 173, respectivamente), 4-61 (SEC ID NO: 174, 175 y 176, respectivamente) y 4-b (SEC ID NO: 177, 178 y 179, respectivamente).

Los miembros de la familia VK1 y sus regiones de entramado de cadena liviana 1, 2 y 3 respectivas incluyen: 012 (SEC ID NO: 180, 181 y 182, respectivamente), 02 (SEC ID NO: 183, 184 y 185, respectivamente), 018 (SEC ID NO: 186, 187 y 188, respectivamente), 08 (SEC ID NO: 189, 190 y 191, respectivamente), A20 (SEC ID NO: 192, 193 y 194, respectivamente), A30 (SEC ID NO: 195, 196 y 197, respectfully), L14 (SEC ID NO: 198, 199 y 200, respectivamente), L1 (SEC ID NO: 201, 202 y 203, respectivamente), L15 (SEC ID NO: 204, 205 y 206, respectivamente), L4 (SEC ID NO: 207, 208 y 209, respectivamente), L18 (SEC ID NO: 210, 211 y 212, respectivamente), L5 (SEC ID NO: 213, 214 y 215, respectivamente), L19 (SEC ID NO: 216, 217 y 218, respectivamente), L8 (SEC ID NO: 219, 220, y 221, respectivamente), L23 (SEC ID NO: 222, 223 y 224, respectivamente), L9 (SEC ID NO: 225, 226 y 227, respectivamente), L24 (SEC ID NO: 228, 229 y 230, respectivamente), L11 (SEC ID NO: 231, 232 y 233, respectivamente) y L12 (SEC ID NO: 234, 235 y 236, respectivamente).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para el vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEC ID NO: 9).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para el vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y/o HCDR3:

3

DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4), donde la región de entramado de cadena pesada no comprende uno o más residuos murinos.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para el vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y/o HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4), donde la región de entramado de cadena pesada comprende además uno o más residuos murinos.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4), donde la región de entramado de cadena pesada no comprende uno o más residuos murinos.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4), donde la región de entramado de cadena pesada comprende además uno o más residuos murinos.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6), donde la región de entramado de cadena liviana no comprende uno o más residuos murinos.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una o más de las siguientes CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y/o LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6), donde la región de entramado de cadena liviana comprende además uno o más residuos murinos.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende, CDR de cadena liviana

LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende, CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende, CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6), donde la región de entramado de cadena liviana no comprende uno o más residuos murinos.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende, CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6), donde la región de entramado de cadena liviana comprende además uno o más residuos murinos.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9); CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12); y opcionalmente una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6) y/o una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4).

La presente revelación también provee variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF. Normalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF tendrán una secuencia de aminoácidos de la región de entramado de cadena

pesada y/o liviana, que es al menos idéntica en un 80% (que tiene al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 80%) a la secuencia de aminoácidos de la región de entramado de cadena pesada y/o liviana del anticuerpo humanizado original de la cadena pesada o liviana, por ej., de cualquiera de las secuencias de región variable pesada y liviana de la SEC ID NO:19 o SEC ID NO:28, respectivamente. Preferentemente, la identidad de secuencia de aminoácidos de la región de entramado de cadena pesada y/o liviana es al menos idéntica en un 85%, más preferentemente al menos 90%, y con la mayor preferencia al menos 95%, en particular 96%, más en particular 97%, aún más en particular 98%, y con la mayor preferencia en particular 99%, incluyendo, por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%. La identidad u homología respecto a esta secuencia se define en la presente como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, luego de la alineación de las secuencias e introducción de brechas, de ser necesario, para lograr la máxima identidad de secuencia porcentual. Por lo tanto, la identidad de secuencia puede determinarse mediante métodos estándares comúnmente utilizados para comparar la similitud en posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Utilizando un programa de computadora tal como BLAST o FASTA, se alinean dos polipéptidos para el cotejo óptimo de sus aminoácidos respectivos (sea a lo largo de la longitud completa de una o ambas secuencias, o a lo largo de una porción pre-determinada de una o ambas secuencias). Los programas proveen una penalización de apertura por defecto (en el original, "default opening penalty") y una penalización de brecha por defecto (en el original, "default gap penalty"), y puede utilizarse una matriz de puntuación tal como PAM250 (una matriz de puntuación estándar; ver Dayhoff et al., en Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3 (1978)) junto con el programa de computadora. Por ejemplo, la identidad porcentual puede calcularse: como el número total de concordancias idénticas multiplicado por 100 y luego dividido por la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro de la extensión equiparada y el número de brechas introducidas en las secuencias más largas con el propósito de alinear las dos secuencias.

Por lo tanto, la presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una región de entramado que es al menos idéntica en un 80% a la región de entramado de la SEC ID NO: 19 y/o una secuencia de región variable de cadena liviana que comprende una región de entramado que es al menos idéntica en un 80% a la región de entramado de la SEC ID NO: 28. La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una región de entramado que es al menos idéntica en un 80% a la región de entramado de la SEC ID NO: 237 y/o una secuencia de región variable de cadena liviana que comprende una región de entramado que es al menos idéntica en un 80% a la región de entramado de la SEC ID NO: 238.

Opcionalmente, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones F27G, L29I, T30S y/o V34W, en HCDR1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones S61P y/o A62S, en HCDR2. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones S24Q, N30S y/o K31N, en LCDR1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones Y50D, T51A, S53N, H55E y/o S56T, en LCDR2. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo las sustituciones F27G, L29I, T30S y/o V34W, en HCDR1; una o más sustituciones, que incluyen las sustituciones S61P y/o A62S, en HCDR2; una o más sustituciones, que incluyen las sustituciones S24Q, N30S y/o K31N, en LCDR1; una o más sustituciones, por ejemplo Y50D, T51A, S53N, H55E y/o S56T, en LCDR2.

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC

ng

ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146) (los polinucleótidos que codifican las regiones variables de cadena pesada mencionadas con anterioridad son provistos por las SEC ID N°: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 y 139, respectivamente).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30) (los polinucleótidos que codifican las regiones variables de cadena liviana mencionadas con anterioridad son provistos por las SEC ID N°: 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 y 127, respectivamente).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146); y una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación provee anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos específicos para vWF que comprenden L5 (SEC ID NO: 23) y H2 (SEC ID NO: 13); L5 (SEC ID NO: 23) y H4 (SEC ID NO: 14); L5 (SEC ID NO: 23) y H5 (SEC ID NO: 15); L5 (SEC ID NO: 23) y H6 (SEC ID NO: 16); L5 (SEC ID NO: 23) y H7 (SEC ID NO: 17); L5 (SEC ID NO: 23) y H8 (SEC ID NO: 18); L4 (SEC ID NO: 24) y H2 (SEC ID NO: 13); L6 (SEC ID NO: 25) y H2 (SEC ID NO: 13); L11 (SEC ID NO: 30) y H2 (SEC ID NO: 13); L7 (SEC ID NO: 26) y H2 (SEC ID NO: 13); L9 (SEC ID NO: 28) y H9 (SEC ID NO: 19); L8 (SEC ID NO: 27) y H9 (SEC ID NO: 19); L7 (SEC ID NO: 26) y H9 (SEC ID NO: 19); L6 (SEC ID NO: 25) y H9 (SEC ID NO: 19); L4 (SEC ID NO: 24) y H9 (SEC ID NO: 19); L5 (SEC ID NO: 23) y H9 (SEC ID NO: 19); L10 (SEC ID NO: 29) y H9 (SEC ID NO: 19); L9 (SEC ID NO: 28) y H9 (SEC ID NO: 19); L9 (SEC ID NO: 28) y H12 (SEC ID NO: 20).

20); L9 (SEC ID NO: 28) y H13 (SEC ID NO: 21); L9 (SEC ID NO: 28) y H14 (SEC ID NO: 22); L11 (SEC ID NO: 30) y H9 (SEC ID NO: 19); o L11 (SEC ID NO: 30) y H14 (SEC ID NO: 22).

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente, que se une a vWF con una afinidad (K_d) de 10 nM o menor, preferentemente 5 nM o menor, más preferentemente 1 nM o menor, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4 nM (por ej., de aproximadamente 0,21, 0,28 o 0,34 a aproximadamente 0,25, 0,32 o 0,38 nM). La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente, que compite para unirse a vWF con una afinidad (K_i) de 100 nM o menor, preferentemente 50 nM o menor, más preferentemente 10 nM o menor, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 5,0 nM (por ej., 0,22, 0,28 o 0,34 a aproximadamente 2,3, 3,5 o 4,7 nM).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente, que se une al dominio A1 de vWF con una afinidad (K_d) de 10 nM o menos, preferentemente 5 nM o menos, más preferentemente 1 nM o menos, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4 nM (por ej., de aproximadamente 0,21, 0,28 o 0,34 a aproximadamente 0,25, 0,32 o 0,38 nM). La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo que compite para unirse al dominio A1 vWF con una afinidad (K_i) de 100 nM o menor, preferentemente 50 nM o menor, más preferentemente 10 nM o menor, con la mayor preferencia al menos aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 5,0 nM (por ej., 0,22, 0,28 o 0,34 a aproximadamente 2,3, 3,5 o 4,7 nM).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que 65°C, preferentemente mayor que 70°C, más preferentemente mayor que 75°C, con la mayor preferencia mayor que 80°C. Para el análisis de termoestabilidad del fragmento FAB, se utilizan mediciones por calorimetría diferencial de barrido, mientras que se identifica una temperatura de fusión media del fragmento FAB en el contexto de una IgG de

30

longitud completa. Esta clase de mediciones calorimétricas son bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica y pueden llevarse a cabo de acuerdo con, por ej., Garber y Demarest (2007), BBRC 355:751-7. Sorprendentemente, se ha descubierto que el anticuerpo humanizado de la presente invención tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que el anticuerpo progenitor no humanizado. Habitualmente, el anticuerpo principal no humanizado es un anticuerpo murino, en particular un anticuerpo murino NMC-4. Por lo tanto, la presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que el anticuerpo progenitor no humanizado.

La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de región hipervariable: HCDR1 (GFSLTDYGVD; SEC ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEC ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNFYDYALDY; SEC ID NO: 9) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEC ID NO: 12), con la condición de que al menos una de LCDR1 y/o LCDR2 no sea SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10) o YTSSLHS (SEC ID NO: 11), respectivamente. Sorprendentemente, los anticuerpos NMC-4 humanizados carentes de LCDR1 y/o LCDR2 NMC-4 retienen afinidad de unión nanomolar por vWF.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede además comprender regiones de entramado de cadena pesada de anticuerpo humano. En algunas realizaciones, las regiones de entramado de cadena pesada corresponden a regiones de entramado de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59. En algunas realizaciones, las regiones de entramado de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59 además comprenden uno o más residuos murinos. En algunas realizaciones, las regiones de entramado de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59 no comprenden uno o más residuos murinos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede además comprender regiones de entramado de cadena liviana de anticuerpo humano. En algunas realizaciones, las regiones de entramado de cadena liviana corresponden a las regiones de entramado de cadena liviana presentes en un anticuerpo



humano derivado de 018. En algunas realizaciones, las regiones de entramado de cadena liviana presentes en un anticuerpo humano derivado de 018 además comprenden uno o más residuos murinos. En algunas realizaciones, las regiones de entramado de cadena liviana presentes en un anticuerpo humano derivado de 018 no comprenden uno o más residuos murinos.

Pueden obtenerse LCDR1 y/o LCDR2 a partir de una fuente humana. En algunas realizaciones, pueden obtenerse LCDR1 y/o LCDR2 del mismo anticuerpo (por ej., un anticuerpo humano). En otras realizaciones, pueden obtenerse LCDR1 y/o LCDR2 de diferentes anticuerpos (por ej., dos anticuerpos humanos). Si se obtiene LCDR2 de una fuente humana, preferentemente es DASNLET (SEC ID NO: 118).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1 (GFSLTGYVD; SEC ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEC ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNIDYALDY; SEC ID NO: 9), LCDR1 (SASQDINKYLN; SEC ID NO: 10), LCDR2 (YTSSLHS; SEC ID NO: 11) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEC ID NO: 12); las regiones de entramado de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado presentes en la secuencia 4-59 de línea germinal de cadena pesada de anticuerpo humano, donde la región de entramado de cadena pesada 1 es QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS (SEC ID NO: 171); la región de entramado de cadena pesada 2 es WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 172); y la región de entramado de cadena pesada 3 es RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 173); y la región de entramado de cadena liviana 1, 2 y 3 correspondiente a las regiones de entramado presentes en la secuencia 018 de línea germinal de cadena liviana de anticuerpo humano, donde la región de entramado de cadena liviana es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 186); la región de entramado de cadena liviana 2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 187); y la región de entramado de cadena liviana 3 es GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC (SEC ID NO: 188).

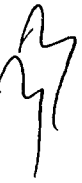
La presente revelación provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1 (GFSLTGYVD; SEC ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEC ID NO: 8), HCDR3

32

(DPADYGNFYDYALDY; SEC ID NO: 9)), LCDR1 (SASQDINKYLN; SEC ID NO: 10), LCDR2 (YTSSLHS; SEC ID NO: 11) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEC ID NO: 12); y las regiones de entramado de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado presentes en la secuencia 4-34 de línea germinal de cadena pesada de anticuerpo humano , donde la región de entramado de cadena pesada 1 es QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY (SEC ID NO:165); la región de entramado de cadena pesada 2 es WIRQPPGKGGLEWIG (SEC ID NO: 166) y la región de entramado de cadena pesada 3 es RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 167); y las regiones de entramado de cadena liviana 1, 2 y 3 correspondiente a regiones de entramado presentes en la secuencia 018 de línea germinal de cadena liviana de anticuerpo humano , donde la región de entramado de cadena liviana 1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 186); la región de entramado de cadena liviana 2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 187); y la región de entramado de cadena liviana 3 es GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYC (SEC ID NO: 188).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para el dominio A1 en vWF que comprende HCDR1 (GFSLTDYGVD; SEC ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEC ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNFYDYALD; SEC ID NO: 9), LCDR1 (SASQDINKYLN; SEC ID NO: 10), LCDR2 (YTSSLHS; SEC ID NO: 11) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEC ID NO: 12); las regiones de entramado de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en un anticuerpo de la familia VH4 de línea germinal de anticuerpo humano; y las regiones de entramado de cadena liviana 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en un anticuerpo de la familia VK1 de línea germinal de anticuerpo humano.

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-04 de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVS (SEC ID NO: 147), FW2: WVRQPPGKGGLEWIG (SEC ID NO: 148) y FW3: RVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 149).



El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-28 de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVS (SEC ID NO: 150), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 151) y FW3: RVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCAR (SEC ID NO: 152).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-30.1 de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS (SEC ID NO: 153), FW2: WIRQHPGKGLEWIG (SEC ID NO: 154) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 155).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-30.2 de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QLQLQESGSGLVKPSQTLSTCAVS (SEC ID NO: 156), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 157) y FW3: RVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 158).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-30.4 de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS (SEC ID NO: 159), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 160) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 161).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-31 de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS (SEC ID NO: 162), FW2: WIRQHPGKGLEWIG (SEC ID NO: 163) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 164).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-34 de línea germinal de

24

cadena pesada (por ej., FW1: QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY (SEC ID NO: 165), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 166) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 167).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-39 de línea germinal de cadena pesada (e.g., FW1: QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEC ID NO: 168), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 169) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 170).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-59 de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEC ID NO: 171), por ej., FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 172) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 173).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-61 de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEC ID NO: 174), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 175) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 176).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 4-b de línea germinal de cadena pesada (por ej., FW1: QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVS (SEC ID NO: 177), FW2: WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 178) y FW3: RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 179).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 012 de línea germinal de cadena kappa (e.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 180), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 181) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 182).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 02 de línea germinal de cadena kappa (e.g., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 183), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 184) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 185).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 018 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 186), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 187) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYC (SEC ID NO: 188).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable 08 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 189), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 190) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYC (SEC ID NO: 191).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a las regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia A20 variable de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 192), FW2: WYQQKPGKVPKLLIY (SEC ID NO: 193) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC (SEC ID NO: 194).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable A30 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 195), FW2: WYQQKPGKAPKRLIY (SEC ID NO: 196) y FW3: GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 197).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L14 de línea germinal de

36

cadena kappa (por ej., FW1: NIQMTQSPSAMSASVGDRVITC (SEC ID NO: 198), FW2: WFQQKPGKVPKHLIY (SEC ID NO: 199) y FW3: GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 200).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L1 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEC ID NO: 201), FW2: WFQQKPGKAPKSLIY (SEC ID NO: 202) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 203).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L15 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEC ID NO: 204), FW2: WYQQKPEKAPKSLIY (SEC ID NO: 205) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 206).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L4 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: AIQLTQSPSSLSASVGDRVITC (SEC ID NO: 207), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 208) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 209).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L18 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: AIQLTQSPSSLSASVGDRVITC (SEC ID NO: 210), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 211) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 212).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L5 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC (SEC ID NO: 213), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 214) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 215).

27

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L19 de línea germinal de cadena kappa (e.g., FW1: DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC (SEC ID NO: 216), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 217) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 218).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L8 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTC (SEC ID NO: 219), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 220) y FW3: GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 221).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L23 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: AIRMTQSPFSLSASVGDRVITTC (SEC ID NO: 222), FW2: WYQQKPAKAPKLFYIY (SEC ID NO: 223) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 224).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L9 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: AIRMTQSPSSFSASTGDRVITTC (SEC ID NO: 225), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 226) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC (SEC ID NO: 227).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L24 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: VIWMTQSPSLLSASTGDRVITISC (SEC ID NO: 228), FW2: WYQQKPGKAPELLIY (SEC ID NO: 229) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC (SEC ID NO: 230).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L11 de línea germinal de

cadena kappa (por ej., FW1: AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEC ID NO: 231), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 232) y FW3: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 233).

El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo puede comprender las regiones de entramado 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en la secuencia variable L12 de línea germinal de cadena kappa (por ej., FW1: DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTC (SEC ID NO: 234), FW2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 235) y FW3: GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC (SEC ID NO: 236).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para el dominio A1 en vWF que comprende: HCDR1 (GFSLTGYVD; SEC ID NO: 7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS; SEC ID NO: 8), HCDR3 (DPADYGNIDYALDY; SEC ID NO: 9), LCDR1 (SASQDINKYLN; SEC ID NO: 10), LCDR2 (YTSSLHS; SEC ID NO: 11) y LCDR3 (QQYEKLPWT; SEC ID NO: 12); las regiones de entramado de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en el anticuerpo humano 4-04 (SEC ID NO: 147, 148 y 149, respectivamente), 4-28 (SEC ID NO: 150, 151 y 152, respectivamente), 4-30.1 (SEC ID NO: 153, 154 y 155, respectivamente), 4-30.2 (SEC ID NO: 156, 157 y 158, respectivamente), 4-30.4 (SEC ID NO: 159, 160 y 161, respectivamente), 4-31 (SEC ID NO: 162, 163 y 164, respectivamente), 4-34 (SEC ID NO: 165, 166 y 167, respectivamente), 4-39 (SEC ID NO: 168, 169 y 170, respectivamente), 4-59 (SEC ID NO: 171, 172 y 173, respectivamente), 4-61 (SEC ID NO: 174, 175 y 176, respectivamente) o 4-b (SEC ID NO: 177, 178 y 179, respectivamente); y las regiones de entramado de cadena liviana 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado 1, 2 y 3 presentes en el anticuerpo humano 012 (SEC ID NO: 180, 181 y 182, respectivamente), 02 (SEC ID NO: 183, 184 y 185, respectivamente), 018 (SEC ID NO: 186, 187 y 188, respectivamente), 08 (SEC ID NO: 189, 190 y 191, respectivamente), A20 (SEC ID NO: 192, 193 y 194, respectivamente), A30 (SEC ID NO: 195, 196 y 197, respectivamente), L14 (SEC ID NO: 198, 199 y 200, respectivamente), L1 (SEC ID NO: 201, 202 y 203, respectivamente), L15 (SEC ID NO: 204, 205 y 206, respectivamente), L4 (SEC ID NO: 207, 208 y 209, respectivamente), L18 (SEC ID NO: 210, 211 y 212, respectivamente), L5 (SEC

13

ID NO: 213, 214 y 215, respectivamente), L19 (SEC ID NO: 216, 217 y 218, respectivamente), L8 (SEC ID NO: 219, 220, y 221, respectivamente), L23 (SEC ID NO: 222, 223 y 224, respectivamente), L9 (SEC ID NO: 225, 226 y 227, respectivamente), L24 (SEC ID NO: 228, 229 y 230, respectivamente), L11 (SEC ID NO: 231, 232 y 233, respectivamente) o L12 (SEC ID NO: 234, 235 y 236, respectivamente).

La presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente que retiene la misma actividad que el anticuerpo progenitor no humanizado o que un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables del anticuerpo progenitor no humanizado y una región Fc humana. Habitualmente, el anticuerpo progenitor no humanizado es un anticuerpo murino, en particular un anticuerpo murino NMC-4. Habitualmente, el anticuerpo quimérico que comprende regiones variables del anticuerpo no humanizado progenitor es un anticuerpo que comprende regiones variables de un anticuerpo murino, en particular de un anticuerpo murino NMC-4 y una región Fc humana. Como región Fc humana, preferentemente se utilizan las regiones Fc humanas descritas en la presente solicitud.

La actividad del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente, del anticuerpo progenitor no humanizado y del anticuerpo quimérico puede medirse como actividad de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina determinando la actividad en EC_{50} según lo descrito, por ejemplo, en el Ejemplo 1. Puede considerarse que un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente retiene la misma actividad del anticuerpo principal no humanizado o del anticuerpo quimérico cuando la actividad en EC_{50} del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente es idéntica a la actividad en EC_{50} o es hasta 50%, preferentemente hasta 30%, preferentemente hasta 20% diferente (por ej., superior o inferior) de la actividad en EC_{50} del anticuerpo principal no humanizado o del anticuerpo quimérico.

En una realización preferida de la presente revelación el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente además comprende una región de entramado de cadena pesada de un anticuerpo

2

humano, donde la región de entramado de cadena pesada humana no comprende uno o más residuos murinos.

En una realización preferida adicional de la presente revelación el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente además comprende una región de entramado de cadena liviana de un anticuerpo humano, donde la región de entramado de cadena liviana humana no comprende uno o más residuos murinos.

“Una región de entramado de cadena pesada humana que no comprende uno o más residuos murinos” o “una región de entramado de cadena liviana humana que no comprende uno o más residuos murinos” hace referencia a una región de entramado de cadena pesada o liviana humana que no comprende uno o más residuos murinos que existen sólo en roedores, por ej., no comprende retromutaciones a residuos que existen sólo en roedores y que no existen en humanos. No se excluyen por parte de esta definición las regiones de entramado de cadena pesada o liviana humana que contienen residuos humanos que existen también en roedores. Tampoco se excluye por parte de esta definición una región de entramado de cadena pesada o liviana humana de la cual se haya mutado un residuo a uno humano común, por ej., a un residuo común a la mayoría de las regiones de entramado humanas pero que existe también en roedores.

En el caso de realizaciones de la presente revelación donde las regiones de entramado de cadena pesada o liviana de anticuerpos humanos además comprenden uno o más residuos murinos, usualmente comprenden 10 o menos, preferentemente 9 o menos, más preferentemente 8 o menos, aún más preferentemente 7 o menos, con la mayor preferencia 6 o menos, en particular 5 o menos, más en particular 4 o menos, incluso más en particular 3 o menos, más en particular 2 o menos, con la mayor particularidad 1 residuo murino.

La presente revelación provee un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28.

La presente revelación provee un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que

comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende regiones CDR correspondientes a las CDR presentes en el anticuerpo murino NMC-4, una región de entramado de cadena pesada correspondiente a la región de entramado presente en la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y una región de entramado de cadena liviana correspondiente a la región de entramado presente en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo específico para vWF humano que comprende: HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNFYDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4). Se expone una secuencia nucleotídica de una región de entramado de cadena pesada humana representativa en la SEC ID NO: 116.

La presente revelación también provee Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende las CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6). Se expone una secuencia nucleotídica de una región de entramado de cadena liviana humana representativa en la SEC ID NO: 117.

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146).

A
C

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146) y una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena liviana del vector GS264 depositada en un microorganismo con DSMZ el 23 de enero de 2008, que tiene el N° de acceso DSM 21059.

La presente revelación también provee un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada del vector GS265 depositada en un microorganismo con DSMZ el 23 de enero de 2008, que tiene el N° de acceso DSM 21060.

Por lo tanto, la presente revelación también provee un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF codificado por la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena liviana del vector GS264 y por la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada del vector GS265.

La presente revelación provee un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena

3

pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28.

La presente revelación provee un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

La presente revelación también provee un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende regiones de CDR correspondientes a las CDR presentes dentro del anticuerpo murino NMC-4, una región de entramado de cadena pesada correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y una región de entramado de cadena liviana correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende: HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO 4).

La presente revelación también provee un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende: las CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9

(SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146).

La presente revelación también provee un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación también provee un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146) y una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación también provee un vector que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena liviana del vector GS264 depositada en un microorganismo con DSMZ el 23 de enero de 2008, que tiene el N° de acceso DSM 21059.

La presente revelación también provee un vector que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada del vector GS265 depositada en un microorganismo con DSMZ el 23 de enero de 2008, que tiene el N° de acceso DSM 21060.

La presente revelación provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28.

La presente revelación provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo

específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

La presente revelación también provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende las regiones CDR correspondientes a las CDR presentes dentro del anticuerpo murino NMC-4, una región de entramado de cadena pesada correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y una región de entramado de cadena liviana correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende: HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4).

La presente revelación también provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende: las CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146).

246

La presente revelación también provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación también provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146) y una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación también provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena liviana del vector GS264 depositada en un microorganismo con DSMZ el 23 de enero de 2008, que tiene el N° de acceso DSM 21059.

La presente revelación también provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada del vector GS265 depositada en un microorganismo con DSMZ el 23 de enero de 2008, que tiene el N° de acceso DSM 21060.

La presente revelación también provee métodos para producir un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende cultivar las células huésped de la presente revelación de modo que se exprese el ácido nucleico y se produzca el anticuerpo. Los métodos para producir el anticuerpo humanizado vWF o fragmento de unión del mismo de la presente revelación pueden además comprender recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede recuperarse del medio de las células huésped. En algunas realizaciones, antes del cultivo, la célula huésped puede co-transfectarse con un vector que comprende un ácido nucleico

2

que codifica una región variable de cadena pesada y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena liviana.

La presente revelación provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28.

La presente revelación provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28 y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La presente revelación provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

La presente revelación provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238 y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La presente revelación provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para el factor von Willebrand humano (vWF) que comprende regiones CDR correspondientes a las CDR presentes en el anticuerpo murino NMC-4, una región de entramado de cadena pesada correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y una región de entramado de cadena liviana correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La presente revelación también provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1: GFSLTGYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2:

4

MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEC ID NO: 9), una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La presente revelación provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende las CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12), una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La presente revelación provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: las CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNYDYALDY (SEC ID NO: 9); las CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12); opcionalmente una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6) y/o una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La presente revelación también provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La presente revelación provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC

6
2

ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

La presente revelación también provee composiciones que comprenden un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146); una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

También se proveen composiciones que comprenden un primer anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente y un segundo anticuerpo que se une al dominio A1 de vWF. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo es AJW-200.

La presente revelación también provee métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno trombótico) en un sujeto (por ej., un humano), método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28.

La presente revelación también provee métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno trombótico) en un sujeto (por ej., un humano), método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

La presente revelación también provee métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno

5

trombótico) en un sujeto (por ej., un humano), método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF humano que comprende regiones CDR correspondientes a las CDR presentes dentro del anticuerpo murino NMC-4, una región de entramado de cadena pesada correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y una región de entramado de cadena liviana correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno trombótico) en un sujeto (por ej., un humano), que comprenden administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNFYDYALDY (SEC ID NO: 9) y una región de entramado de cadena pesada de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4).

El trastorno o enfermedad trombótica puede ser una enfermedad cardiovascular o trastornos cerebrovasculares tales como la apoplejía isquémica. En algunas realizaciones, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con la diabetes. En algunas realizaciones, la enfermedad trombótica es inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad falciforme, rechazo de xenoinjerto, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes. En algunas realizaciones los trastornos cerebrovasculares pueden incluir apoplejía isquémica, resultante tanto de infartos cerebroarteriales como de pequeños infartos lacunares, y demencia vascular. También pueden utilizarse anticuerpos humanizados vWF para la prevención de apoplejías recurrentes o iniciación de apoplejías desencadenadas por inflamación cerebrovascular.

En algunas realizaciones, el trastorno o enfermedad trombótica puede incluir cáncer.

La presente revelación provee métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno trombótico) en un sujeto (por ej., un humano), que comprenden administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende las CDR de cadena liviana LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12) y una región de entramado de cadena liviana de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

La presente revelación también provee métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno trombótico) en un sujeto (por ej., un humano), que comprenden administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146).

La presente revelación provee métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno trombótico) en un sujeto (por ej., un humano), que comprenden administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

La presente revelación también provee métodos para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF (por ej., una enfermedad o trastorno trombótico) en un sujeto (por ej., un humano), que comprenden administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo específico para vWF que comprende una de las siguientes regiones variables de cadena pesada: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14),

AV
4

H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146); y una de las siguientes regiones variables de cadena liviana: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado carece de función efectora. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado comprende una región Fc derivada de IgG₄.

La presente revelación provee un anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo específico para el factor von Willebrand (vWF), que puede administrarse en una cantidad efectiva para uso terapéutico de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces la ED₁₀₀ sin causar signos clínicos significativos de sangrado. Preferentemente, el anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo es específico para el dominio A1 de vWF humano. Más preferentemente, el anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo específico para vWF es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión del mismo específico para vWF.

La presente revelación también provee un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF mediante la administración a un sujeto, preferentemente a un humano, de una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 10 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,4 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,2 mg/kg, y con la mayor preferencia de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/kg.

La presente revelación también provee un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF mediante la administración a un sujeto necesitado del mismo de una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces la ED₁₀₀, preferentemente de

51

aproximadamente 1 a aproximadamente 200 veces la ED₁₀₀, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 veces la ED₁₀₀.

La presente revelación también provee un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF mediante la administración de una dosis o subdosis múltiples de una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente al sujeto necesitado de tal tratamiento.

La presente revelación también provee un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF mediante la administración subcutánea de una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente a un sujeto necesitado de tal tratamiento.

La presente revelación también provee un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF mediante la administración intravenosa de una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente a un sujeto necesitado de tal tratamiento.

La presente revelación también provee un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF mediante la administración intravenosa de una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente, en serie o en combinación con tratamientos radiológicos (por ej., irradiación o introducción de sustancias radioactivas—tales como las citadas en UICC (Ed.), *Klinische Onkologie*, Springer-Verlag (1982)) a un sujeto necesitado de tal tratamiento.

Aunque puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la práctica o ensayo de la presente revelación, se describen los métodos y materiales preferidos.

Producción de Anticuerpos Humanizados del Factor Von Willebrand

Se proveen métodos para producir un anticuerpo humanizado del Factor von Willebrand (vWF) (por ej., el NMC-4 murino) o fragmento de unión del mismo. Puede producirse un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF mediante la transferencia de una o más CDR o porciones de las mismas de regiones VH y/o VL de un animal no humano (por ej., ratón) a una o

34

más regiones de entramado de regiones VH y/o VL humanas. Opcionalmente, pueden reemplazarse residuos de entramado humanos presentes en las regiones VH y/o VL con residuos no humanos correspondientes (por ej., de ratón) cuando se requiera o desee para mantener la afinidad de unión. Opcionalmente, pueden reemplazarse residuos de aminoácidos no humanos presentes en las CDR con residuos humanos.

Las clasificaciones de los entramados y CDR descritos en la presente (excepto HFR1 u HCDR1) se basan en el sistema de numeración de Kabat. En esta definición, las CDR de la cadena pesada contienen los residuos 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); las de la cadena liviana se definen como constituidas por los residuos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). Las regiones de entramado de VH (por ej., región de entramado de cadena pesada 1 (HFR1), región de entramado de cadena pesada 2 (HFR2), región de entramado de cadena pesada 3 (HFR3) y/o región de entramado de cadena pesada 4 (HFR4)) se definen como constituidas por los residuos 1-30 (HFR1), 36-49 (HFR2), 66-94 (HFR3); y 103-113 (HFR4); las de VL contienen los residuos 1-23 (LFR1), 35-49 (LFR2), 57-88 (LFR3) y 98-107 (LFR4) (Wu and Kabat, 1970 *J. Exp. Med.* 132:211). Sin embargo, tomando como base la estructura de las CDR, Chothia definió la CDR1-H como compuesta por los residuos 26-32 (Chothia *et al.*, 1992 *J. Mol. Biol.* 227: 799). La definición de AbM (modelado de anticuerpo) es un compromiso entre las dos utilizadas por el software de modelado de anticuerpos *AbM* de Oxford Molecular, donde la CDR1-H contiene los residuos 26-35. Esta es la definición utilizada para los métodos de humanización descritos en la presente utilizando NMC-4.

Puede producirse un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para el factor von Willebrand (vWF) mediante la transferencia de regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) de NMC-4 a una región de entramado de cadena pesada correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4); y la transferencia de CDR de cadena liviana de NMC-4 a una región de entramado de cadena liviana correspondiente a la región de entramado de la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

También puede producirse un anticuerpo humanizado específico para vWF mediante la transferencia de una o más CDR de cadena pesada (por ej., HCDR1: GFSLTDYGVN (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9)) del NMC-4 murino a una región de entramado humano (por ej., desde la región variable de AAC18165.1 (SEC ID NO: 4)).

También puede producirse un anticuerpo humanizado específico para vWF mediante la transferencia de una o más CDR de cadena liviana (por ej., LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12)) a una región de entramado humano (por ej., desde la región variable de AAK94808 (SEC ID NO: 6)).

Puede producirse un anticuerpo humanizado específico para vWF mediante la transferencia de una o más CDR de cadena pesada (por ej., HCDR1: GFSLTDYGVN (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9)) del NMC-4 murino a una región de entramado humano (por ej., la región variable de ACC18165.1.1 (SEC ID NO: 4)), y la transferencia de una o más CDR de cadena liviana (por ej., LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12)) a una región de entramado humano (por ej., desde la región variable de AAK93808 (SEC ID NO: 6)).

Puede producirse un anticuerpo humanizado específico para vWF mediante la transferencia de una región variable de cadena pesada modificada que comprende CDR presentes en NMC-4 y regiones de entramado humanas (por ej., H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146)) a una región humana constante.

También puede producirse un anticuerpo humanizado específico para vWF mediante la transferencia de una región variable de cadena liviana modificada que comprende CDR presentes en NMC-4 y regiones de entramado humanas (por ej., L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30) a una región humana constante.

18

Puede producirse un anticuerpo humanizado específico para vWF mediante la transferencia de una región variable de cadena pesada modificada que comprende CDR presentes en NMC-4 y regiones de entramado humanas (por ej., H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146) a una región humana constante; y una región variable de cadena liviana modificada que comprende CDR presentes en NMC-4 y regiones de entramado humanas (por ej., L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30) a una región humana constante.

En un intento por reducir aún más la antigenicidad de los anticuerpos humanizados, pueden cambiarse (por ej., sustituirse) residuos de las CDR (por ej., residuos murinos) en lugar de un residuo de aminoácido humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones F27G, L29I, T30S y/o V34W en HCDR1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones S61P y/o A62S en HCDR2. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones S24Q, N30S y/o K31N en LCDR1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones, por ejemplo Y50D, T51A, S53N, H55E y/o S56T, en LCDR2. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede comprender una o más sustituciones F27G, L29I, T30S y/o V34W en HCDR1; una o más sustituciones S61P y/o A62S en HCDR2; una o más sustituciones S24Q, N30S y/o K31N en LCDR1; y una o más sustituciones Y50D, T51A, S53N, H55E y/o S56T en LCDR2.

Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. En forma alternativa, el anticuerpo humanizado o anticuerpo maduro por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo de anticuerpos humanizados. Tradicionalmente, estos fragmentos se

2

derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ej., Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117 (1992); y Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, actualmente, estos fragmentos pueden producirse en forma directa mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las genotecas de fagos de anticuerpos descritas con anterioridad. Alternativamente, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH en forma directa de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ en forma directa de cultivos de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Ver WO 1993/16185; la Patente de los Estados Unidos N° 5.571.894; y la Patente de los Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede también ser un "anticuerpo lineal", por ej., como el descrito, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 5.641.870.

De acuerdo con un enfoque diferente, pueden fusionarse dominios de anticuerpo variables con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) a secuencias de dominio constante de inmunoglobulinas. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para unión a cadena liviana, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de inmunoglobulina de cadena pesada y, si se desea, la cadena liviana de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo huésped apropiado. Esto proporciona flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las cuales relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proveen rendimientos optimizados. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras para las dos o tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas

5

en relaciones iguales producir rendimientos elevados o cuando las relaciones no son de particular importancia.

La revelación también se refiere a inmunokonjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ej., una toxina de molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

La presente revelación además contempla un inmunokonjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ej., una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Se dispone de una variedad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos de vWF radioconjugados humanizados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico utilizando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolién 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina según lo descrito en Vitetta et al. *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante representativo para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Ver WO 1994/11026. El conector puede ser "un conector escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un conector sensible a los ácidos, un conector sensible a la peptidasa, un conector dimetilo o un conector que contenga disulfuro (Chari et al. *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992)).

5

Alternativamente, puede prepararse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo humanizado de vWF y un agente citotóxico, por ej., mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

Inclusive en otra realización, el anticuerpo humanizado de vWF puede estar conjugado a un "receptor" (tal como estreptoavidina) para utilizar en la pre-localización de un tumor cuando el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido del retiro del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de depuración y luego de la administración de un "ligando" (por ej., avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ej., un radionucleótido).

Los anticuerpos de la presente revelación pueden también utilizarse en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo humanizado de vWF a un enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ej., un agente peptídico quimioterapéutico, ver WO 1981/01145) en un fármaco anti-cáncer activo (ver, por ej., WO 1988/07378 y la Patente de los Estados Unidos Nº 4.975.278).

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima con capacidad de acción sobre un profármaco de modo tal que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-cáncer, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de β -aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa, útil para convertir profármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir profármacos derivatizados en sus nitrógenos amínicos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como

"abzimas", para convertir los profármacos de la revelación en fármacos activos libres (ver, por ej., Massey, *Nature*, 328:457-458 (1987)). Pueden prepararse conjugados anticuerpo-abzima según lo descrito en la presente para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas pueden unirse en forma covalente a los anticuerpos humanizados de vWF mediante técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los agentes reticulantes heterobifuncionales tratados con anterioridad. Alternativamente, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo de la revelación conectada al menos a una porción funcionalmente activa de una enzima apropiada, utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (ver, por ej., Neuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984)).

Se contemplan en la presente otras modificaciones de los anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo puede unirse a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ej., polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo puede también atraparse dentro de microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, cápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se revelan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^{ta} ed., Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos humanizados de vWF revelados en la presente pueden también formularse como inmunoliposomas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo por métodos conocidos en la técnica, según lo descrito en Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y WO 1997/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Se revelan liposomas con tiempo de circulación mejorado en la Patente de los Estados Unidos N° 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el método de evaporación en fase reversa con una composición lipídica que comprende

fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen liposomas a través de filtros con tamaños de poro definidos para dar liposomas del diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' de la presente revelación a los liposomas, según lo descrito en Martin et al. *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuros. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico. Ver Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

Vectores, Células Huésped y Métodos Recombinantes

La presente revelación provee ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos humanizados específicos para vWF y fragmentos de unión de los mismos, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción de un anticuerpo o fragmento de unión del mismo.

Para la producción recombinante de un anticuerpo, puede aislarse el ácido nucleico que lo codifica e insertarse en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para expresión. Puede aislarse un ADN que codifica un anticuerpo monoclonal y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ej., mediante el uso de sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a genes que codifican cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo). Se dispone de numerosos vectores. En general, los componentes del vector incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente Secuencia Señal

Pueden producirse anticuerpos humanizados de vWF descritos en la presente en forma recombinante, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de ruptura específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. Preferentemente, una secuencia señal heteróloga puede ser una reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal nativa del anticuerpo humanizado de vWF, la secuencia señal puede ser sustituida por una secuencia

señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasas, lpp, o líderes de la enterotoxina II termoestables. Para secreción de levaduras, una secuencia señal nativa puede ser sustituida, por ej., por una secuencia líder de invertasa de levadura, una líder del factor α (que incluye líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), una líder de la -fosfatasa ácida, una líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o una señal descrita en WO 1990/13646. En la expresión de células de mamíferos, se dispone de secuencias señal de mamíferos y también de líderes secretoras virales, por ejemplo la señal gD del herpes simplex.

El ADN para dicha región precursora puede ligarse en marco de lectura a un ADN que codifica un anticuerpo humanizado de vWF.

(ii) *Componente Origen de Replicación*

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en vectores de clonación, esta secuencia puede permitir al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Tales secuencias son conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es apropiado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es apropiado para levaduras y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el componente origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (típicamente, puede utilizarse el origen SV40 sólo porque contienen el promotor temprano).

(iii) *Componente Gen de Selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas de o (c) proveen nutrientes necesarios o deseados no disponibles de medios complejos, por ej., el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

3
6

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y así sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otros ejemplos de marcadores seleccionables apropiados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para tomar el ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado de vWF, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican en primer lugar mediante el cultivo de transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.

Alternativamente, pueden seleccionarse células huésped (en particular huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo humanizado de vWF, proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH), mediante crecimiento celular en un medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ej., kanamicina, neomicina o G418 (ver, por ej., la Patente de los Estados Unidos N° 4.965.199).

Un gen de selección apropiado para usar en levaduras puede ser el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* provee un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptofano, por ejemplo ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura provee un ambiente efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptofano. En forma similar, pueden complementarse cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20622 o 38626) con plásmidos conocidos portadores del gen Leu2.

Además, pueden utilizarse vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1,6 μ m para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. En forma alternativa, se reporta un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han revelado vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúmina de suero humano madura recombinante mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

(iv) *Componente Promotor*

Habitualmente, los vectores de expresión y clonación contienen un promotor que puede ser reconocido por el organismo huésped y que puede estar operativamente unido al ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado de vWF. Los promotores apropiados para usar con huéspedes procariotas incluyen un promotor *phoA*, sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptofano (*trp*) y promotores híbridos tales como un promotor *tac*. Sin embargo, son apropiados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para usar en sistemas bacterianos también pueden contener una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN que codifica un anticuerpo humanizado de vWF.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Los genes eucariotas tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde puede iniciarse la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de transcripción de numerosos genes es una región CNCAAT (SEC ID NO: 31) donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas se encuentra una secuencia AATAAA (SEC ID NO: 32) que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificadora. Estas secuencias pueden insertarse en forma adecuada en los vectores de expresión eucariotas. Los ejemplos de secuencias promotoras apropiadas para usar con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato

mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento, pueden ser las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores apropiados para usar en la expresión de levadura se describen en forma adicional (ver, por ej., la Patente europea 73.657). Ventajosamente, también se utilizan mejoradores de levadura con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo humanizado de vWF a partir de vectores de células huésped de mamíferos puede ser controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus A, virus de la hepatitis B y más preferentemente Virus de los Simios 40 (SV40), promotores de mamíferos heterólogos, por ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y promotores del shock térmico, con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 pueden obtenerse en forma apropiada como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen viral de replicación de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene en forma apropiada como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos utilizando el virus de papiloma bovino como vector (ver, por ej., la Patente de los Estados Unidos Nº 4.419.446). Se describe una modificación de este sistema, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nº 4.601.978. Reyes *et al.*, *Nature*, 297:598-601 (1982) describe la expresión del ADN de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus herpes simplex. En forma alternativa, puede utilizarse como promotor el duplicado del terminal largo del virus del sarcoma rous.

66

(v) *Componente Elemento Potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica anticuerpos humanizados de vWF de esta revelación por parte de eucariotas superiores puede aumentarse por inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente, se conocen secuencias potenciadoras útiles a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente, puede utilizarse una secuencia potenciadora de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 sobre el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus sobre el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores del adenovirus. Yaniv, *Nature*, 297:17-18 (1982) también describe elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. Un potenciador puede ligarse en el vector a una posición 5' o 3' a la secuencia codificadora del anticuerpo humanizado de vWF, pero preferentemente se ubica en un sitio 5' del promotor.

(vi) *Componente de Terminación de la Transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (por ejemplo, de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias se encuentran normalmente disponibles en el extremo 5', ocasionalmente el extremo 3', de regiones no traducidas de ADN o ADNc eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo humanizado de vWF. Un componente de terminación de la transcripción útil es una región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (ver, por ej., WO 1994/11026 y los vectores de expresión allí revelados).

(vii) *Selección y Transformación de Células Huésped*

Las células huésped apropiadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores incluyen diversas células procariotas, de levadura, o de eucariotas superiores. Los procariotas apropiados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ej., *E. coli*, *Enterobacter*,

26

Erwinia, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ej. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ej. *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como también *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Las variantes de *E. coli* que sirven como huéspedes de clonación incluyen *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325).

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión apropiados para los vectores que codifican el anticuerpo humanizado de vWF. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es útil para la expresión. Además, se dispone de una cantidad de otros géneros, especies y cepas y pueden ser útiles, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces* tales como, por ej., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ej., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped apropiadas para la expresión del anticuerpo humanizado de vWF glicosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células eucariotas incluyen células de plantas, insectos y vertebrados. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y células huésped de insectos permisivos correspondientes 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 transfección se encuentra públicamente disponible, por ej., la variante L-1 de NPV *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV *Bombyx mori*, y tales virus pueden utilizarse como virus de acuerdo con la presente revelación, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Pueden también utilizarse como huéspedes, cultivos celulares de plantas de algodón, maíz, papa, soja, petunia, tomate y tabaco.

66

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles incluyen células ChK2 (Chromos Molecular Systems Inc.); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de riñón de cachorro de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células embrionarias 293 de riñón humano (HEK) (Simmons, 1990 *Exp Physiol.* 75:309); células de fusión de bazo-mieloma SP2 (Haas y Wabl, 1984, *PNAS* 81:7185); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980), que incluyen las líneas celulares DG44 (Urlaub *et al.*, *Som. Cell and Mol. Gen.*, 12: 555-566 (1986)) y DP12); 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 cervical 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 pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (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; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Se transforman células huésped con los vectores de expresión o clonación descritos con anterioridad para la producción del anticuerpo humanizado de vWF y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según corresponda para la inducción de promotores, selección de transformantes, o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

También pueden utilizarse líneas celulares estables que expresen niveles elevados de anticuerpo para producir el anticuerpo humanizado de la presente revelación. Por ejemplo, un sistema de expresión de proteína de mamífero de alto rendimiento, basado en una plataforma de Expresión de Cromosomaa Artificiales (ACE) murinos que ha sido manipulada genéticamente para contener múltiples sitios aceptores de recombinación específicos de sitio, puede cargarse con secuencias heterólogas de genes utilizando una lambda integrasa mutante (por

ej., ACE integrasa) en combinación con un vector transportador de localización (Lindenbaum *et al.*, (*Nucl. Acid Res.* 32 (21):e172 (2004); Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Nos. 2003/0119104A1 y 2006/0246586 A1). Este sistema puede utilizarse para generar líneas celulares estables para la expresión de variantes humanizadas seleccionadas y la quimera NMC-4.

(viii) *Cultivo de las Células Huésped*

Las células huésped útiles para la producción de un anticuerpo humanizado de vWF pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios disponibles en el comercio tales como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son apropiados para cultivar las células huésped. Además, puede utilizarse cualquiera de los medios descritos, por ejemplo, en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979); Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980); en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 o 5.122.469; WO 1990/03430; WO 1987/00195; o en la Patente de los Estados Unidos Re. 30.985, como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (por ej., insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (por ej., cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), buffers (por ej., HEPES), nucleótidos (por ej., adenosina y timidina), antibióticos (por ej., el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario en concentraciones apropiadas que serán conocidas por aquellos con experiencia en la técnica. Puede utilizarse una variedad de condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, con la célula huésped seleccionada para expresión.

(ix) *Purificación del Anticuerpo humanizado de vWF*

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, puede producirse un anticuerpo en forma intracelular o en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si un anticuerpo se produce en forma intracelular, como un primer paso, pueden eliminarse residuos particulados, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*,



Bio/Technology, 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. En general, cuando se secreta un anticuerpo al medio, se concentran primero los sobrenadantes de tales sistemas de expresión, incluyendo el uso de un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo una unidad de ultrafiltración AMICON™ o MILLIPORE PELLICON™. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en cualquiera de los pasos precedentes para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

Una composición de anticuerpo preparada con células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede utilizarse proteína A para purificar anticuerpos basados en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)). Puede utilizarse proteína G para isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.*, 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une un ligando de afinidad puede ser agarosa, pero se dispone de otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poros controlados o poli(estirendivinil)benceno permiten mayores caudales de flujo y menores tiempos de procesamiento que los que pueden lograrse con agarosa. Cuando un anticuerpo comprende un dominio C_H3 , puede utilizarse la resina BAKERBOND ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) para purificación. También se encuentran disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-

PAGE, y precipitación con -sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Formulaciones Farmacéuticas

Se proveen formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo humanizado específico para vWF. Pueden prepararse formulaciones de anticuerpos humanizados de vWF para conservar mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales aceptables para uso farmacéutico (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^{ta} ed., Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen buffers tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ej., complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Se describen formulaciones liofilizadas de anticuerpo humanizado de vWF preferidas en WO 1997/04801, expresamente incorporada en la presente como referencia.

La formulación de la presente puede también contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten perjudicialmente entre sí. En forma alternativa, o adicional, la composición puede además comprender un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente anti-hormonal, un

AV
7

fármaco humanizado para vWF, un agente anti-angiogénico y/o un cardioprotector. Tales moléculas están apropiadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para los fines buscados.

Los componentes activos también pueden encerrarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se revelan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^{ta} ed., Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ej. películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ej., poli(2-hidroxietil-metacrilato), o alcohol polivinílico, polilactatos (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, de etileno- acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPO™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. La esterilización puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Tratamiento con Anticuerpos humanizados de vWF

Pueden utilizarse anticuerpos humanizados de vWF o fragmentos de unión de los mismos para tratar diversas enfermedades o trastornos relacionados con vWF. Las afecciones o trastornos representativos incluyen enfermedades o trastornos trombóticos. Las enfermedades o trastornos trombóticos pueden incluir enfermedad cardiovascular o trastornos cerebrovasculares tales como apoplejía isquémica. En algunas realizaciones, una enfermedad cardiovascular puede ser aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario



agudo o trastornos cardiovasculares asociados con la diabetes. En algunas realizaciones, una enfermedad trombótica puede ser cualquier inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad falciforme, rechazo de xenoinjerto, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes. En algunas realizaciones los trastornos cerebrovasculares incluyen apoplejía isquémica, resultante tanto de infartos cerebroarteriales como de pequeños infartos lacunares, y demencia vascular. También pueden utilizarse anticuerpos humanizados de vWF para la prevención de apoplejías recurrentes o iniciación de apoplejías desencadenadas por inflamación cerebrovascular. En el caso de síndrome coronario agudo, los anticuerpos humanizados de vWF o fragmentos de unión de los mismos son particularmente apropiados para el tratamiento de sujetos diagnosticados con el segmento ST. Los anticuerpos humanizados de vWF o fragmentos de unión de los mismos pueden también utilizarse para tratamiento pos-quirúrgico para evitar la formación de coágulos.

Más aún, la sobreexpresión o amplificación de vWF puede evaluarse utilizando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ej., administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une a la molécula a detectar y que se rotula con un marcador detectable (por ej., un isótopo radioactivo) y realizando un barrido externo del paciente para localización del marcador.

En ciertas realizaciones, puede administrarse al paciente un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humanizado de vWF conjugado con un agente citotóxico. Preferentemente, un inmunoconjugado y/o anticuerpo humanizado de vWF al que está unido es internalizado por la célula, determinando un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado para eliminar la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferida, un agente citotóxico (que incluye, por ejemplo, maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas, y ADN endonucleasas) localiza o interfiere con un ácido nucleico en la célula cancerosa. En otra realización, un agente citotóxico (por ej., taxanos o epotilonas) puede localizar o interferir con microtúbulos y con la mitosis dependiente de microtúbulos en la célula cancerosa.

Pueden administrarse anticuerpos humanizados de vWF o inmunoconjugados a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos,

74

tales como administración intravenosa, por ej., en bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramusculares, intraperitoneales, intracerebroespinales, subcutáneas, intra-articulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicas o inhalatorias. Se prefiere la administración intravenosa, intraperitoneal o subcutánea del anticuerpo, siendo particularmente preferidas las vías subcutánea o intraperitoneal. Un programa de administración preferido puede ser una dosis única para un trastorno agudo o aproximadamente una cada tres o cuatro semanas para un trastorno crónico, dependiendo del mamífero particular bajo tratamiento, del tipo de anticuerpo y de otros factores bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Sin embargo, otros programas de administración son operables en la presente.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo humanizado de vWF. Una administración combinada incluye la co-administración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde, preferentemente, puede existir un período de tiempo durante el cual ambos (o todos los) agentes activos ejercen su actividades biológicas en forma simultánea.

En una realización, el tratamiento puede involucrar la administración combinada de un anticuerpo anti-vWF humanizado con agentes fibrinolíticos tal como alteplase, desmoteplase o microplasmina y/o agentes antiplaquetarios tales como aspirina, dipiridamol o clopidogrel para el tratamiento de isquemia inducida por infarto de miocardio o infarto cerebral u otros trastornos cerebrovasculares.

También puede ser deseable combinar la administración de un anticuerpo o anticuerpos humanizados de vWF con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado con un tumor.

En una realización, el tratamiento de la presente revelación involucra la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) humanizado(s) de vWF y uno o más reguladores de la función inmune en un mamífero, tales como citoquinas, así como también agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluyen la co-administración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de tipo antraciclina. La preparación y programaciones de dosificación para tales agentes terapéuticos

23

pueden utilizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determinado en forma empírica por el experto en la técnica. La preparación y programaciones de dosificación de tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service, Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

Un anticuerpo humanizado de vWF puede combinarse con un compuesto anti-hormonal, por ej. un compuesto anti-estrógeno tal como tamoxifeno o un inhibidor de aromatasa tal como anastrozol; una anti-progesterona tal como onapristona (ver, EP 616 812); o un anti-andrógeno tal como flutamida, en dosis conocidas para tales moléculas. Cuando el cáncer a tratar es un cáncer independiente de hormonas, un paciente puede haberse sometido previamente a terapia anti-hormonal y, luego de que el cáncer se torna independiente de hormonas, puede administrarse al paciente el anticuerpo humanizado de vWF (y opcionalmente otros agentes descriptos en la presente).

Para la prevención o tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, según lo definido con anterioridad, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se puede administrar con fines preventivos o terapéuticos, y del criterio del profesional a cargo. El anticuerpo puede administrarse en forma apropiada al paciente en una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, y de la velocidad de depuración del anticuerpo, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ej., 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados con anterioridad. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento puede mantenerse hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

Una dosis preferida de un anticuerpo humanizado de vWF puede estar en el rango de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de

las mismas). Tales dosis pueden administrarse en forma intermitente, por ej. cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas (por ej., de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ej. aproximadamente seis dosis del anticuerpo humanizado de vWF). Puede administrarse una dosis de carga mayor inicial, seguida de una o más dosis menores. Un régimen de dosificación representativo comprende la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo humanizado de vWF o fragmento de unión del mismo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia puede monitorearse fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

En estudios para evaluar la eficacia y seguridad de un anticuerpo humanizado de vWF o fragmento de unión del mismo descrito en la presente en mandriles, sorpresivamente se ha descubierto que un anticuerpo humanizado tal es efectivo en la prevención (por ej., reducción, disminución o alivio) de la agregación plaquetaria in vivo a una dosis muy baja, por ej., en el rango bajo de $\mu\text{g/kg}$, lo que es un resultado inesperado e inédito para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF. No se observan en estas concentraciones signos clínicos de sangrado, con la excepción de un aumento en el sangrado de pequeños cortes (por ej., prolongación del tiempo de sangrado de plantilla y/o volumen de sangrado medido en el ensayo de sangrado incisional). Lo que es inclusive más sorprendente, en dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces la ED_{100} , no se observan signos clínicos significativos de sangrado, aunque se observa un aumento en el sangrado de pequeños cortes. En consecuencia, un anticuerpo humanizado de vWF o un fragmento de unión del mismo descrito en la presente aparenta ser efectivo para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF en humanos.

Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente puede entonces administrarse a un sujeto, preferentemente a un humano, con una cantidad efectiva para uso terapéutico que oscila entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 mg/kg. Preferentemente, se administra a un sujeto, con preferencia a un humano, una cantidad efectiva para uso terapéutico que oscila entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 20

mg/kg, más preferentemente una cantidad efectiva para uso terapéutico que oscila entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 10 mg/kg, en particular de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 0,4 mg/kg, más en particular de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,2 mg/kg, y más en particular de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/kg. Puede administrarse una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo a un sujeto en una o más dosis efectivas para uso terapéutico. Una cantidad efectiva para uso terapéutico administrada es habitualmente insuficiente para causar signos clínicos significativos de sangrado pero suficiente para inhibir la agregación plaquetaria, es decir que puede administrarse una cantidad efectiva para uso terapéutico sin causar signos clínicos significativos de sangrado (por ej., sin causar signos clínicos de sangrado excepto por un aumento del sangrado de cortes pequeños).

Puede administrarse a un sujeto, preferentemente a un humano, un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente, a una dosis efectiva para uso terapéutico que oscila entre aproximadamente 0,002 y aproximadamente 0,4 mg/kg o en particular entre aproximadamente 0,005 y aproximadamente 0,2 mg/kg, más en particular entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,1 mg/kg para producir un efecto terapéutico (por ej., una reducción en la formación de trombos) en un sujeto.

Puede administrarse un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente en una cantidad efectiva para uso terapéutico que oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 250 veces la ED_{100} , preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 veces la ED_{100} , más preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 veces la ED_{100} sin causar signos clínicos significativos de sangrado (por ej., sin causar signos clínicos de sangrado excepto por un aumento en el sangrado de cortes pequeños). Puede administrarse una cantidad efectiva para uso terapéutico de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo descrito en la presente como una dosis única o múltiples sub-dosis al sujeto. Las dosis efectivas para uso terapéutico anteriores se prefieren para administración intravenosa. En la administración por vía subcutánea, la cantidad total preferida administrada puede

estar en el rango de aproximadamente una a tres veces la cantidad administrada por vía intravenosa, con preferencia aproximadamente dos veces.

Los signos clínicos de sangrado pueden referirse a la clasificación BleedScore descrita por Serebruany y Atar (American Journal of Cardiology, 2007, Volumen 99, Número 2, 15 de Enero de 2007, Páginas 288-290) y aplicada a modelos animales. La BleedScore se ha desarrollado específicamente para clasificar el tipo de sangrado que es característico para las terapias antiplaquetarias. La BleedScore se basa en la asignación de puntos a hallazgos clínicos que dependen de la gravedad de la hemorragia. Mediante la adición de todos los puntos de todos los hallazgos, se deriva un puntaje resultante. Los síntomas de sangrado se dividen en tres categorías de gravedad creciente: 1) sangrado superficial (un punto por evento) 2) sangrado interno (3 puntos por evento) 3) sangrado alarmante, o una combinación de estos (6 puntos por evento). Este enfoque es particularmente útil en la determinación y reporte de eventos de sangrado leves a moderados asociados con terapias antiplaquetarias y antitrombóticas modernas, mientras que también da cuenta de las complicaciones hemorrágicas más severas. El sangrado superficial comprende los siguientes criterios: facilidad para la formación de magulladuras, sangrado de cortes pequeños (por ej., tiempo de sangrado de plantilla prolongado), petequia, equimosis. El sangrado interno comprende los siguientes criterios: Hematoma, epistaxis, pérdida de sangre por la boca, vagina, melena, sangrado ocular, hematuria, hematemesis. El sangrado alarmante comprende los siguientes criterios: Necesidad de transfusión, intracraneal, potencialmente fatal.

La inhibición de la agregación plaquetaria (inhibición de la agregación plaquetaria o suficiente para inhibir la agregación plaquetaria) puede indicar que la cantidad efectiva para uso terapéutico administrada es suficiente para inhibir la formación de un trombo oclusivo en una arteria lesionada en forma artificial en un modelo animal de lesión arterial medido por el monitoreo del flujo sanguíneo a través de la arteria. Un enfoque para determinar la inhibición in vivo de la agregación plaquetaria de un modo cuantitativo comprende la medición de reducciones del flujo cíclico (CFR) en un modelo de lesión arterial. Por lo tanto, por ejemplo, la inhibición de la agregación plaquetaria puede indicar que la cantidad



efectiva para uso terapéutico administrada es suficiente para reducir el número de CFR en un animal.

Cantidad efectiva para uso terapéutico o cantidad efectiva puede referirse a una cantidad efectiva para aliviar o prevenir los síntomas, o para prolongar la supervivencia del sujeto tratado. La determinación de una cantidad efectiva para uso terapéutico se encuentra dentro de las capacidades de aquellos con experiencia en la técnica, en especial a la luz de la revelación detallada provista en la presente. Una cantidad efectiva para uso terapéutico descrita en la presente incluye una cantidad de un anticuerpo de vWF efectiva para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF en un sujeto. Una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo de vWF incluye una cantidad requerida para tratar o inhibir la agregación plaquetaria (por ej., durante una trombosis en arterias principales, arterias periféricas, arteriolas o venas).

Dosis efectiva para uso terapéutico o dosis efectiva puede referirse a una dosis efectiva para aliviar o prevenir los síntomas, o para prolongar la supervivencia del sujeto tratado. Una dosis efectiva para uso terapéutico descrita en la presente incluye una dosis de un anticuerpo de vWF efectiva para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF en un sujeto. Una dosis efectiva para uso terapéutico descrita en la presente incluye una dosis que inhibe la agregación plaquetaria (por ej., durante una trombosis en arterias principales, arterias periféricas, arteriolas o venas). Una dosis efectiva para uso terapéutico incluye una ED_{100} que es la dosis efectiva suficiente para reducir en un 100% la formación de un trombo medida por la reducción del flujo sanguíneo en un vaso sanguíneo. La ED_{100} descrita en la presente incluye una cantidad de anticuerpo de vWF suficiente para reducir a cero el número de reducciones de flujo durante un período de 30 minutos. Las dosis efectivas para uso terapéutico incluyen aquellas dosis que producen una reducción en la formación de trombos, por ejemplo una dosis suficiente para reducir en al menos aproximadamente 15%, preferentemente en al menos 30%, más preferentemente en al menos 50%, con la mayor preferencia en al menos 80%, en particular en al menos 100% la formación de un trombo medida por la reducción del flujo sanguíneo en un vaso sanguíneo o por ensayos ex vivo apropiados que miden la reducción de la agregación plaquetaria.

Alternativamente, puede administrarse en forma apropiada un anticuerpo humanizado de vWF, en serie o en combinación con tratamientos radiológicos (por ej., irradiación o introducción de sustancias radioactivas—tales como las citadas en UICC (Ed.), *Klinische Onkologie*, Springer-Verlag (1982)).

Así, la presente revelación también provee un anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo específico para el factor von Willebrand (vWF), que puede administrarse en una cantidad efectiva para uso terapéutico que oscila entre aproximadamente 1 vez y aproximadamente 250 veces la ED₁₀₀ sin causar signos clínicos significativos de sangrado. Preferentemente, el anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo es específico para el dominio A1 del vWF humano. Preferentemente, el anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo específico para vWF es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión del mismo específico para vWF.

Artículos de Fabricación

En otra realización de la revelación, se provee un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos con anterioridad (por ej., un anticuerpo humanizado de vWF). El artículo de fabricación puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado con el envase. Los recipientes apropiados incluyen, por ejemplo, frascos, viales o jeringas. Los recipientes pueden estar constituidos por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que puede ser efectiva para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ej., el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición puede ser el anticuerpo humanizado de vWF descrito en la presente. La etiqueta o prospecto puede indicar que la composición puede utilizarse para tratar la afección de elección, tal como cáncer. En una realización, la etiqueta o prospecto puede indicar que la composición que comprende el anticuerpo humanizado de vWF puede utilizarse para tratar un trastorno relacionado con vWF.

Más aún, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende el anticuerpo humanizado de la presente, y (b) un segundo recipiente

81

con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un agente terapéutico diferente del anticuerpo humanizado. El artículo de fabricación de esta realización de la revelación puede además comprender un prospecto que indique que la primera y segunda composiciones pueden utilizarse combinadas para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con vWF. Tal agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias adjuntas descriptas en la sección precedente (por ej., un agente trombolítico, un agente anti-plaquetario, un agente quimioterapéutico, un agente anti-angiogénico, un compuesto anti-hormonal, un cardioprotector y/o un regulador de la función inmune en un mamífero, incluyendo una citoquina). En forma alternativa, o adicional, el artículo de fabricación puede además comprender un segundo (o tercer) recipiente que comprende un buffer aceptable para uso farmacéutico, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina bufferizada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Éste puede además incluir otros materiales deseables desde un punto de visto comercial y del usuario, incluyendo otros buffers, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Usos No Terapéuticos para el Anticuerpo Humanizado de vWF

Los anticuerpos humanizados de vWF o fragmentos de unión de los mismos tienen otras aplicaciones no terapéuticas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre una fase sólida tal como, por ejemplo, una resina SEPHADEX™ o filtro de papel, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado puede ponerse en contacto con una muestra que contiene la proteína vWF humanizada (o un fragmento de la misma) a purificar, y de allí en más el soporte puede lavarse con un solvente apropiado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto la proteína vWF humanizada, que puede unirse al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte puede lavarse con otro solvente apropiado, tal como buffer de glicina, pH 5,0, que liberará la proteína vWF humanizada del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados vWF pueden también ser útiles en ensayos de diagnóstico para la proteína vWF humana, por ej. para la detección de su expresión en células específicas, tejidos o suero. Para aplicaciones diagnósticas,

27
9

el anticuerpo puede marcarse con un resto detectable. Se dispone de numerosos marcadores que pueden en general agruparse en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo utilizando las técnicas descriptas en, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991), y la radioactividad puede medirse utilizando un contador de centelleo.

(b) Se dispone de marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lisamina, ficoeritrina y Rojo Texas. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse al anticuerpo utilizando las técnicas reveladas con anterioridad en, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*. La fluorescencia puede cuantificarse utilizando un fluorímetro.

(c) Se dispone de diversos marcadores enzima-sustrato (ver, por ej., la Patente de los Estados Unidos N° 4.275.149). En general, estas enzimas catalizan una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen con anterioridad. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y luego puede emitir luz que puede medirse (por ej., utilizando un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de los Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (por ej., uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa y microperoxidasa. Se describen técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos en O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay," en

3

Methods in Enzym. (Ed., J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166 (1981).

Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peróxido de hidrógeno como sustrato, donde el peróxido de hidrógeno oxida a un precursor de un colorante (por ej., ortofenilen diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ej., p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-p- β -galactosidasa.

Se encuentran disponibles otras numerosas combinaciones enzima-sustrato para aquellos con experiencia en la técnica (ver, por ej., las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.275.149 y 4.318.980).

A veces, el marcador puede conjugarse indirectamente con el anticuerpo. Aquel con experiencia en la técnica tendrá conocimiento de diversas técnicas para lograrlo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina, y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionadas con anterioridad puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une en forma selectiva a la avidina, y así, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo puede conjugarse con un pequeño hapteno (por ej., digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados con anterioridad puede conjugarse con un anticuerpo anti-hapteno (por ej., anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, puede lograrse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

En otra realización de la revelación, el anticuerpo humanizado de vWF no requiere ser marcado, y la presencia del mismo puede detectarse utilizando un anticuerpo marcado que se una al anticuerpo humanizado de vWF.

Los anticuerpos de la presente revelación pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola,

84

Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Para inmunohistoquímica, la muestra del tumor puede ser fresca o estar congelada o puede incrustarse en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

Los anticuerpos también pueden utilizarse para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo puede marcarse con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que, por ejemplo, un tumor pueda localizarse utilizando inmunocentellografía.

Por cuestiones de conveniencia, los anticuerpos de la presente revelación pueden proveerse en un kit (por ej., una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el ensayo diagnóstico). Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ej., un precursor de sustrato que provea el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, buffers (por ej., un buffer de bloqueo o buffer de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proveer concentraciones en solución de los reactivos que optimicen en forma sustancial la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proveerse como polvos secos, usualmente liofilizados, que incluyen excipientes que tras la disolución proveerán una solución reactiva con la concentración apropiada.

Los anticuerpos humanizados de vWF pueden también ser útiles para la obtención de imágenes *in vivo*, donde el anticuerpo marcado puede administrarse a un huésped, preferentemente al torrente sanguíneo, y donde se determinan la presencia y localización del anticuerpo marcado en el huésped. Esta técnica de obtención de imágenes puede utilizarse en forma adecuada en la localización de embolias vasculares o en la determinación del estadio y tratamiento de neoplasmas. El anticuerpo puede marcarse en forma adecuada con cualquier resto que sea detectable en un huésped, incluyendo, por ejemplo, indicadores no radioactivos detectables, por ej., por resonancia magnética nuclear u otros métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, preferentemente, el marcador puede ser un marcador radioactivo, incluyendo yodo, por ej. ^{125}I y ^{131}I , selenio,

quelatos bifuncionales, cobre, por ej. ^{67}Cu , tecnecio, por ej. $^{99\text{m}}\text{Tc}$, y renio, por ej. ^{186}Re y ^{188}Re . El radioisótopo puede conjugarse a la proteína por cualquier medio, que incluye, por ejemplo, compuestos quelantes de metales o lactoperoxidasa, o técnicas yodogénicas para yodación.

Depósito de Material:

Los siguientes materiales se han depositado con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstr. 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania:

Microorganismo (*E. coli*) depositado con DSMZ el 23 de enero de 2008, que tiene el N° de acceso DSM 21059, que comprende el vector GS264 que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena liviana de la variante humanizada H9L9IgG4 de NMC-4. Microorganismo (*E. coli*) depositado con DSMZ el 23 de enero de 2008, que tiene el N° de acceso DSM 21060, que comprende el vector GS265 que comprende un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de la variante humanizada H9L9IgG4 de NMC-4. Estos depósitos se realizaron según las provisiones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes y las Normas que lo Reglamentan (Tratado de Budapest).

Sin descripción adicional, se presume que la persona con experiencia en la técnica puede, utilizando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, preparar y utilizar los agentes de la presente revelación y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo se proveen para facilitar la práctica de la presente revelación, y no deben considerarse limitativos bajo ningún concepto del resto de la revelación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de Anticuerpos Quiméricos

Generación de una quimera NMC-4-Fc humana: Se construye un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables del anticuerpo NMC-4 de ratón y una región Fc humana, según se describe a continuación. En un método representativo, el anticuerpo anti-vWF, NMC-4 (por ej., una IgG1κ con secuencias de aminoácidos de región variable que han sido publicadas) se utiliza como molde

para generar secuencias genéticas sintéticas para las regiones VH y VL de NMC-4 (Celikel *et al.*, 1997, Blood Cells, Molecules and Diseases 23:123-134). Por ejemplo, se generan secuencias genéticas sintéticas para VH y VL de NMC-4 tomando las secuencias de aminoácidos descritas en Celikel *et al.* y generando una secuencia nucleotídica correspondiente utilizando el software VECTOR NTI.

Tabla 1. Cebadores utilizados para generar los plásmidos de expresión de la quimera NMC-4.

Cebador delantero	Secuencia	Cebador inverso	Secuencia
Cadena pesada			
NMC-VH-EcoRI-F	5'-GACGCGAATTGGCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGC-3' (SEC ID NO: 34)	NMC-VH-IgG1-R	5'-CGGATGGGGCCTTGGTGGAAAGCGGTGCTCAGGTCACGCTGGT-3' (SEC ID NO: 35)
hIgG-F	5'-GCTTCCACCAAGGGCCCATCCG-3' (SEC ID NO: 36)	hIgG-R	5'-CCAGAGACAGGGAGAGAGGCTTTCTG-3' (SEC ID NO: 37)
		IgG1-BamHI-R	5'-ATTAGGATCCTTATCATTTAACGAGAGACAGGGAGAGGCT-3' (SEC ID NO: 38)
hFc-L235E-F	5'-CTCGAGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT-3' (SEC ID NO: 39)	hFc-L235E-R	5'-AAGAGGAAGACTGACGGTCCCCTCGAG-3' (SEC ID NO: 40)
CH2-C1q(-)-F	5'-GGCGTACGGGTGGCGGGTCTCCAACAAAGC-3' (SEC ID NO: 41)	CH2-C1q(-)-R	5'-CCGGGCACGGGTACGGCCTTGCATTACAGCCA-3' (SEC ID NO: 42)
4-59 lider-HindIII-NMC-4	5'-ATTAAGCTTGGCGGCACCATGAAACATCTGTGGTTCTTCTTCTCTGGTGGCAGCTCCAGGTGGGTCTGTCCAGGTGCAGCTGAAGGAGAGC-3' (SEC ID NO: 43)	IgG1-BamHI-R	5'-TAAGGATCCTTATCATTTAACCGGAGACAGGGAGAG-3' (SEC ID NO: 44)
Cadena liviana			
NMC-VL-EcoRI-F	5'-GACGCGAATTGGGACATCCAATGACCCAGAGCC-3' (SEC ID NO: 45)	NMC-VL-Kappa-R	5'-GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTGGTTACCTCCAGCTTGGTGCC-3' (SEC ID NO: 46)
Kappa-F	5'-CGAAGTGTGGGTGCACCATCTGTCTT-3' (SEC ID NO: 47)	Kappa-BamHI-R	5'-AATTGGATCCTTAAGCACTCTCCCTGTTGAAGCTCTT-3' (SEC ID NO: 48)

82

En un método representativo, pueden llevarse a cabo reacciones de PCR utilizando el Accuprime PFX DNA POLYMERASE KIT (Invitrogen). Por ejemplo, se ensambla una mezcla de reacción de 50µl que incluye: buffer 1×PFX, mezcla de dNTP 0,2µM, 1 unidad de PFX polimerasa, cebador delantero 1µM, cebador inverso 1µM y 100ng de molde(s) de ADN. Un programa de PCR estándar consiste en desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos, siendo cada ciclo de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 68°C durante un minuto y un paso de extensión final a 68°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se purifican por electroforesis en gel de agarosa sobre un gel de TAE 0,8% y se recortan una o más bandas del tamaño deseado y se purifican con un GEL EXTRACTION KIT de Qiagen. Se ligan fragmentos de ADN durante 30 minutos a temperatura ambiente en un volumen de 10µl que incluye buffer de ADN ligasa 1× T4 (NEB), ADN Ligasa T4 0,5µl (NEB) y 100ng de cada ADN. Luego, se utiliza 1 µl de la reacción de ligación para transformar células de *E.coli* JM109 y los insertos generados por PCR se verifican por secuenciación utilizando un DNA ANALYZER Beckman CEQ 8000.

Tales anticuerpos quiméricos que comprenden una VH y/o una VL del anticuerpo murino NMC-4 y una Fc humana se sintetizan por PCR de acuerdo con protocolos estándares conocidos en la técnica. En un método representativo, se fusiona una VH y/o una VL de NMC-4 a una Fc humana por PCR con un cebador específico para NMC-4 y un cebador específico para Fc humana.

Opcionalmente, se introducen sustituciones de aminoácidos (por ej., mutaciones) en la región IgG1 Fc para abolir la Fc y unir sitios de complemento para eliminar la citotoxicidad que supuestamente está mediada por la región constante γ1 de Fc de tipo salvaje (ver, por ejemplo, SEC ID NO: 143). Por ejemplo, se amplifica una región constante de IgG1 humana (por ej., Fc) derivada del clon I.M.A.G.E. #4764579 de ADNc (ATCC) (SEC ID NO: 33) utilizando los cebadores hIgG-F (SEC ID NO: 36) y hIgG-R (SEC ID NO: 37) (Tabla 1). Se introducen sustituciones de aminoácidos (por ej., L235E (el sitio de unión FcR) y E318A, K320A, K332A (en el sitio de unión de complemento C1q)) en la región IgG1 Fc mediante, por ejemplo, mutagénesis sitio-dirigida (Duncan y Winter; Nature. 332(6166):738-40 (1988)). Por ejemplo, se introduce la mutación L235E en la región constante utilizando un par de cebadores hFc-L235E-F (SEC ID NO: 39)

y hFc-L235E-R (SEC ID NO: 40); y se introducen mutaciones al sitio de complemento utilizando el par de cebadores CH2-C1q(-)-F (SEC ID NO: 41) y CH2-C1q(-)-R (SEC ID NO: 42) (Tabla 1). Los productos de PCR resultantes que comprenden las cuatro mutaciones se conectan utilizando dos cebadores exteriores, hIgG-F (SEC ID NO: 36) e IgG1-BamHI-R (SEC ID NO: 38) para producir un producto de PCR que codifica una región IgG1 Fc modificada (denominada IgG1(dm)).

En un método representativo, la región variable de cadena pesada de NMC-4 se fusiona a una región IgG1 Fc modificada (por ej., IgG1(dm)) mediante técnicas recombinantes conocidas en la técnica. Por ejemplo, la secuencia nucleotídica que codifica la región variable de cadena pesada de NMC-4 (SEC ID NO: 1) se amplifica con los cebadores NMC-VH-EcoRI-F (SEC ID NO: 34) y NMC-VH-IgG1-R (SEC ID NO: 35) que introducen un sitio de clonación *EcoR*I corriente arriba del extremo N-terminal de NMC-VH. En resumen, el producto de PCR se conecta con una región constante de cadena pesada (por ej., IgG1(dm)), mediante PCR recombinante en dos pasos, utilizando primero el par de cebadores NMC-VH-EcoRI-F (SEC ID NO: 34) y hIgG-R (SEC ID NO: 37), seguido de una reacción de PCR utilizando el par de cebadores NMC-VH-EcoRI-F (SEC ID NO: 34) e IgG1-BamHI-R (SEC ID NO: 38). El producto de PCR final se digiere con *EcoR*I y *Bam*HI y se clona en los sitios *EcoR*I y *Bam*HI del vector pIRES2-EGFP-Igk (Clontech, Palo Alto, CA), que está modificado para comprender una secuencia líder Igk (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD) (SEC ID NO: 107) (codificada por el polinucleótido de SEC ID NO: 140) clonada en los sitios λ hoI y *EcoR*I.

En un método representativo, la región variable de cadena liviana de NMC-4 se fusiona a una región IgG1 Fc modificada (por ej., IgG1(dm)) mediante técnicas recombinantes descritas a continuación. Por ejemplo, la región constante de cadena liviana Igk (por ej., κ C1 (SEC ID NO: 141)) se amplifica con ADN preparado a partir del clon I.M.A.G.E #4704496 (ATCC) (SEC ID NO: 108) utilizando los cebadores Kappa-F (SEC ID NO: 47) y Kappa-BamHI-R (SEC ID NO: 48) que además introducen un sitio de restricción *Bam*HI en el extremo 3' de la región constante de cadena liviana. En forma similar, la región variable de cadena liviana se amplifica a partir del gen VL sintetizado con los cebadores NMC-VL-EcoRI-F (SEC ID NO: 45) y NMC-VL-Kappa-R (SEC ID NO: 46) (Tabla 1) que

introducen un sitio *EcoRI* en el extremo 5'. Luego, la región variable NMC 4 y los fragmentos κ C1 se conectan mediante PCR recombinante utilizando los cebadores NMC-VL-*EcoRI*-F (SEC ID NO: 45) y Kappa-BamHI-R (SEC ID NO: 48). El producto de PCR final se digiere con *EcoRI* y *BamHI* y se clona en el vector pIRES2-DsRed2-Ig κ en los mismos sitios.

El nivel de expresión de la cadena pesada en el vector pIRES2-EGFP puede ser bajo en comparación con el plásmido pIRES-DsRed que expresa la quimera de ratón-humano de cadena liviana, no obstante el hecho de que la misma secuencia líder Ig κ se utilice tanto para la cadena liviana como para la pesada. Por consiguiente, para mejorar el nivel de expresión de la cadena pesada, se reemplaza la secuencia líder Ig κ por la secuencia líder del 4-59 VH de línea germinal humana (MKHLWFFLLLVAAAPRWVLS) (SEC ID NO: 109) utilizando el par de cebadores 4-59 líder-HindIII-NMC-4 (SEC ID NO: 43) e IgG1-BamHI-R (SEC ID NO: 38) actuando el vector pIRES2-EGFP-NMC4-IgG(mut) como molde (Tabla 1). El fragmento se digiere con *HindIII* y *PmeI* y se subclona en los sitios *HindIII* y *PmeI* del vector pcDNA6-cMyc-A (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Construcción de un Anticuerpo de Referencia AJW200: AJW200 es otro anticuerpo dirigido contra el dominio A1 de vWF, con la capacidad de bloquear la interacción del dominio A1 de vWF con GPIIb α . Se genera un anticuerpo de referencia AJW200 por manipulación genética de las secuencias VH y VL descritas en la Patente de los Estados Unidos N° 6.223.360 para que incluya, por ejemplo, una secuencia Kozak funcional adicional para expresión mejorada. Por ejemplo, el gen AJW200 VH sintético se amplifica utilizando los cebadores Hind III-Ko-AJW-F (SEC ID NO: 49) y HuFab-H-R (SEC ID NO: 50) (Tabla 2) y se clona en el sitio *HindIII* y *Apal* del vector pcDNA6-cMyc-A digerido con *HindIII*-*Apal*- que comprende la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (dm) (reemplazando de este modo a la VH del NMC-4). La VL de AJW200 se amplifica utilizando el par de cebadores XhoI-Ko-AJW-F (SEC ID NO: 51) y Kappa-BamHI-R (SEC ID NO: 48) y se subclona en los sitios *XhoI* y *BamHI* del vector pIRES-DsRed que porta la quimera de cadena liviana de NMC (reemplazando de este modo a la VL del NMC4).

Tabla 2. Cebadores utilizados para generar los plásmidos de expresión AJW200

90

Cebador delantero	Secuencia	Cebador inverso	Secuencia
Hind III-Ko-AJW-F	5'- GTTAAGCTTGGCGCCACCAT GGA TTTTGGGCTGATTTTTTTAT TGTT -3' (SEC ID NO: 49)	HuFab-H-R	5'- GAATGGGCGCCTTGGTGGAAAG CGG AGGAAACGGTCACGAGGGTA -3' (SEC ID NO: 50)
XhoI-Ko-AJW-F	5'- AATCTCGAGGGCGCCACCAT GA GTGTGCCCACTCAGGTCTG G -3' (SEC ID NO: 51)	Kappa-BamHI-R	5'- AATTGGGATCCTTACTAACAC T CTCGGCTGTTGAAGCTCTT -3' (SEC ID NO: 48)

Producción de anticuerpos: Pueden producirse anticuerpos quiméricos mediante cualquier método conocido en la técnica. En un método representativo, se cultivan células HEK293F en medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen) en matraces de agitación a 120 rpm, 37°C, 8%CO₂. Las células se peletizan a 100×g, se resuspenden en 30ml de MEDIO DE EXPRESIÓN FREESTYLE 293 , y se agitan con vórtex durante 20 segundos para obtener una suspensión unicelular. Se cuentan las células y se siembra un matraz de agitación de 2L con 3,3×10⁸ células en un volumen total de 330ml de MEDIO FREESTYLE 293. La mezcla de transfección está compuesta por partes iguales de ADN/OptiMEM (por ej., 165 µg de plásmido de expresión de HC, 165µg de plásmido de expresión de LC, y OptiMEM a temperatura ambiente (Invitrogen) hasta un volumen total de 11ml) y 293fectin/OptiMEM (por ej., 433µl de 293fectin (Invitrogen) y OptiMEM a temperatura ambiente (Invitrogen) hasta un volumen total de 11ml). La mezcla de ADN se agrega a la mezcla de 293fectin, luego se mezcla e incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se agrega a los medios existentes que contienen las células 293F. Las células se incuban a 37°C, 8%CO₂ con agitación a 120rpm. 72 horas después de la transfección, la suspensión se centrifuga durante 5 minutos a 100×g para peletizar las células y el sobrenadante que contiene Mab se filtra a través de un filtro de 0,2 µm y se purifica utilizando una columna de afinidad de Proteína A.

Se aplican volúmenes pequeños de medio acondicionado (CM) de células HEK-293F temporalmente transfectadas a una columna de goteo de SEFAROSA con 0,3 ml de Proteína A que ha sido equilibrada con PBS. La columna se lava con 10 ml de PBS y se eluyen las proteínas con Glicina 0,1 M, pH 2,7. Se recolectan fracciones de un mililitro en 0,1 ml de Tris-HCl 1M, pH 8,0 siendo la

91

mayor parte del anticuerpo eluida en las primeras dos fracciones de eluato. Estas dos fracciones se combinan y concentran a un volumen final (por ej., 0,2-0,3 ml) utilizando, por ejemplo, un dispositivo centrífugo Vivaspin de 0,5ml. Durante este paso de concentración, se llevan a cabo diluciones intermedias con PBS para intercambiar el buffer de Tris-Glicina a PBS. El concentrado final se esteriliza por filtración a través de, por ejemplo, un filtro de jeringa de 0,2 μ m y se determina la concentración de proteína de la muestra que contiene anticuerpo utilizando un ensayo de proteínas de Lowry (BioRad DC Protein Assay).

Para purificación a gran escala, se concentran 2L de medio acondicionado (CM) de células adherentes temporalmente transfectadas (por ej., HEK-293T) por ultrafiltración en un cartucho de fibra hueca (por ej., Amersham Biosciences 30.000 NMWC/columna de fibra hueca de 290 cm² UFP-30-C-3X2MA) hasta que el volumen se reduce a ~200ml. Este material concentrado o, para transfecciones menores, CM puro, se bombea sobre una columna de SEFAROSA con Proteína A de 12 ml que ha sido equilibrada con Tris-HCl 0,1M, pH8,0. La columna se lava con Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 hasta que la lectura de UV₂₈₀ haya establecido un valor basal. El anticuerpo se eluye con Glicina 0,1 M, pH2,7 y se recolectan fracciones de 3 ml. El pH de las fracciones que contienen el máximo de proteínas se ajusta por adición de Tris-HCl pH 8,0 a una concentración final de 0,1 M. Las fracciones de máximo contenido se mezclan, se concentran a un volumen menor que 7ml por ultrafiltración (por ej., en un dispositivo de centrifugación de 15 ml Amicon Ultra), y luego se desalinizan en PBS utilizando dos corridas separadas sobre una columna PD-10 (Amersham Biosciences/GE-Healthcare).

Se cuantifican las proteínas obtenidas de los sobrenadantes de cultivo y se analizan mediante cualquier método conocido en la técnica (por ej., ensayo de proteínas de Lowry (BioRad DC Protein Assay). En un método representativo, se analizan los sobrenadantes de cultivo mediante SDS-PAGE. En resumen, se transfieren proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se bloquean con 5% de leche/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incuban con IgG anti-humana de ratón conjugada con HRP (por ej., - específica de cadena γ , 1:10000) y kappa anti-humana de ratón (por ej., específica de cadena κ , 1:1,000) (Southern Biotech, Cat# 9042-05 y #9220-05, Birmingham, AL) y las señales se detectan con un kit ECL.

~
Q

Actividad inhibitoria in vitro en el ensayo de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina: En un método representativo, se ensayan para determinar su actividad anticuerpos quiméricos NMC-4Fc humana, que incluyen por ejemplo, especificidad de unión para vWF. Por ejemplo, se llevan a cabo ensayos de aglutinación plaquetaria con un agregómetro estándar (Bio/Data, modelo PAP-4) utilizando plaquetas humanas liofilizadas (Bio/Data, Horsham PA). En resumen, se agregan 50 µl de ristocetina (por ej., concentración de solución madre = 15 mg/ml) (Bio/Data) y 48,5 µl de TBS o anticuerpo de ensayo a un tubo que contiene 1×10^8 plaquetas liofilizadas en un volumen de 400 µl. Se registra la lectura basal durante 10 segundos antes de la adición de 1,5 µl de vWF purificado (por ej., concentración final de 1,5 µg/ml) en el tubo para iniciar la aglutinación. El valor de EC_{50} del anticuerpo de ensayo se estima como la concentración que inhibió el 50% de la aglutinación plaquetaria. En comparación con el anticuerpo monoclonal progenitor, la quimera demostró una potencia equivalente a la del anticuerpo NMC4 murino progenitor.

Además, para determinar en forma más precisa los valores de EC_{50} , se ensayan anticuerpos quiméricos utilizando, por ejemplo, un método de lectura de placas adaptado del método de microplacas. En un método representativo, se agregan $4,5 \times 10^7$ plaquetas fijadas con paraformaldehído- en 150 µl de TBS (pH 7,5) por pocillo, utilizando una placa COSTAR 3603 de 96 pocillos y se agrega vWF humano purificado (Calbiochem, San Diego, CA) a una concentración final de 1,5 µg/ml por pocillo. Se agregan concentraciones seriadas de anticuerpos de ensayo seguido de la adición de ristocetina a una concentración final de 1,5 mg/ml por pocillo para iniciar la aglutinación y se monitorea la turbidez (por ej., absorbancia a 405 nm) utilizando un LECTOR DE PLACAS SPECTRAMAX PLUS (Molecular Devices) ajustado a 37°C durante 6 minutos con 20 segundos de agitación en el plano entre ciclos de lectura. Se agrega compuesto inhibidor o el MAbs de referencia (por ej., AVW-3) (por ej., 20 µl/pocillo) y las mezclas se incuban y monitorean durante 2 minutos. Por último, se agrega ristocetina o botrocetina (20 µl/pocillo) y las mezclas se incuban y monitorean durante 40 minutos. La señal de aglutinación se monitorea como la proporción de la reducción en absorbancia (por ej., $-\Delta$ Absorbancia).

La quimera NMC-4-Fc humana se compara con el anticuerpo monoclonal original NMC-4 así como con el anticuerpo AJW200 clonado. Como se muestra en la Figura 1, la quimera NMC-4 es similar en actividad al mAb NMC-4 original y ligeramente más potente que AJW200 en el ensayo de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina, con valores de EC_{50} de 0,1, 0,17 y 0,27 nM, respectivamente.

Ejemplo 2: Construcción de Anticuerpos Humanizados

Selección de entramados aceptores humanos: Pueden utilizarse bases de datos (por ej., una base de datos de una línea germinal humana, base V, o la base de datos Kabat) o publicaciones (por ej., Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1992) para identificar las subfamilias a las que pertenecen las regiones V murinas de cadena pesada y liviana y determinar el entramado de línea germinal humana más apropiado para utilizar como molécula aceptora. La selección de la cual pueden utilizarse secuencias de VH y VL dentro de estas subfamilias como secuencias receptoras, puede basarse en la homología de secuencias y/o en una coincidencia de la estructura canónica de las regiones CDR1 y CDR2 para ayudar a preservar la presentación relativa apropiada de las seis CDR luego del injerto.

Por ejemplo, el uso de la base V indica que la cadena liviana κ de NMC-4 es de la subfamilia kappa 1 dado que se identifica una buena homología entre el entramado VL de NMC-4 y los miembros de la subfamilia κ 1 (VK1). La máxima homología y mejor preservación de las estructuras canónicas de los bucles de CDR se observa para la secuencia de línea germinal O18 (SEC ID NO: 5), que tiene una identidad de secuencia del 78% para toda la secuencia hasta CDR3 y una identidad de secuencia del 34% para las regiones de entramado. La alineación de la cadena liviana de NMC-4 y la cadena liviana humana O18 (SEC ID NO: 5) y AAK94808 (un anticuerpo maduro derivado de O18, utilizado para proveer una LCDR3 y secuencia de entramado 4 para la comparación con NMC-4 en esta región) (SEC ID NO: 6) se muestra en la Tabla 3, indicándose las diferencias entre el anticuerpo NMC y el humano en negrita (numeración basada en el esquema de numeración de Kabat (Kabat, 1978)).

En forma similar, el uso de la base V indica que la secuencia de VH hasta el entramado 3 cae dentro de la subfamilia IV de VH. Dentro de la subfamilia IV de

VH, la VH de NMC-4 muestra la máxima homología de secuencia con la secuencia de línea germinal 4-59 (SEC ID NO: 3) que exhibe una identidad de secuencia del 56% para con la VH de murino para la totalidad de la VH hasta la CDR3 y una identidad del 67% sólo para las regiones de entramado (Tabla 4). Sin aferrarnos a una teoría de la revelación, se selecciona AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) para proveer una HCDR3 y una secuencia comparadora del entramado 4 dado que comparte secuencias de aminoácidos idénticas en los entramados 1 a 3 y en HCDR1 y HCDR2 a la VH de línea germinal humana 4-59 (SEC ID NO: 3). No se incluyen las regiones HCDR3 y de entramado 4 en las secuencias de línea germinal de VH en la base de datos de la base V, dado que las regiones HCDR3 son altamente divergentes y que el FW4 es un dominio distinto derivado de un producto génico (J) separado. Las diferencias de aminoácidos entre la VH de NMC-4 y AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) se resaltan en negrita y sus posiciones se indican con asteriscos en la Tabla 4.

Tabla 3. Alineación de la VL de NMC-4 con el anticuerpo humano AAK94808 que tiene secuencias de aminoácidos de entramado y secuencias de CDR1 y CDR2 idénticas a la VL de línea germinal humana 018.

Nombre	FW1	CDR1	FW2	CDR2
	-----1-----2*-	*-----3*---	-----4**-*-----*	5*-*--**
Nº Kabat: VL NMC-4 (SEC ID NO: 2) 018(AAK94808) (SEC ID NO: 6)	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456
	DIQMTQSPSSLSASLGDFVTISC	SASQDINKYLN	WYQQKFDGAVFLLIF	YTSSLHS
	DIQMTQSPSSLSASVGDFTITC	QASQDISN'LN	WYQQKFGKAPKLLIY	DASNLET
Nombre	FW3	CDR3	FW4	
	---6-----7***-*8-----	-9-*--*-		
Nº Kabat: VL NMC-4 018(AAK94808)	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567	
	GVPSPFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDATITTC	QQTEKLPWTFGGGTKVEIK		
	GVPSPFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATITTC	QQIDNLPLTFGGGTKVEIK		

Tabla 4. Alineación de la VH de NMC-4 con el anticuerpo humano AAC18165.1, que tiene secuencias de aminoácidos de entramado, de CDR1 y CDR2 idénticas a la línea germinal humana 4-59.

Nombre	FW1	CDR1	FW2	CDR2
	---*---1---*---*---*---	-*3*---*	---4-----*	5---*---*6*---
Nº Kabat: NMC-4 VH (SEC ID NO: 1) 4-59(AAC18165.1) (SEC ID NO: 4)	1234567890123456789012345	6789012345	67890123456789	0123456789012345
	QVQLKESGPGGLVAPSQSLSTCTVS	GFSLTDYGVDFWVRQPPGKGLEWLG	MIWGDGSTDYISALHS	
	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS	GGSISS'YWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYYSGSTN'YHPSLHS
Nombre	FW3	CDR3	FW4	
	---7*---*---*8---*---*9---*	*****10*****	-----11--	
Nº Kabat: NMC-4 VH 4-59(AAC18165.1)	67890123456789012345678901234	5678901234567890123	34567890123	
	FLSITKDNSTISQVFLFMNLSLTQDDEATITTC	DPADYGNFYDYALDY	WGQGTSTVTVSS	
	FVTISVDTSFENQFSLEFLSEVTAADTAVITTC	GYRPGVAHSPFDY	WGQGTSLVTVSS	

Handwritten mark resembling a stylized 'A' or '7'.

Dado que se presume que el injerto directo de CDR de un anticuerpo de ratón a entramados de anticuerpo humano da lugar a una pérdida de la afinidad por la unión al antígeno (Foote y Winter *J. Mol. Biol.* 224: 487-499 (1992); Xiang *et al. J Mol Biol.* 253:385-90 (1995); Homes *et al, J. Immunol.* 167:296-301 (2001)), puede ser deseable mutar ciertos residuos en los entramados nuevamente a los residuos de ratón en esas posiciones, un proceso denominado “retromutación”). Por ejemplo, la Tabla 5 muestra los residuos que pueden afectar las conformaciones de CDR y que pueden ser candidatos potenciales para la retromutación al residuo murino (por ej., las diferencias de aminoácidos entre el NMC-4 y los entramados humanos en esas posiciones se resaltan en **negrita cursiva**).

Tabla 5. *Residuos de entramado que afectan la conformación de las CDR; comparación entre NMC-4 y las regiones variablesceptoras humanas*

VL			VH		
Posición Kabat	NMC-4	O18 FW	Posición Kabat	NMC-4	4-59 FW
2	I	I	2	V	V
4	M	M	47-49	W, L , G	W, I , G
35-36	W, Y	W, Y	67	L	V
46-49	L, L, I, F	L, L, I, Y	69	I	I
64	G	G	71	K	V
66	G	G	73	N	T
68-69	G, T	G, T	78	V	F
71	Y	F	93-94	V, R	A , R
98	F	F	103	W	W

Se han identificado residuos de aminoácidos que pueden estar involucrados en el apareamiento de las cadenas pesadas y livianas para coordinar la presentación de CDR (Holmes *et al, J Immunol.* 167:296-301 (2001) y pueden ser candidatos para la retromutación. Sin aferrarnos a una teoría la revelación, dentro de la región VL, se presume que los residuos 44, 96 y 98 son de importancia, con contribuciones adicionales de los residuos 34, 36, 38, 46, 87, 89 y 91. De estos residuos, el único que difiere en forma considerable entre NMC-4 y el aceptor O18 para la región VL es el residuo 44, que es una valina en VL de NMC-4 y una prolina en el entramado de O18 humano. Sin aferrarnos a una teoría de la revelación, para la VH, los residuos 45 y 103 son de importancia, contribuyendo también los residuos 35, 37, 39, 47, 91, 93, y 95 para el empaque en interfaz de la

96

VH con la VL. La única diferencia en estos residuos de interfaz para VH de NMC-4 y los entramados aceptores de 4-59 está en el residuo 93, donde existe una diferencia conservativa de una valina en NMC-4 en comparación con alanina en 4-59 (Tabla 5).

La comparación de las secuencias de entramado de las secuencias VH murinas y de la línea germinal humana 4-59 revela que muchas de las diferencias en los residuos que se presumen importantes para la presentación de CDR y del empaque en interfaz se agrupan en el entramado 3 (residuos 67, 71, 73, 78, 93), con diferencias adicionales en los residuos 37 y 48 en el entramado 2. Estos residuos son candidatos putativos para retromutación en la secuencia humanizada prototipo. Sin embargo, las diferencias para los dos residuos de entramado 2 (37V vs 37I y 48L vs 48I) son conservativas; por lo tanto el primer prototipo de secuencia VH puede centrarse en las diferencias en la región de entramado 3 y transferir las siguientes retromutaciones de humano a ratón: V67L, V71K, T73N, F78V y A93V (Tabla 6). El gen sintético es sintetizado a medida por Retrogen (San Diego CA) y denominado H2 y se clona en los sitios *Nhe*I y *Xho*I del vector bacteriano pRSFDuet (Novagen, Madison WI) y se utiliza como molde para amplificar el inserto utilizando los cebadores 4-59-huNMC-F (SEC ID NO: 54) y hu-VH-R (SEC ID NO: 55) (Tablas 7 y 9). El fragmento resultante se digiere con *Apa*I. El plásmido ADNpc6-NMC-HC, que contiene la cadena pesada de la quimera NMC-4 generada en el Ejemplo 1, se digiere con *Hind*III y *Apa*I y el fragmento de ADN que contiene el fragmento de ADNpc-IgG1dm se finaliza en un extremo romo con un fragmento de Klenow en presencia de NTP. Se liga el producto de PCR que contiene la VH al fragmento de ADNpc-IgG1dm de extremo romo. Luego, se utiliza el ADN plásmido para transformar la hebra huésped de *E.coli* JM 109. Se secuencian clones individuales utilizando un secuenciador de ADN Beckman CEQ 8000 para identificar un clon que exprese el inserto en la orientación correcta y con la secuencia correcta (clon ADNpc-huVH-IgG1dm). Este vector se utiliza como molde para las variantes H4, H5, H6, H7 y H8, que se diseñan para evaluar el efecto de la reversión individual de cada residuo al residuo humano (resumida en la Tabla 6). Estas variantes se construyen utilizando los pares de cebadores indicados en la Tabla 7 (se muestran las secuencias correspondientes en la Tabla 9).

99

Tabla 6. *Mutaciones de residuos de entramado incorporadas en las secuenciasceptoras de línea germinal 4-59 y línea germinal O18 para las diferentesvariantes VL y VH.*

VH	Retromutaciones (Humana a Murino)	VL	Retromutaciones (Humana a Murino)	(Humana a Humana común)
H2	V67L, V71F, T73N, F78V, A93V	L5	P44V, T49F, F71Y	F73L, G100Q
H4	V67L, V71F, T73N, F78V	L4	T49F, F71Y	F73L, G100Q
H5	V71F, T73N, F78V, A93V	L6	P44V, F71Y	F73L, G100Q
H6	V67L, T73N, F78V, A93V	L7	P44V, T49F	F73L, G100Q
H7	V67L, V71F, F78V, A93V	L8	Sin retromutaciones	F73L, G100Q
H8	V67L, V71F, T73N, A93V	L9	Sin retromutaciones	F73L, I93F, G100Q
H9	Sin retromutaciones			

Tabla 7: *Resumen de moldes y cebadores utilizados para construir las varianteshumanizadas de cadena pesada.*

Variantes de VH	Molde	Cebadores de PCR del Fragmento 1	Cebadores de PCR del Fragmento 2	Cebadores de PCR de VH Finales	Vector	Sitios de Clonación
H2	ADN sintetizado de Retrogen			4-59-huNMC- F y hu-VH-R	ADNpc6- IgG1(dm)	HindIII ApaI
H4	H2 en ADNpc6- IgG1(dm)	ADNpc6-F y VH-V93A-Rev	VH-V93A-For y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6- IgG1(dm)	HindIII ApaI
H5	H2 en ADNpc6- IgG1(dm)	ADNpc6-F y HC-L67V-R	HC-L67V-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6- IgG1(dm)	HindIII ApaI
H6	H2 en ADNpc6- IgG1(dm)	ADNpc6-F y HC-F71V-R	HC-F71V-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6- IgG1(dm)	HindIII ApaI
H7	H2 en ADNpc6- IgG1(dm)	ADNpc6-F y HC-N73T-R	HC-N73T-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6- IgG1(dm)	HindIII ApaI
H8	H2 en ADNpc6- IgG1(dm)	ADNpc6-F y HC-V78F-R	HC-V78F-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6- IgG1(dm)	HindIII ApaI
H9	ADN sintetizado de Retrogen			4-59-huNMC- F y hu-VH-R	ADNpc6- IgG1(dm)	HindIII ApaI

La comparación de los residuos que se presume afectan la estructura canónica y el empaque en interfaz indica que existen tres diferencias entre la VL de NMC-4 VL y el entramado aceptor de VL de O18 humano (por ej., residuos 44, 49 y 71). Por lo tanto, puede diseñarse una variante de prototipo humanizada, L5,

ab

que transfiera tres retromutaciones al residuo murino (por ej., P44V, Y49F y F71Y) (Tabla 6). Además, esta variante se diseña para cambiar el residuo 73 de fenilalanina a leucina, dado que la leucina es un residuo más común en esta posición en el repertorio de anticuerpos humanos. Para generar esta variante, se sintetiza a medida (Retrogen) una variante denominada VL4, que porta cambios en el entramado (por ej., Y49F, F71Y y F73V), y se clona en el vector pETDuet utilizando los pares de cebadores indicados en la Tabla 8. El vector L4-pETDuet resultante se utiliza como molde para introducir la mutación P44V de L5 utilizando los pares de cebadores enumerados en la Tabla 8. Luego, la variante L5 se subclona en los sitios *EcoR1* y *BamH1* del vector pIRES DsRed2 en lugar del VL del NMC-4 murino. Luego, el vector L5-pIRES DsRed se utiliza como molde para generar los vectores L6 y L7 utilizando los cebadores indicados en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de moldes y cebadores utilizados para construir las variantes humanizadas de cadena liviana

Variantes de VL	Molde	Cebadores de PCR del Fragmento-1	Cebadores de PCR del Fragmento-2	Cebadores de PCR de VL Finales	Vector	Sitios de Clonación
L4	ADN sintetizado de Retrogen			NMC4-VL- EcoRI-F y Kappa-BamHI-R	pIRES- DsRed2- Igk	EcoRI BamHI
L5	L4 en pETDuet-1	Fab-L-For y LC-P44V-R	LC-P44V-F y Fab-L-Rev	Fab-L-For y Fab-L-Rev	pETDuet-1	NdeI XhoI
L5	L5 en pETDuet-1			NMC4-VL- EcoRI-F y Kappa-BamHI-R	pIRES- DsRed2- Igk	EcoRI BamHI
L6	L5 en pIRES- DsRed2-Igk	NMC4-VL- EcoRI-F y LC-F49Y-R	LC-F49Y-F y Kappa-BamHI-F	NMC4-VL- EcoRI-F y Kappa-BamHI-R	pIRES- DsRed2- Igk	EcoRI BamHI
L7	L5 en pIRES- DsRed2-Igk	NMC4-VL- EcoRI-F y LC-Y71F-R	LC-Y71F-F y Kappa-BamHI-R	NMC4-VL- EcoRI-F y Kappa-BamHI-R	pIRES- DsRed2- Igk	EcoRI BamHI
L8	L7 en pIRES- DsRed2-Igk	5'IRES y HuLC-V44P- F49Y-R	HuLC- V44PF49Y-F y 3'IRES	5'IRES y 3'IRES	pIRES- DsRed2- Igk	EcoRI BamHI
L9	ADN sintetizado de Retrogen			NMC4-VL- EcoRI-F y Kappa-BamHI-R	pIRES- DsRed2- Igk	EcoRI BamHI

Tabla 9. Secuencias de cebadores utilizados para construir las diversas regiones variables.

99

Cebador delantero	Secuencia	Cebador inverso	Secuencia
4-59-huNMC-F	5'- GTTAAGCTTGCCGCCACCAT GAA ACATCTGTGGTTCTTCTTCT CCTGGTGGCAGCTCCAGGT GGGTCTGTCCAGGTGCAG CTGCAGGAATCCGG-3' (SEC ID NO: 54)	Hu-VH-R	5'- GGATGGGCCCTTGTGTGAAGC GGAGGAAACGGTCAAGAGGGTA -3' (SEC ID NO: 55)
ADNpc6-F	5'- CACTGCTTACTGGCTTATCG AAATTA-3' (SEC ID NO: 56)	hFc-L235E-R	5'- AAGAGGAAGACTGAAGGTCCCC C CTCGAG -3' (SEC ID NO: 40)
VH-93A-For	5'-GACACCGCTGTTTACTACT GGGCTGTGACCGGGGTGAC T -3' (SEC ID NO: 57)	VH-V93A- Rev	5'- AGTCAGCCGGGTCAAGACCGCA GTAGTAAACAGCGGTGTC -3' (SEC ID NO: 58)
HC-L67V-F	5'- CTGAAATCCCGTGTTACCATC TCCAAAGAC -3' (SEC ID NO: 59)	HC-L67V-R	5'- GTCTTTGGAGATGGTAACAGG G ATTTCAG -3' (SEC ID NO: 60)
HC-N73T-F	5'- ACCATCTCCAAAGACACCTCC AAAAAC -3' (SEC ID NO: 61)	HC-N73T-R	5'-GTTTTTGGAGGTGTCTTTGGA GATGGT -3' (SEC ID NO: 62)
HC-V78F-F	5'-AACTCCAAAAACAGTTCT CCGTGAAAC -3' (SEC ID NO: 63)	HC-V78F-R	5'- GTTTCAGGGAGAACTGGTTTTT GGAGTT -3' (SEC ID NO: 64)
HC-K71V-F	5'- CTTACCATCTCCGTAGACAA CTCCAAAAAC -3' (SEC ID NO: 65)	HC-K71V-R	5'-GTTTTTGGAGTTGTCTACGGA GATGGTAAG -3' (SEC ID NO: 66)
hu-VH-K71V-F (H9)	5'- CGTGTTACCATCTCCGTAGA CACTCCAAA -3' (SEC ID NO: 67)	hu-VH-K71V-P (H9)	5'-TTTGGAGGTGTCTACGGAGAT GGTAACAGC -3' (SEC ID NO: 68)
Fab-L-For	5'- ATACATATGGACATCCAGATG AACCAGAGC -3' (SEC ID NO: 69)	Fab-L-Rev	5'- AGACTCGAGTTATCAACACTCTC C CCTGTTGAAGCT -3' (SEC ID NO: 70)
NMC4-VL-EcoRI-F	5'- GACGGGAATTGGACATCCA GATGACCCAGAGCC -3' (SEC ID NO: 71)	Fab-L-Rev	5'- AGACTCGAGTTATCAACACTCTC C CCTGTTGAAGCT -3' (SEC ID NO: 70)
5'-IRES	5'-AGCTGGTTTAGTGA -3' (SEC ID NO: 72)	3'-IRES	5'-CAAGCGGCTTGGGCCAG -3' (SEC ID NO: 73)
LC-Y49F-F	5'- CCAAGCTGCTGATCTTCTAC ACCA -3'	LC-Y49F-R	5'-TGGTGTAGAAGATCAGCAG CTTGG -3'

100

	(SEC ID NO: 74)		(SEC ID NO: 75)
LC-F83I-F	5'- CAGCCCCGAGGACATCGCCAG CTACTACTGC -3' (SEC ID NO: 76)	LC-F83I-R	5'- GCAGTAGTAGGTGGCGATGTCC T CGGGCTG -3' (SEC ID NO: 77)
LC-P44V-F	5'-AAGCCCCGGCAAGGCCGTC AAGCTGCTGATC -3' (SEC ID NO: 78)	LC-P44V-R	5'- GATCAGCAGCTTGACGGCCTTG C CGGGCTT -3' (SEC ID NO: 79)
LC-F49Y-F	5'- GCCGTCAAGCTGCTGATCTA CTACACCAG -3' (SEC ID NO: 80)	LC-F49Y-R	5'- CTGGTGTAGTAGATCAGCAGCT TGACGGC -3' (SEC ID NO: 81)
LC-Y71F-F	5'- GGCAGCGGCGACCGACTTCA CCCTGACCATC -3' (SEC ID NO: 82)	LC-Y71F-R	5'- GATGCTCAGGGTGAACTCGGTG CGGCTGCC -3' (SEC ID NO: 83)
HuLC-V44P, F49Y-F	5'- GGCAAGGCCGCCAAGCTGCT GATCTACTACACCAG -3' (SEC ID NO: 84)	HuLC-V44P, F49Y-R	5'-CTGGTGTAGTAGATCAGCAGC TTGGGGGCCTTGCC -3' (SEC ID NO: 85)

En paralelo a la clonación de estos primeros conjuntos de variantes, se prepara un modelo tridimensional generado por computadora de la secuencia aceptora de línea germinal 4-59 utilizando la estructura 1DN0.pdb (por ej., resolución de 2,3 Å (angstrom)) identificada en un búsqueda BLAST como portadora de la mayor identidad de secuencia (88%) para toda la secuencia hasta HCDR3 y una identidad de secuencia 89% para las regiones de entramado. La estructura 1AOK.pdb se selecciona como molde para la secuencia humanizada de VH con una identidad de secuencia del 81%. Se dispone de dos estructuras cristalográficas del NMC-4 Fv murino: 1OAK.pdb (por ej., resolución de 2,2 Å), que se ha unido al antígeno (Celikel *et al*, Nat. Struct. Biol. 5:189-194 (1998)) y también se selecciona como la más apropiada en el dominio VH para el prototipo de variante humanizada, y 1FNS.pdb (resolución de 2,0 Å), que se ha unido al antígeno mutante. B1OAK.pdb y 1FNS.pdb tienen prácticamente ángulos de interfaz VH/VL idénticos, de modo que 1OAK.pdb se utiliza para la superposición de los modelos de las secuencias VH y VL aceptoras humanas y humanizadas.

Cuando se superponen las estructuras de esqueleto de NMC-4 VH y 4-59, pueden observarse tres áreas de diferencias. En primer lugar, existen diferencias desde los residuos H27 a H33, que incluyen parte de HCDR1. Sin aferarnos a una

teoría de la revelación, estos residuos ponen en contacto HCDR2 y HCDR3, que forman en conjunto parte del sitio de unión al antígeno. Se prevé que el residuo 34, Val en el NMC-4 VH murino y Trp en la secuencia 4-59, es potencialmente responsable de la conformación alterada del bucle H27-33 y por lo tanto un candidato para retromutación. En segundo lugar, existen diferencias desde los residuos H52 a H55, que forman parte del bucle de CDR 2. Se considera que el residuo 71 del entramado (Lys en ratón, Val en 4-59) potencialmente desempeña un papel en esta diferencia y que es un candidato para retromutación. Se identifican tres residuos adicionales en la estructura 4-59 con el potencial de dificultar la unión al antígeno. H37, que es un cambio conservativo de Ile en comparación con Val en ratón; H73 (que representó un cambio moderado, Thr en 4-59 comparado con Asp en ratón) y H78, que representó un gran cambio (Phe en 4-59 comparado con Val en ratón). En tercer lugar, existen diferencias en CDR3, donde se espera diversidad.

Para el modelado de los dominios de la línea germinal O18 y del prototipo de VL humanizada, la estructura 1IGM.pdb (por ej., resolución de 2,3 Å) tiene una excelente identidad de secuencia (por ej., 95%) con O18, con 4 diferencias en los residuos L34, L45, L47 y L92. La estructura O1BJ1.pdb (por ej., resolución de 2,4 Å) se selecciona como molde para el prototipo de VL humanizada, dado que equipara los residuos 97/107 (por ej., 91% de identidad de secuencia).

La adecuación de los esqueletos de VL de las estructuras de VL de NMC-4 y O18 es consistente con la identidad de secuencias. La única diferencia estructural significativa está en el bucle compuesto por los residuos L39-L45, que contactan la VH y que por lo tanto podrían influir en el empaque y, a su vez, la forma del bolsillo de unión. Sin aferrarnos a una teoría de la revelación, es probable que el residuo 44 (por ej., Val en ratón, Pro en 4-59) sea responsable de esta diferencia y, por lo tanto, también es un probable candidato para retromutación basada en un modelo de computadora.

Actividad inhibitoria in vitro en el ensayo de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina: Para determinar si las predicciones del modelo de computadora pudieron predecir los efectos sobre la actividad, la variante prototípica VH2 se compara con una variante de VL, (por ej., L4, 5, 6 y 7) y la L5 prototípica se combina con una variante de VH (por ej., H2, H4, H5, H6, H7 y H8).

2
10

La variantes de anticuerpo se producen por transfección transitoria de células HEK293T y se purifican a partir del sobrenadante de cultivo filtrado según lo descrito para el anticuerpo quimérico NMC-4 en el Ejemplo 1.

Los ensayos de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina se llevan a cabo utilizando plaquetas liofilizadas según lo descrito en el Ejemplo 1. El cambio en la absorbancia (por ej., turbidez) se mide para diluciones seriadas del anticuerpo por duplicado utilizando un lector de placas Spectromax (Molecular Devices) y se analizan los datos utilizando software Prism para determinar los valores de EC_{50} para las diversas variantes de anticuerpo purificado (ver, por ej., la Tabla 9).

La primera versión del anticuerpo humanizado, compuesta por H2 y L5, mostró actividad equivalente (por ej., EC_{50} de 0,13) con la quimera original (por ej., EC_{50} de 0,18nM) (Tabla 10). Luego, se ensayaron las variantes de cadena pesada con mutaciones puntuales sucesivas reconvertidas a los residuos de entramado humano (por ej., variantes H2 a H6). Las variantes mostraron actividad muy similar, con la excepción de la variante L5-H8 que mostró una EC_{50} 1,5 veces menor (Tabla 9). Resulta interesante que el rendimiento de esta variante fue menor (por ej., 1/10 de otras variantes), lo que sugiere que la interacción entre la cadena humanizada pesada y liviana pudo haberse visto afectada perjudicialmente por esta combinación de mutaciones, dado que la estabilidad del anticuerpo es dependiente del ensamblado correcto de las cadenas pesadas y livianas. En forma similar, se generaron y ensayaron anticuerpos de variante L5 y, en apariencia, ninguno de los cambios a humano afectó la actividad, lo que sugiere que, sorpresivamente, no se requirieron cambios en el entramado. Estos resultados indican que ninguna de las diferencias entre los entramados aceptores y los entramados de región variable de NMC-4 que se anticiparon como problemáticas, tuvieron efecto alguno sobre la potencia, incluyendo las diferencias más marcadas que se creían subyacentes a las diferencias estructurales observadas por el modelo de computadora, incluyendo las diferencias marcadas como inductoras de las mayores diferencias conformacionales (por ej., V71K y T73N de VH y P44V de VL). Dados estos resultados, se construyó una variante de cadena pesada (por ej., H9) portadora de un entramado completamente humano, que representaba un VH injertado con CDR simple. Luego, esta variante se

ensayó en combinación con las variantes de cadena liviana así como con una variante adicional, L9, que representaba un injerto de CDR simple sobre un entramado completamente humano. Sorpresivamente, el anticuerpo injertado en forma directa con CDR retuvo la actividad completa (EC_{50} de 0,08 nM; Tabla 10). Estos datos demuestran que, inesperadamente, el injerto directo de las CDR del anticuerpo murino sobre los entramados humanos seleccionados retuvo la actividad del anticuerpo murino original, a pesar de que los datos cristalográficos publicados indican que múltiples CDR contribuyen a la unión del antígeno (Celikel et al, *Blood Cells Mol Dis*.23:123; Celikel et al., *Nat. Struct Biol* 5:189) y que, por lo tanto, se anticiparía que cualquier perturbación en la presentación relativa de las 6 CDR afecta la afinidad.

Tabla 10: Comparación de los valores de EC_{50} para la quimera NMC-4 original en comparación con las variantes humanizadas en el ensayo de aglutinación plaquetaria mediada por vWF inducida por ristocetina

Anticuerpo (1 ^{er} conjunto)	EC_{50} (nM)	Anticuerpo (2 ^{do} conjunto)	EC_{50} (nM)
quimera NMC4	0,13±0,03 (n=9)	H9, L4	0,11
L5, H2	0,13 (n=2)	H9, L5	0,14
L5, H4	0,15	H9, L6	0,13
L5, H5	0,18	H9, L7	0,11
L5, H6	0,18	H9, L8	0,08
L5, H7	0,16	H9, L9	0,12 (n=2)
L5, H8	0,28		
L4, H2	0,14		
L6, H2	0,14		
L7, H2	0,15		

Humanización de las Regiones CDR: El modelado molecular sugirió que pueden tolerarse cambios adicionales, diseñados para humanizar la CDR1 de la cadena liviana y pesada en la LCDR1 de NMC-4 (por ej., residuos 24, 30 y 31) y la HCDR1 de NMC-4 (por ej., residuos 27, 29, 30 y 34). Además, también se considera que dos residuos en la secuencia HCDR2 (por ej., 61 y 62) representan cambios que pueden tolerarse (por ej., Ser a Pro para el residuo 61 y Ala a Ser para el residuo 62). Por lo tanto, se construye una serie de variantes denominadas "super-humanizadas" (Tan et al, 2002 *J Immunol*. 169:1119-1125) a partir de los moldes y pares de cebadores indicados en la Tabla 12 (por ej., L10 que

representa la variante con una LCDR1 enteramente humana; H12 y H13 que representan regiones HCDR1 parcialmente humanas) (Tabla 11).

Tabla 11: *Mutaciones que cambian residuos murinos de CDR a sus contrapartidas de 4-59*

VH	Super-humanizada (murina a humana)	VL	Super-humanizada (murina a humana)
H12	F27G, L29I, T30S	L10	S24Q, H30S, F31N
H13	F27G, L29I, T30S, V34W	L11	S24Q, H30S, F31H, Y50D, T51A, S53N, H55E, S56T
H14	F27G, L29I, T30S, V34W, S61P, A62S		
H15	F27G, L29I, T30S, D81S, G83Y V34W, G36S, S61P, A62S,		
H16	F27G, L29I, T30S, V34W, M50Y, W52Y, G53Y, D54S, D58N S61P, A62S		

En un método representativo, se ensayan las predicciones del modelado por computadora llevando a cabo uno o más ensayos para determinar la actividad del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, la variante L11 se co-transfecta con H9, y el anticuerpo se ensaya en el ensayo de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina. Como se muestra en la Tabla 14, se tolera la introducción de las tres mutaciones para convertir la LCDR1 y sea en su totalidad la de 018 y no causó pérdidas significativas en la potencia. Cuando se combinan las variantes H12, 13 y 14 con L9, el anticuerpo de la variante H12-L9 muestra una ligera pérdida en la potencia pero la mutación V34W adicional restauró la potencia total y la adición de las mutaciones S61P y A62S tuvo un pequeño efecto sobre la potencia, lo que indica que estos residuos podrían convertirse a la secuencia 4-59 sin influir sobre la actividad. Luego, se evalúa la importancia de LCDR2 en el mantenimiento de la actividad de bloqueo de vWF mediante la construcción de una variante de la cadena L10 donde toda la LCDR2 completa (YTSSLHS) (SEC ID NO: 11) se reemplaza con la LCDR2 de la línea germinal humana O18 (DASNLET) (SEC ID NO: 118) utilizando el plásmido que codifica la variante L10 de VL como molde y los pares de cebadores indicados en las Tablas 11 y 12. Luego, esta variante recién construida (L11) se aparea con H14 para producir la variante de anticuerpo L11-H14. Aunque aún exhibe potencia nanomolar, esta variante mostró una actividad 10 veces menor en comparación con la quimera en el ensayo de aglutinación plaquetaria (EC₅₀ 1,63nM), lo que sugiere que puede requerirse LCDR2 para la actividad óptima del anticuerpo humanizado.

Tabla 12. Resumen de la construcción de las variantes “super-humanizadas”

Variantes	Molde	Cebadores de PCR del Fragmento-1	Cebadores de PCR del Fragmento-2	Cebadores de PCR de VH. Finales	Vector	Sitios de Clonación
H12	H9 en ADNpc6-IgG1(dm)	ADNpc6-F y huH12-R	huH12-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-IgG1(dm)	HindIII ApaI
H13	H9 en ADNpc6-IgG1(dm)	ADNpc6-F y huH13-R	huH13-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-IgG1(dm)	HindIII ApaI
H14	H13 en ADNpc6-IgG1(dm)	ADNpc6-F y huH14-R	huH14-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-IgG1(dm)	HindIII ApaI
H15	H14 en ADNpc6-IgG1(dm)	ADNpc6-F y huH15-R	huH15-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-IgG1(dm)	HindIII ApaI
H16	H15 en ADNpc6-IgG1(dm)	ADNpc6-F y huH16-R	huH16-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-F y hFc-L235E-R	ADNpc6-IgG1(dm)	HindIII ApaI
L9	L1 en pETDuet-1	NMC4-VL-EcoRI-F y LC-Y71F-R	LC-Y71F-F y Kappa-BamHI-R	NMC4-VL-EcoRI-F y Kappa-BamHI-R	pIRES-DsRed2-Igk	EcoRI BamHI
L10	L9 en pIRES-DsRed2-Igk	5'IRES y huL10-R	huL10-F y 3'IRES	5'IRES y 3'IRES	pIRES-DsRed2-Igk	EcoRI BamHI
L11	L10 en pIRES-DsRed2-Igk	5'IRES y huL11-R	huL11-F y 3'IRES	5'IRES y 3'IRES	pIRES-DsRed2-Igk	EcoRI BamHI

Tabla 13. Cebadores utilizados para construir las variantes de CDR humanizadas

Cebador delantero	Secuencia	Cebador inverso	Secuencia
5'-IRES	5'-AGCTGGTTTAGTGA -3' (SEC ID NO: 72)	3'-IRES	5'-CAAGCGGGCTTCGGCCAG -3' (SEC ID NO: 73)

huL10-F	5'- ACCATCAGCTGCCAAGCCAGC CAG GACATCAGCAACTAGCTGAAC TGG-3' (SEC ID NO: 86)	huL10-R	5'- CCAGTTCAGGTAGTTGCTGATG T CCTGGCTGGCTTGGCAGGTGA TGGT -3' (SEC ID NO: 87)
huL11-F	5'- CCCAAGCTGCTGATCTACGAC GCCA GCAACCTGGAAACCGGGGTGC CC -3' (SEC ID NO: 88)	huL11-R	5'- GGGCACGCGGTTTCCAGGTT GCTGG CGTCGTAGATCAGCAGCTTGG G-3' (SEC ID NO: 89)
pcDNA6-F	5'- CACTGCTTACTGGCTTATCG AAATTA-3' (SEC ID NO: 86)	hFc-L235E-R	5'- AAGAGGAAGACTGACGGTCCC CC CTCGAG -3' (SEC ID NO: 40)
huH12-F	5'-GTTTCCGGTGGCTCCATCTC CGACTACGGTGTGACTGGA - 3' (SEC ID NO: 90)	huH12-R	5'- TCCAGTCAACACCGTAGTCGG AG ATGGAGCCACCGGAAAC -3' (SEC ID NO: 91)
huH13-F	5'- GTTTCCGGTGGCTCCATCTCC GAT ACGGTTGGGACTGGATCGGTC AG -3' (SEC ID NO: 92)	huH13-R	5'- CTGCAGGATCCAGTCCCAACC GT AGTCGGAGATGGAGCCACCGG AAAC -3' (SEC ID NO: 93)
huH14-F	5'-GTTCCACCGACTACAACCCC TCTCTGAAATCCCGT-3' (SEC ID NO: 94)	huH14-R	5'- ACGGGATTTCAGAGAGGGGTT GTAGTCGGTGGAAC -3' (SEC ID NO: 95)
huH15-F	5'GTTTCCGGTGGCTCCATCTC CTCCTACTATTGGTCCTGGATC CGTCAG -3' (SEC ID NO: 96)	huH15-R	5'- CTGACGGATCCAGGACCAATA GTA GGAGGAGATGGAGCCACCGGA AAC -3' (SEC ID NO: 97)
huH16-F	5'- GAATGGATCGGTTATATCTATT ATTC CGGTTCCACCAACTACAACCC CTCT -3' (SEC ID NO: 98)	huH16-R	5'- AGAGGGGTTGTAGTTGGTGGA ACCG GAATAATAGATATAACCGATCC ATTC -3' (SEC ID NO: 99)

Luego, se examina la importancia de los residuos murinos restantes (por ej., H31, H33, y H35) en la HCDR1 humanizada en la variante H14, mediante el cambio de estos residuos a sus contrapartidas humanas en la secuencia 4-59 de la línea germinal de VH (por ej., un cambio D31S, G33Y y D35S). La construcción resultante, H15, tiene una secuencia de **GGSISSYYWS** (SEC ID NO: 110) para HCDR1 comparada con la secuencia parcialmente humanizada de **GGSISDYGWD** (SEC ID NO: 111) en H14. Por último, la HCDR2 completa de H15 se convierte a su contrapartida humana en VH4-59 (de **MIWGDGSTDYNSALKS**

(SEC ID NO: 8) a **YIYYSGSTNYP**SLKS (SEC ID NO: 119), un total de 7 diferencias de residuos) para crear otra variante, H16, que tiene HCDR1 y HCDR2 completamente humanas. Las variantes H15 y H16 se aparean en forma individual con la variante L10 de cadena liviana para producir las variantes de anticuerpo H15-L10 y H16-L10, respectivamente.

Estas variantes se evalúan en un ensayo de aglutinación plaquetaria para determinar sus actividades. Los datos presentados en la Tabla 14 sugieren que el reemplazo de la HCDR1 entera con secuencia humana anula la actividad anti-vWF. Esto sugiere que los tres residuos restantes en la HCDR1 (por ej., D en la posición H31, G en la posición H33 y D en H35) son importantes para retener la actividad, incluso si estos residuos no pueden hacer contacto con el antígeno en forma directa, como lo sugiere la estructura cristalina reportada por Celikel, et al (*Nat. Struct Biol* 5:189). El reemplazo completo de la HCDR2 con la HCDR2 de 4-59 humana no restauró la actividad perdida de H15, hecho consistente con las indicaciones de los estudios cristalográficos de Celikel et al., que sugieren que tres de los residuos de HCDR2 (por ej., H53, H54 y H58) interactúan en forma directa con el antígeno vWF.

Tabla 14: Valores de *EC*₅₀ de las variantes “super-humanizadas”

Anticuerpo	<i>EC</i> ₅₀ (nM)
Quimera NMC-4	0,18±0,03 (n=9)
H9, L9 (con injerto de CDR)	0,12 (n=2)
H12, L9	0,29
H13, L9	0,16 (n=2)
H14, L9	0,13 (n=2)
H13, L10	0,20
H14, L10	0,22±0,05 (n=5)
H14, L11	1,63
H15, L10	ND
H16, L10	ND

Ejemplo 3: Reformateo de Isotipos de Anticuerpos

En un método representativo, puede ser deseable reformatear variantes de VH del formato IgG1 mutado a un formato IgG4 dado que IgG1 es un isotipo activo con respecto a la activación de complemento y la producción de respuestas efectoras, mientras que IgG4 es relativamente inactiva. Por ejemplo, las variantes de VH candidatas se convierten del formato IgG1 mutado a un formato IgG4 (ver,

108

por ejemplo, SEC ID NO: 144) para generar candidatas para desarrollo. Además, se rediseñan los marcos de lectura abiertos de cadena liviana y pesada para incorporar sitios de ruptura de endonucleasas de restricción en los extremos 5' (por ej., sitios *XhoI* y *HindIII*) y 3' (por ej., sitios *BamHI* y *NotI*), para facilitar la subclonación en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pSTO518 para el desarrollo de líneas celulares corriente abajo y producción de anticuerpos a gran escala (Tabla 15).

Por ejemplo, se convierten dos de las variantes de VH humanizadas, H9 y H14 a un formato IgG4 mediante el reemplazo de la región constante de IgG1 con una región constante de IgG4 e introducción de sitios *XhoI* y *BamHI* en el extremo 5' y sitios *HindIII* y *NotI* en el extremo 3' del casete de expresión de cadena pesada. Tanto IgG1 como IgG4 contienen un sitio *ApaI* natural cerca de la unión de las regiones variables y constantes. Este sitio se utiliza para clonar el IgG4 en lugar del IgG1. Se colocan sitios de restricción *BamHI* y *NotI* en el extremo 3' de la secuencia para facilitar la subclonación posterior en el vector pSTO518. La secuencia de la región constante de IgG4 de intrón suprimido del sitio *ApaI* al codón de terminación, con los sitios *BamHI* y *NotI* agregados, es sintetizada a medida por Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA). Más aún, se cambia la secuencia señal en el vector pSTO518 a una secuencia líder Igk realizando una PCR con solapamiento con cebadores diseñados para incorporar sitios *XhoI* y *HindIII* en el extremo 5' de las regiones variables de cadena pesada y para insertar la secuencia señal Igk.

Las secuencias de cadena pesada H9 y H14 son idénticas en las regiones cebadoras, por lo tanto se utilizan los mismos cebadores y estrategias de clonación en ambas. Se producen dos productos de PCR separados, incorporando cada uno de los cambios requeridos en la región variable de cadena pesada de huNMC4-H9 (y huNMC4-H14). Se lleva a cabo una reacción de PCR que incorpora sitios de restricción *XhoI* y *HindIII* en el cebador delantero y amplifica el péptido señal Igk, utilizando pIRESdsRed-HUL10 como molde y los cebadores IgKLF (SEC ID NO: 100) e IgKHnmcR (SEC ID NO: 101) (ver Tabla 15a y Tabla 15b). Esto es seguido por un segundo paso de reacción que utiliza ADNpC6-H9 (o ADNpC6-H14) como molde y los cebadores 14VHF (SEC ID NO: 102) y 14VHR (SEC ID NO: 103) y que coincide con la primera reacción de PCR en 30

nucleótidos. El producto de PCR contiene la región variable H9 (o H14) así como los primeros cinco aminoácidos de la región constante de IgG1 a través del sitio *Apal*. Los primeros cinco aminoácidos de la región constante no difieren entre IgG1 e IgG4. La reacción también agrega un sitio *NotI* posterior al sitio *Apal* para facilitar la clonación de la región variable antes de la inserción de la región constante de IgG4. El líder kappa se agrega corriente arriba mediante el tercer paso de PCR que utiliza los productos de reacción de los dos primeros pasos como molde con el cebador delantero de la primera reacción (IgKLF) y el cebador inverso de la segunda reacción (14VHR). El producto de esta reacción se digiere con *XhoI/NotI* y se inserta en el esqueleto del plásmido principal pCIneo similarmente digerido. Esta ligadura produjo el intermediario de clonación pCI-NMC4-VH9var o (pCI-NMC4-VH14var), que contiene el líder Igk y la región variable de NMC4-H9 (o H14). El plásmido de Blue Heron Biotechnology, que contiene la región constante de IgG4 sintetizada *de novo*, se digiere con *Apal* y *NotI*, el fragmento de la región constante de IgG4 de 1kb se purifica con gel y se liga en el pCI-NMC4-VH9var o (pCI-NMC4-VH14var) digerido con *Apal/NotI*. Esto produjo los plásmidos pCI-NMC4-VH9 y pCI-NMC4-VH14. Luego de la transformación en células DH5 α , se secuencian los insertos de plásmidos de clones individuales para verificar que sean correctos.

Tabla 15a. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR de cadena pesada.

Nombre	Secuencia
IgKLF	5'CCTATCTCGAGAAAGCTTCCACCATGGAGACAGACAGACTCCT (SEC ID NO: 100)
IgKHnmcP	5'ACCCGGACCCGGATTCTGTCAGCTGCACCTGTCCAGTGGAACTTGGAAACCCAGAGC (SEC ID NO: 101)
14VHF	5'CAGGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTCCG (SEC ID NO: 102)
14VHP	5'CCTATGCGGCGCGGGGCCCTTGGTGGAAAGCGGAGGAAACGGT (SEC ID NO: 103)

Tabla 15b. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción de cadenas pesadas

PCR	Cebador delantero	Cebador inverso	Molde	Producto
1era.	IgKLF	IgKHnmcP	pIRESdsRed-huL10	<i>EcoI</i> , <i>HindIII</i> , péptido señal IgK
2da.	14VHF	14VHP	ADNpC6-huH9, (o ADNpC6-huH14)	Región variable hu-H9, <i>Apal</i> , <i>NotI</i> (o región variable hu-H14, <i>Apal</i> , <i>NotI</i>)
3ra.	IgKLF	14VHP	Productos de las dos reacciones de PCR anteriores	Región variable Hu-VH9 (o VH14)

Los cambios en las cadenas livianas L9 y L10 se obtienen por PCR. Dado que las cadenas livianas L9 y L10 son idénticas en las regiones cebadoras, se utilizan los mismos cebadores y la misma estrategia en ambas. Se producen dos moldes de PCR separados para cada cadena liviana. El primer paso de PCR incorpora sitios de restricción *Xho*I y *Hind*III en el extremo 5'. El segundo paso de PCR coincide con el primero en 30 nucleótidos e incorpora sitios *Bam*HI y *Not*I en el extremo 3' del fragmento. Estos dos productos de PCR separados solapados se utilizan como moldes en la tercera reacción de PCR para producir un producto final de PCR con solapamiento que incorpora estos cambios mediante la amplificación de los mismos utilizando el cebador delantero del primer paso de PCR y el cebador inverso del segundo paso. El producto de la tercera reacción de PCR se digiere con *Xho*I/*Not*I y se inserta en el plásmido pCI-neo (Invitrogen) similarmente digerido, produciendo los plásmidos pCI-NMC4-VL9 y pCI-NMC4-VL10 (ver Tabla 16a y Tabla 16b para cebadores representativos y estrategia utilizada para la construcción de cadenas livianas).

Tabla 16a. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR de cadena liviana.

Nombre	Secuencia
IgKLF	5'CCTATCTCGAGAAGCTTCCACCATGGAGACAGACACACTCCT (SEC ID NO: 100)
IgKLNMC4	5'GCTGCTGGGGCTCTGGGTGATCTGGATGTCTCCAGTGGAACTGGAACTCCAGAGC (SEC ID NO: 104)
10VLF	5'GACATCCAGATGACCCAGAGCC (SEC ID NO: 105)
hKcR	5'CCTATGGGGCGGGGGATCCTATCAACACTCTCCCTGTTGAAGCTCT (SEC ID NO: 106)

Tabla 16b. Reacciones de PCR para la construcción de cadenas livianas.

PCR	Cebador delantero	Cebador inverso	Molde	Producto
1era	1	2	pIRESdsPED-huL10	<i>Xho</i> I, <i>Hind</i> III, péptido señal
2da	3	4	pIRESdsPED-huL9 o pIRESdsPED-huL10	Región variable huL9 o huL10 y región constante hlgk, <i>Bam</i> HI, <i>Not</i> I
3era	1	4	1er. y 2do. productos de PCR	Casetas de secuencias de IgG4 NMC4-VL9 o NMC4-VL10

Los isotipos IgG4 de H9-L9 y H14-L10 se generan a partir de células HEK293T según lo descrito con anterioridad en el Ejemplo 1 y se purifican

mediante cromatografía de afinidad con Proteína A. Luego, se ensayan los anticuerpos purificados en el ensayo de aglutinación plaquetaria mediada por vWF para determinar la potencia relativa. Como se muestra en la Tabla 17, la conversión al isotipo IgG4 no tuvo efecto sobre la potencia.

Tabla 17. Comparación de la actividad de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina de las variantes líderes de IgG1 e IgG4 anti-vWF.

Variante de anticuerpo	Isotipo	Aglutinación plaquetaria Valor medio de EC ₅₀ (de 2 expts. independientes)
Quimera NMC-4	Quimera IgG1	1,25 nM (1,3nM, 1,2nM)
H9-L9	IgG1	1,30 nM (1,3nM, 1,3nM)
H9-L9	IgG4	1,40 nM (1,3nM, 1,5nM)
H14-L10	IgG1	1,20 nM (1,1nM, 1,3nM)
H14-L10	IgG4	2,15 nM (2,3nM, 2,0nM)

Ejemplo 4: Unión de Anticuerpos a vWF o al Dominio A1.

Clonación del antígeno dominio A1 marcado con His: Sin aferrarse a una teoría de la revelación, se presume que NMC-4 se une al dominio A1 de vWF, que normalmente es accesible sólo cuando se activa el vWF (por ej., bajo condiciones de alto cizallamiento). Como un enfoque alternativo, puede ser deseable expresar el dominio A1 aislado de vWF, del cual se reporta se une a GP1b α con potencia equivalente a la del vWF activado intacto (Celikel et al, 1997). Por lo tanto, el dominio A1 se clona para servir como sustrato para estudios de unión a micro-pocillos. Se adquiere un clon plásmido que contiene el ADNc humano de vWF de longitud completa de ATCC (Cat#67122). El dominio A1 de vWF (por ej., residuos 499-729) se amplifica a partir de este clon con los cebadores vWF-A1-For (5'-CCCAGGAATTCCTCGGAACCGCGTTGCAC-3') (SEC ID NO: 112) y vWF-A1-Rev (5'- CCGATGCGGCCGCTCACCTCTTGGGCCCCAG-3') (SEC ID NO: 113). El producto de PCR se purifica con gel, se digiere con *EcoR*

112
I y *Not* I, y se clona en el vector pETDuet-1. El producto ligado se transforma en células competentes DH5 α para producir la forma oxidada del dominio A1.

Para construir un plásmido que expresa el dominio A1 de rata, se aísla ADN genómico de rata de hígado de rata con reactivo ADNzol siguiendo el protocolo del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cat# DN127, Cincinnati, Ohio). Luego, el ADN genómico se utiliza para una reacción de PCR con los cebadores (Rat-vWF-A1-F (5'-AGCGAATTCCCCCGAACCCCCCTGCACAACTTC-3') (SEC ID NO: 114) y Rat-vWF-A1-R (5'-AGTGCGGCCGCTTATCACCTTTTGGGTCCTGGTGATGAAACC-3') (SEC ID NO: 115). El producto de PCR se digiere con *Eco*RI y *Not*I y se clona en los mismos sitios del vector pETDuet-1. Los productos ligados se transforman en células DH5 α competentes.

Se inocula un litro de medio de cultivo bacteriano (LB o 2 $\times$ YT) que contiene los antibióticos Carbenicilina, Kanamicina y Tetraciclina, con un cultivo bacteriano de 25 ml hasta el día siguiente (por ej., cepa Origami B que porta los plásmidos p35 [pET-Duet-Rat-A1] o p36 [pET-Duet-human-A1]). El cultivo se desarrolla a 37°C en un agitador hasta una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Se induce la expresión de las proteínas recombinantes mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y luego continúa el crecimiento del cultivo a 37°C durante 4-5 horas adicionales previas a la cosecha de las bacterias por centrifugación a 6000 rpm en una centrífuga JA-10 (Beckman). El pelet celular se congela a -80°C o se procesa inmediatamente por re-suspensión del pelet en 20ml de PBS que contiene dos comprimidos disueltos de inhibidores de Proteasa completos (Roche), sometiendo la suspensión celular resultante a dos ciclos de dos minutos de desgarramiento celular (por ej., Branson Sonifier 250 equipado con una micropunta, con un ajuste de ciclos de funcionamiento constantes y ajuste de control de salida de 1-2) mientras se encontraba sobre hielo. El lisado celular se centrifuga a 16000 rpm en una centrífuga JA-20 (Beckman) durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m antes de la aplicación a una columna de 2 ml empacada con gel "His-Select HF Nickel Affinity" (Sigma) que ha sido equilibrada en buffer de unión (imidazol 5 mM, NaCl 0,3 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). La cromatografía se lleva a cabo utilizando una bomba de jeringa que regula el caudal a 1 ml/minuto. Luego, la columna se lava con 20 ml de buffer de unión,

las proteínas se eluyen con imidazol 250 mM, NaCl 0,3 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, y se recolectan fracciones de 1 ml. La mayor parte de las proteínas eluye dentro de las primeras 4 fracciones de la elución. El tamaño (~28 kD) y la integridad de las proteínas se monitorea con un gel de SDS-poliacrilamida con tinción de Coomassie. Se mezclan las fracciones de contenido máximo, se concentran a 2,5 ml, si es necesario, y se desalinizan en PBS utilizando una columna PD-10 (Amersham/GE-Healthcare). La concentración de proteína se determina utilizando un ensayo de proteína de Lowry (BioRad DC Protein Assay).

Cinética de Unión: Para evaluar los valores de K_{on} , K_{off} y K_d , se llevan a cabo ensayos de sensibilidad para lo cual se sintetizan y purifican conjugados de anticuerpos con Europio (quelato N1). Se mide la unión de estas quimeras NMC-4 marcadas con Eu y anticuerpos control de isotipos al antígeno A1 inmovilizado, utilizando un fluoroinmunoensayo de lantánido mejorado por disociación (DELFI).

Por ejemplo, el anticuerpo control (por ej., control de isotipo MOPC-21, una IgG1/ κ de plasma de mieloma humano; Sigma-Aldrich, St Louis MO) y la quimera NMC-4 se marcan con Eu. En resumen, se agrega anticuerpo a un buffer de fosfato de sodio filtrado estéril (96 mM, pH 7,4) y se dializa en forma extensiva en Solución Salina Bufferizada con Fosfato (PBS; KH_2PO_4 1,47 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, pH 7,4, NaCl 138 mM y KCl 2,67 mM) para eliminar aminas primarias bajas de bajo PM. Los anticuerpos dializados se concentran en un concentrador MicroSep lavado a 9500 RPM (7000 g) en una centrífuga JA-20 durante 20 minutos a 4°C. El anticuerpo se ajusta a 4,0 mg/ml con PBS que contiene una concentración final de NaHCO_3 100 mM, pH 9,3. La mezcla de mAb/bicarbonato (0,250 ml) se mezcla en un vial que contiene 0,2 mg de ácido N^1 -(p -isotiocianatobencil)-dietilentriamina- N^1, N^2, N^3, N^3 -tetraacético quelado con Eu^{3+} (Eu-N1-ITC; Perkin Elmer Life Sciences, Waltham MA) mediante pipeteado cuidadoso hacia arriba y abajo. La mezcla de anticuerpo y quelato reactivo con aminas se deja reaccionar hasta el día siguiente a 4°C sin agitación.

Se aplica una mezcla de anticuerpo marcado a una columna NAP-10 separada (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) pre-equilibrada con PBS. Se recolectan fracciones (por ej., 0,5 ml) utilizando PBS como buffer de columna. Se analizan muestras para determinar la proteína total (por ej., reactivo de Bradford; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) utilizando un lector de placa de

114

absorbancia SpectraMax 384 y se analizan para determinar Eu, luego de una dilución 1:10000 en Solución de Potenciación DELFIA (Perkin-Elmer), por fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF) utilizando un lector de placa Victor2 multi-marca (Perkin-Elmer). Se mezclan las fracciones positivas para proteína y marcador de Eu, y se aplican a nuevas columnas NAP-10 pre-equilibradas con Buffer de Corrida (Tris 50 mM, pH 7,4 y NaCl 138 mM). Se mezclan las fracciones de estas columnas positivas para proteína y marcador de Eu, y se aplican a columnas PD-10 pre-equilibradas con Buffer de Corrida y las fracciones positivas para proteína y marcador de Eu se mezclan y analizan para determinar el contenido de proteína total y Eu mediante TRF calibrada contra una solución estándar de europio (Perkin-Elmer). Luego, se calcula la relación fluorescencia:proteína.

Se recubren pocillos de placas Immulon-4 con dominio His-A1 de vWF humano (por ej., 25 ng en 100 µl/pocillo en Tris 30 mM, pH 7,4 y NaCl 300 mM o PBS libre de cationes divalentes) o de rata (por ej., 50 ng/pocillo) por incubación hasta el día siguiente a 4°C. Las placas se lavan tres veces con Buffer de Lavado (por ej., HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,5%), se bloquean con 300 µl/pocillo de Buffer de Bloqueo (por ej., e.g., Buffer de Lavado que contiene 3,0 mg/ml de BSA libre de IgG y 0,1% de azida de sodio) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavan 5 veces con Buffer de Lavado antes del uso.

Se llevan a cabo ensayos de unión en equilibrio como sigue. Se pre-diluye Eu-anticuerpo en Buffer de Unión (por ej., buffer de Lavado que contiene 100 µg/ml de BSA libre de IgG y azida de sodio 0,1%) y se aplica a los pocillos (por ej., 10 µl/pocillo) de una placa de 96 pocillos y las placas se sellan con una película SEALPLATE. Las placas se agitan (por ej., ajuste de velocidad de Agitación de Placas de Titulación de 4 durante ≥15 segundos o 60 segundos a TA), se colocan en cajas de nalgono que contienen toallas de papel húmedas, y se incuban en las cajas cerradas durante 2 horas a 37°C. Para la medición del marcador libre, se transfieren muestras de sobrenadante (4,0 µl) de los pocillos que contienen mezclas de unión a un grupo paralelo de pocillos que contienen Solución de Potenciación DELFIA (100 µl/pocillo). Para evaluar el anticuerpo unido, las pocillos cubiertos con A1 con las mezclas de unión restantes se lavan cinco veces con Buffer de Lavado, se secan por presión sobre las toallas de papel y se agrega

115

Solución de Potenciación DELFIA (100 μ l/pocillo) a los pocillos vacíos para la medición del marcador unido. Para la calibración del ensayo, se agrega Solución de Potenciación DELFIA (100 μ l/pocillo) a pocillos no utilizados y se agrega Estándar de Europio (1,0 μ l/pocillo). Las placas se agitan (por ej., ajuste de velocidad del Agitador de Placas de Titulación de 5 durante 10 minutos a temperatura ambiente), y se leen intensidades fluorescentes resueltas en el tiempo (TRF) utilizando un lector de placa Victor2 multi-label (Perkin-Elmer Wallac, Boston, MA). La unión se normaliza para el contenido de Eu-quelato mediante la relación fluorescencia:proteína (F:P) para los anticuerpos respectivos. La unión específica se calcula deduciendo la unión no específica (por ej., unión promedio por el control de isotipo marcado con Eu) de la unión total (por ej., unión por Eu-NMC-4). El número de sitios de unión y los valores K_d se calculan mediante el método de Scatchard (1949). Se realizan gráficos de Hill para evaluar la unión graficando $\log(\bar{v}/(n-\bar{v}))$ vs. el log de la concentración de Eu-NMC-4 libre, donde n =número de sitios de unión de alta afinidad/pocillo, $\bar{v}$ = número promedio de Eu-NMC-4 mAb/pocillo específicamente unido, y la quimera de Eu-NMC-4 libre se calcula a partir de las lecturas de TRF medidas en la fase solución.

Este análisis reveló dos clases de sitios de unión, un sitio de alta afinidad de K_d 0,37 nM y un sitio de baja afinidad de K_d 5nM. En forma similar, la unión a His-rA1 de vWF de rata capturado por mAb anti-His también exhibió dos clases de sitios de unión, con valores K_d de 0,19 y 3,4 nM (Tabla 17).

Las cinéticas de asociación se determinan utilizando el mismo protocolo, con la excepción de que se reemplaza el buffer de lavado en distintos momentos con anticuerpo marcado con europio en las concentraciones indicadas (100 μ l/pocillo). Las placas se sellan de inmediato, se agitan (por ej., ajuste de velocidad del Agitador de Placas de Titulación en 4 durante 15 segundos a temperatura ambiente), y se incuban durante los tiempos indicados a 37°C. Las placas que contienen mezclas de unión se lavan cinco veces con Buffer de Lavado, se secan por presión sobre las toallas de papel, y se registra el tiempo de lavado de cada placa. Se agrega Solución de Potenciación DELFIA (100 μ l/pocillo) a los pocillos vacíos para la medición del marcador unido descrita con anterioridad. La constante de asociación aparente, $k_{on,app}$, para cada concentración

de anticuerpo se mide ajustando la unión específica vs. tiempo con la siguiente ecuación utilizando software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

$$B = B_{\max} \cdot (1 - e^{-k_{on,app} \cdot t})$$

La velocidad de asociación aparente ($k_{on,app}$) se grafica vs. la concentración de Eu-mAb. Los datos se ajustan a la ecuación lineal

$$k_{on,app} = k_{on}[\text{mAb}] + k_{off}$$

donde la constante de asociación k_{on} es la pendiente ajustada, [mAb] es la concentración de Eu-NMC-4, y la velocidad de disociación k_{off} es la ordenada al origen ajustada.

La vida media calculada para la disociación de la quimera NMC-4 unida a His-A1 de vWF humano o de rata se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$t_{1/2,dissoc} = \frac{\ln(2)}{k_{off}}$$

La unión específica de Eu-NMC-4 a His-A1 de vWF humano o de rata se ajusta a una ecuación de asociación exponencial simple, de la que se obtienen las velocidades de asociación aparente $k_{on,app}$ (por ej., la constante k de la curva de ajuste de asociación exponencial) para cada concentración de anticuerpo marcado. Las velocidades de asociación aparente a ambos antígenos son dependientes de las dosis, según se muestra en los gráficos de $k_{on,app}$ vs. concentración de Eu-NMC-4. Los resultados se resumen en la Tabla 17 y revelaron que la quimera NMC-4 tuvo una K_d de $0,32 \pm 0,07$ nM para el dominio A1 humano y $0,28 \pm 0,01$ nM para el dominio A1 de rata. En ambos casos, estos resultados se encuentran en estrecha sintonía con los valores de K_d determinados por la unión en equilibrio. Los resultados también sugieren que el complejo antígeno-anticuerpo es de larga vida para A1 de ambas especies, con vidas medias *in vitro* para disociación de 44 minutos y 69 minutos para antígenos de humanos y ratas, respectivamente.

Tabla 18. *Cinética y unión en equilibrio de la quimera Eu-NMC-4 al dominio His-A1 de vWF humano y de rata a 37°C.*

	His-A1 (humano)	His-A1 (rata)
Constantes cinéticas		
$k_{on} \text{ (M}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$4,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
$k_{off} \text{ (M}^{-1}\text{)}^\dagger$	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$
Vida media de disociación (min)	44	69

21

k_{on} / k_{off}	0,39 nM	0,70 nM
Unión en equilibrio (K_d)		
His-A1	0,316 ±0,068 nM ^{††} (n = 10)	0,276 ±0,011 nM ^{††} (n = 5)
Competencia Homóloga (K_i)		
His-A1	0,275 ±0,064 nM (n = 4)	0,297 ±0,128 nM (n = 3)

[†] Ordenada al origen de dependencia de dosis de $k_{on,aparente}$

^{††} K_d para unión de EU-NMC-4 A ANTÍGENO RECUBIERTO EN FORMA DIRECTA (HUMANO VS. FATA) NO ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA DE ACUERDO CON EL ENSAYO T DE SIGNIFICANCIA ($P = 0,6892$).

LOS ERRORES ESTÁN DADOS EN EEM.

Pueden llevarse a cabo estudios de unión competitiva para determinar valores de K_i (por ej., una medida de afinidad relativa por un antígeno). Los ensayos se llevan a cabo de acuerdo con lo descrito con anterioridad para la cinética de asociación con excepción de que, en este caso, se aplican 80 μ l/pocillo de Buffer de Unión (por ej., Buffer de Lavado que contiene 100 μ g/ml de BSA libre de IgG, 0,1% de azida de sodio) seguido de 10 μ l/pocillo de Eu-NMC-4 o competidor no marcado con Eu y 10 μ l/pocillo de anticuerpo competidor no marcado en una serie de diluciones seridas por duplicado que oscila entre 10^{-12} M y 10^{-7} M. La concentración final de anticuerpo marcado con europio es de 100 pM. El nivel de unión basal no específica se ve significativamente reducido en presencia del agente quelante DTPA (1 μ M) de modo que éste se incluyen en los ensayos de unión competitiva. Además, el recubrimiento de los pocillos se optimiza mediante el uso de His-A1 que ha sido purificado con gel de iodoacetilo para cualquier A1 reducido de la preparación de proteína. La mezcla se incuba durante 3,75 horas para permitir que la reacción alcance el equilibrio total, se lava y une a un anticuerpo marcado determinado por TRF según lo descrito con anterioridad. Las curvas de inhibición se ajustan con el modelo de “competencia de un sitio” utilizando software Prism (GraphPad, Inc.) para obtener valores de IC_{50} y calcular la K_i utilizando las ecuaciones de Cheng y Prusoff (1973 *Biochem Pharm.* 22:3099) utilizando los valores de K_d medidos por análisis de Scatchard del experimento de unión en equilibrio.

La estandarización del ensayo de unión competitiva se demuestra mediante la comparación del valor de K_i obtenido de competencia homóloga por la quimera NMC-4 no marcada con la afinidad (K_d) medida para la unión de Eu-NMC-4 al antígeno. Para la competencia homóloga a His-A1 humana, la quimera NMC-4 es

un potente inhibidor de la unión a EU-NMC-4 con una K_i de $0,28 \pm 0,06$ nM (Tabla 19), que es consistente con la K_d observada de $0,32 \pm 0,07$ nM. En forma similar, para la competencia homóloga a His-A1 de rata, la quimera NMC-4 tuvo una K_i de $0,297 \pm 0,128$ nM (Tabla 18), que es consistente con la K_d de $0,276 \pm 0,011$ nM. En contraste, el control de isotipo no marcado, IgG1/ κ de plasma de mieloma humano, no tuvo efecto inhibitorio sobre la unión de Eu-NMC-4 al antígeno A1.

Tabla 19. Comparación de la actividad de unión (K_i mediante ensayo de competencia) de variantes de NMC humanizadas seleccionadas.

Variante de anticuerpo	Isotipo	K_i (media $\pm$ EEM)
mAb NMC-4	mIgG1	$0,60 \pm 0,13$ nM (n=3)
Quimera NMC-4	Quimera IgG1	$0,28 \pm 0,06$ nM (n=4)
IgG κ control	IgG1	No detectable
H2-L5	IgG1	$0,96 \pm 0,27$ nM (n=3)
H9-L9	IgG1	$3,51 \pm 1,21$ nM (n=4)
H9-L9	IgG4	$3,53$ nM (n=1)

Luego, se utiliza el ensayo de unión competitiva para probar la potencia de las variantes humanizadas NMC-4 H9L9 IgG1 y 4. Los dos isotipos de la variante H9L9 injertada con CDR mostraron idéntica actividad nanomolar, aunque menos potente que la de la quimera NMC-4 homóloga (Tabla 19).

El anticuerpo AJW-200 se prueba en el ensayo de unión competitiva. En contraste con las variantes humanizadas de NMC-4, que compitieron por la unión de Eu-NMC-4 a His-A1, la unión de Eu-NMC-4 a His-A1 es potenciada por AJW200 con una EC_{50} de 210 pM (Figura 2). Los gráficos de Hill plots de la unión de Eu-NMC-4 a His-A1 muestran pendientes de Hill cercanas a la unidad ($n_H = 0,984$ y $0,957$), consistentes con la unión a una única clase e sitios de unión sin cooperatividad. En contraste, los gráficos de Hill de la unión de Eu-NMC-4 a His-A1 en presencia de AJW200 1,8nM o 20nM (Figuras 2C y 2D, respectivamente) muestran pendientes de Hill mayores que uno ($n_H = 1,548$ y $1,201$), que indican cooperatividad positiva. Se observa cooperatividad positiva mediada por AJW200 en dos experimentos independientes efectuados en dos días diferentes. Estos resultados no sólo confirmaron que NMC-4 se une a un sitio de unión separado de AJW200 en el dominio A1 de vWF sino que también indican que, al menos para el

fragmento de A1 aislado, AJW200 potencia la unión de NMC-4 al sitio de unión GP1b α .

Ejemplo 5: Capacidad de los Anticuerpos para Bloquear la Adhesión Plaquetaria

Una confirmación de que un anticuerpo bloquea el sitio de unión al receptor GP1b α en vWF es su capacidad para antagonizar las interacciones vWF-GP1b en condiciones de flujo nativas. Un enfoque que ha sido desarrollado por Moake y colegas (1986, *J Clin Invest.* 78:1456-61) se ocupa del hecho de que cuando se activan células endoteliales con histamina, éstas secretan una forma ultra-grande de vWF (ULvWF), donde el dominio A1 está en la conformación abierta (por ej., activa). Esta rápidamente se degrada luego de la introducción de plasma, debido a la ruptura medida por ADAMS13 del ULvWF (Dong et al., 2002 *Blood* 100:4033-9).

En un método representativo, se dividen HUVEC de primer pasaje (P1) y se siembran en placas de 35 mm a una densidad de 1×10^5 células/placa, se cultivan durante 7 días, y se utilizan el día 7 (2-3 días después, tienen una confluencia del 100%). Las plaquetas humanas marcadas con CFSE se adhieren fácilmente a los HUVEC a un caudal de flujo de 1,2 ml/minuto (Figura 3A). Se unen muchas más plaquetas a las HUVEC cuando las células se pre-tratan con histamina 25 μ M durante 10 minutos a temperatura ambiente (Figura 3B). Esta adhesión de plaquetas se inhibió completamente cuando las plaquetas se perfundieron sobre la monocapa en buffer que contenía NMC-4, a una concentración de 10 μ g/ml (Figura 3C) y se bloqueó parcialmente cuando las plaquetas se perfundieron en presencia de un anticuerpo anti-GPIb α (por ej., AK2), a una concentración de 18 μ g/ml (Figura 3D). En contraste, la IgG control de ratón a una concentración de 18 μ g/ml no previno la adhesión plaquetaria a polímeros de vWF (Figura 3E), lo que sugiere que la adhesión de plaquetas a los HUVEC es en efecto mediada por la interacción entre el vWF derivado del endotelio y la GPIb α plaquetaria. Cuando el área cubierta por plaquetas de las 20 imágenes capturadas por corrida se midieron y cuantificaron utilizando software Compix, NMC-4 redujo la adhesión plaquetaria en >95% en comparación con un efecto despreciable provisto por el anticuerpo de control.

Ejemplo 6: Capacidad de los Anticuerpos para Prevenir la Oclusión Vascular

Se utiliza el modelo de cloruro férrico de trombosis arterial para evaluar la actividad antitrombótica de la quimera NMC-4 y el derivado humanizado (por ej., H14,L10) en comparación con AJW200. Se aísla la arteria carótida contralateral a través de la relocación de la glándula salival y tejido adiposo acompañante al sector craneal de la incisión. La arteria carótida se expone y coloca sobre un trozo de filtro de papel (por ej., 4 mm x 5 mm) que se pliega para ceñir la arteria carótida y proveer una superficie para la solución de cloruro férrico (7,5%). Luego de la aplicación de la solución de FeCl_3 durante 4 minutos, se coloca una sonda de flujo alrededor de la arteria carótida y se mide el flujo utilizando un sistema de flujo Transonic Systems Inc. (Ithaca, NY) hasta el momento de la oclusión (típicamente 10 minutos en ratas control) o hasta los 45 minutos. Se administra a grupos de 4 ratas ($n=6$ para solución salina) dosis IV que oscilan entre, por ejemplo, 5 y 0,01mg/kg de quimera NMC-4, V14,L10, AJW200 o IgG control a un volumen de 1μl/g de peso corporal de rata. Las preparaciones de anticuerpo se esterilizan por filtración y se analizan para asegurar un bajo contenido de endotoxinas utilizando el kit de ensayo LIMULUS AMOEBOCYTE ASSAY KIT (BioWhittaker) siguiendo el protocolo del fabricante y también se evalúan para determinar la mono-dispersión mediante análisis de HPLC antes de su uso para estudios con animales.

Como se muestra en la Figura 4, tanto NMC-4 como AJW200 inhibieron en forma significativa la oclusión de los vasos. NMC4 mostró una ED_{50} , a una dosis de 0,03 y 0,1 mg/kg, similar a la de AJW200. El derivado humanizado, H14,L10, también mostró actividad similar con una ED_{50} también entre 0,03 y 0,1 mg/kg de dosis (Figura 4B).

Ejemplo 7: Efecto de los Anticuerpos sobre el Tiempo de Sangrado y la Pérdida de Sangre

A veces, la pérdida de sangre puede ser un efecto colateral adverso asociado con los agentes antiplaquetarios (por ej., anticuerpos anti-vWF). Por consiguiente, puede ser necesario evaluar los anticuerpos NMC-4 humanizados para determinar su potencial de contribuir a las complicaciones de sangrado. Para esto, se lleva a cabo un ensayo de tiempo de sangrado estándar, donde se administra anticuerpo control, quimera NMC-4 o AJW200, 30 minutos antes de llevar a cabo un corte transversal en la cola. Para el corte transversal de la cola, se corta el extremo final (por ej., 0,5mm) de la cola y la cola se coloca en un

volumen conocido de solución salina tibia y se mide el tiempo requerido para que se detenga el sangrado. La pérdida de sangre también se mide evaluando el contenido de hemoglobina de las células sanguíneas recolectadas en solución salina durante el ensayo del tiempo de sangrado. Para esto, se peletizan glóbulos rojos mediante centrifugación a baja velocidad, se resuspenden en solución salina que contiene TritonX100 1%, que se ajusta a un volumen final de 5ml, y la concentración de hemoglobina de la solución se mide determinando la absorbancia a 420nm.

La quimera NMC-4 mostró la misma dosis de ED₅₀ de 0,09 mg/kg para un aumento significativo en el tiempo de sangrado que el derivado humanizado H14-L10. En la dosis de 0,03 mg/kg asociada con la eficacia para estos dos anticuerpos en el modelo FeCl₃ de trombosis arterial, no se observó una prolongación significativa del sangrado ni un aumento de la pérdida de sangre. NMC-4 y su derivado humanizado exhiben una respuesta a la dosis por ED₅₀ ligeramente mejorada con respecto a la de AJW200, cuya dosis de ED₅₀ en la rata para el aumento del sangrado se encuentra mucho más cerca de su dosis de ED₅₀ para actividad antitrombótica, lo que sugiere que NMC-4 ofrece una ventana terapéutica mejorada en comparación con AJW200.

Tabla 20. Efecto de la quimera NMC-4 y su derivado humanizado, H14,L10, comparado con AJW200 sobre el tiempo de sangrado y la pérdida de sangre en rata.

Anticuerpo	Tiempo de sangrado (min.) Media ± EEM (n)	Pérdida de sangre (mL) Media ± EEM (n)
Solución Salina	3,1 ± 0,3 (16)	0,287 ± 0,055 (9)
NMC-4 (quimera)	ED ₅₀ = 0,09 mg/kg	
0,01 mg/kg	2,7 ± 0,3 (2)	0,059 ± 0,009 (2)
0,03 mg/kg	4,1 ± 0,2 (4)	0,076 ± 0,014 (4)
0,10 mg/kg	19,7 ± 0,9 (2)	1,503 ± 0,485 (2)
0,30 mg/kg	32,7 ± 4,4 (3)	1,501 ± 0,213 (3)
3,00 mg/kg	32,3 ± 2,3 (2)	1,106 ± 0,243 (4)
H14, L10 (humanizado)	ED ₅₀ = 0,09 mg/kg	
0,03 mg/kg	2,03 ± 0,35 (3)	0,094 ± 0,035 (3)
0,10 mg/kg	15,30 ± 1,70 (4)	0,630 ± 0,294 (4)
0,30 mg/kg	26,45 ± 3,09 (4)	1,583 ± 0,312 (4)
AJW200	ED ₅₀ = 0,05 mg/kg	
0,01 mg/kg	2,8 ± 0,25 (2)	0,177 ± 0,059 (2)
0,03 mg/kg	3,2 ± 1,56 (7)	0,250 ± 0,059 (4)
0,10 mg/kg	25,1 ± 0,4 (5)	1,943 ± 0,420 (2)
0,30 mg/kg	29,2 ± 0,72 (5)	2,074 ± 0,521 (3)
3,00 mg/kg	30,9 ± 0,62 (3)	2,912 ± 0,243 (4)

22

Otro parámetro de los efectos colaterales adversos de estos anticuerpos sobre la hemostasis es la pérdida de sangre, que se ensaya sobre la sangre recolectada mientras se determinan los tiempos de sangrado. Nuevamente, con dosis superiores a 0,1 mg/kg, estos anticuerpos indujeron una pérdida de sangre significativa. Sin embargo, con dosis de 0,3 y 3 mg/kg, AJW200 causó pérdidas de sangre considerablemente mayores que la quimera NMC-4 con las mismas dosis, aunque estas diferencias sólo se aproximaron a valores estadísticamente significativos para los grupos de 3,0 mg/kg donde n=4 en vez de 3 (Tabla 20). El anticuerpo variante H14, L10 no mostró diferencia significativa con la quimera NMC-4 original.

Ejemplo 8: Efecto de los Anticuerpos sobre las Plaquetas Circulantes y el Recuento de Glóbulos Blancos

Se presume que algunos agentes antiplaquetarios inhiben la formación de trombosis mientras que al mismo tiempo pueden causar trombocitopenia (Hansen et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 298:165-71 (2001)). Para determinar el efecto de NMC-4 sobre el número de glóbulos blancos circulantes (WBC) y plaquetas en animales tratados, se inyecta un grupo de cinco ratas (por ej., por vía intravenosa) con pesos de 230-260g, con NMC-4 a razón de 1 mg/ml y se inyecta un grupo control de 3 ratas con un vehículo de control (por ej., PBS de grado quirúrgico). Antes de la inyección, se utiliza sangrado de cola para medir los recuentos basales de células sanguíneas, utilizando, por ejemplo el HEMAVET HEMATOLOGY ANALYZER™ (Drew Scientific). Se recolectan muestras de sangre en puntos de tiempo pre-especificados de hasta 48 horas (por ej., 30 minutos, 2, 4, 24 y 48 horas) luego de la inyección de anticuerpo o solución salina, de ratas no anestesiadas mediante extracción retroorbital utilizando una pipeta capilar. Luego, se transfieren aproximadamente 40 µl de sangre a un tubo que contiene 5 µL de solución anticoagulante de citrato-dextrosa acidificada (ACD) y se muestrean inmediatamente en un contador celular HEMAVET para determinar el número de plaquetas y glóbulos blancos. Para cada extracción de sangre, se toman muestras de ojos alternados.

NMC-4 tuvo un pequeño efecto sobre el recuento plaquetario en cualquiera de los puntos de tiempo analizados. Se observó una reducción temporal en el recuento de los glóbulos blancos del 37,5% (p=0,016) 30 minutos después de la

inyección, pero también se observó una reducción similar tras la inyección de vehículo de PBS. Los niveles de los glóbulos blancos regresaron a los valores basales entre 2 y 4 horas después de la inyección en los grupos tratados con NMC-4 y vehículo control.

Ejemplo 9: Establecimiento de Líneas Celulares para la Expresión de Anticuerpos

Puede desarrollarse un sistema de alto rendimiento de expresión de proteínas de mamíferos, basado en una plataforma de Expresión de Cromosomas Artificiales (ACE) murina que ha sido manipulada genéticamente para contener múltiples sitios aceptores de recombinación sitio-específicos, que pueden cargarse con secuencias génicas heterólogas utilizando una lambda integrasa mutante (por ej., ACE integrasa) en combinación con un vector lanzadera de localización (Lindenbaum *et al*, (*Nucl. Acid Res.* 32 (21):e172 (2004); Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Nos. 2003/0119104A1 y 2006/0246586 A1). Este sistema se utiliza para generar líneas celulares estables para la expresión de variantes humanizadas seleccionadas y la quimera NMC-4.

Los insertos de los plásmidos pCI-NMC4-VL10 y pCI-NMC4-VH14 se digieren con *Not* 1 más *Hind*III (vector de cadena liviana) o *Xho*I y *Bam*HI (vector de cadena pesada) y se clonan en forma secuencial en el MCS 1 (cadena liviana) y MCS 2 (cadena pesada) del vector pSTO518. El vector pSTO518 que porta los insertos de cadena pesada y liviana en tándem sirve de vector lanzadera para la transferencia en los Vectores de Localización ACE (ATV) con diferentes genes de resistencia, derivados de los vectores de localización descritos por Lindenbaum *et al*, (*Nucl. Acid Res.* 32 (21):e172 (2004); Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Nos. 2003/0119104A1 y 2006/0246586 A1). Para transferir el casete que contiene ambas cadenas de anticuerpo pesadas y livianas en los ATV, el vector pSTO518-VH14, VL10 se digiere con las endonucleasas "homing" I-CeuI y PI-SceI (New England Biolabs, MA). El VH14 más el fragmento VL10 se purifica con gel y se clona en los sitios equivalentes del pZeo y pHygro-ATV pre-digeridos con las mismas endonucleasas I-CeuI y PI-SceI. Esto da los plásmidos pNHT605-H14L10-IgG4 (gen *hyg*^R) y pNHT607-H14L10-IgG4 (gen *p zeo*^R).

En forma similar, se construyen vectores de localización pSTO518 que portan la quimera NMC-4 IgG4, y el inserto tándem subclonado en los vectores

ATV pZeo y pHygro, que dan los plásmidos pNHT623 (quimera humana IgG4 más el gen hyg^R) y pNHT624 (quimera humana IgG4 más el gen zeo^R).

Para la integración localizada en la plataforma ACE, se siembran células huésped de la plataforma ACE ChK2 a una densidad de $0,4 \times 10^5$ células por pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos y se cultivan hasta el día siguiente. Tres horas antes de la transfección, se reemplaza el medio de cultivo con medio libre de suero y luego de 3 horas se transfecta con 1 µg del vector y 1 µg del vector de expresión de ACE Integrasa complejo con reactivo LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después, se expanden las células sobre placas de cultivo de 15 cm y, al día siguiente, se agregan 3,0 µg/ml de zeomicina o higromicina (dependiendo del vector utilizado) al medio de cultivo. Luego de 14 días de selección, se aíslan las colonias resistentes a los fármacos utilizando anillos de clonación y clones individuales amplificados para el análisis de la producción de anticuerpos.

Ejemplo 10: Eficacia y Seguridad *in vivo* del Anticuerpo NMC-4

Se ensayan la eficacia y seguridad del anticuerpo humanizado NMC-4 en un modelo animal *in vivo* (por ej., mandril).

En un método representativo, se anestesian mandriles con clorhidrato de ketamina (Anaket-VTM de la Premier Pharmaceutical Company) (10 mg/kg IM/30 minutos o cuando se requiera para mantener la anestesia general) y se mantiene su temperatura corporal a 37°C con una camilla calefactora. Luego, se disecciona cuidadosamente un segmento de 4-5 cm de los vasos femorales libre de tejido circundante. Se ligan todas las ramificaciones cercanas a la arteria femoral y vena femoral. Luego, se realiza una pequeña incisión en la arteria femoral y en la vena femoral y se insertan conectores vasculares que se aseguran con hilo de seda quirúrgico. Luego, se unen tubos de silicona a los conectores vasculares para entubar la sangre arterial en la vena femoral. El entubado directo de la circulación arterial a la venosa mientras se hace un bypass de los capilares aumenta el flujo sanguíneo a aproximadamente 150-300 ml/minuto. Se une una sonda de flujo ultrasónica de tipo tubular (Transonic Systems Inc, Maastricht, Holanda) al tubo de silicona y se permite la estabilización del flujo sanguíneo durante aproximadamente veinte minutos. Se mide el flujo sanguíneo promedio y fásico en

forma continua a lo largo del experimento con el tubo utilizado para la administración de fármacos y para el muestreo de sangre.

Luego, se lesiona el endotelio de la arteria femoral junto al conector vascular con un portaagujas Martin (Hegar-Baumgartner TC Gold 14cm, Código del producto 20.634.14) ejerciendo una presión intensa sobre el endotelio durante 10 segundos a máxima depresión. Se realizan dos lesiones solapadas y se coloca un precinto plástico ajustable sobre el sitio de la lesión para reducir el flujo sanguíneo en un 10 a 20% del valor basal. Se observa una reducción gradual en el flujo sanguíneo a causa de la formación de trombos. Cuando se reduce el flujo sanguíneo a ≤ 5 ml/minuto, se abre el precinto para retirar el trombo rico en plaquetas. Luego, se aplica nuevamente la estenosis externa y se reinicia el proceso de formación de trombos. Este patrón repetitivo de reducción del flujo sanguíneo seguido por restauración mecánica se denomina reducciones del flujo cíclico (CFR). Se mide el número de CFR en función del tiempo. Se registran las reducciones del flujo cíclico basales (CFR) durante 30 minutos. Se inyecta solución salina y se monitorean las CFR durante 30 minutos adicionales. Se utiliza la variante humanizada H9L9 IgG4 de NMC-4 descrita en el Ejemplo 3 (denominada de aquí en más GBR 600).

Pueden utilizarse dos métodos para evaluar el sangrado tras la administración de fármacos. En un primer método, se determina el tiempo de sangrado de la piel, con el uso de una plantilla, en la superficie del antebrazo. Se aplica un tensiómetro alrededor del brazo y se infla a 40 mm Hg, luego de lo cual se induce una herida con el dispositivo Surgicut (ITC, Edison, NJ). El tiempo de sangrado de la piel se define como el tiempo entre la inducción de la herida y la cesación visual del sangrado. La sangre se toca cuidadosamente cada quince segundos con papel de filtro sin hacer contacto con la herida. Las mediciones se detienen cuando el tiempo de sangrado de la piel excedió los 900 segundos (por ej., 15 minutos) y se considera de 900 segundos.

En el segundo método, se evalúa la pérdida de sangre de una incisión mediante una anexina V recombinante en un modelo de lesión de la arteria carótida de un conejo (ver, por ej., P. Thiagarajan et al. (1997) *Circulation* 96(7):2339-47). Se realiza una incisión de 2 cm x 0,8 cm en la ingle y se insertan hisopos de gasa pre-pesados que se reemplazan luego de cada período de

126

infusión de dosis de treinta minutos o cuando están saturadas con sangre. Todas las gasas se pesan al final del estudio para determinar la cantidad de sangre perdida. El valor para cada dosis se expresa como una relación respecto de la gasa de fase control de solución salina. Se monitorean el ritmo cardíaco y la presión sanguínea en forma continua durante todo el estudio, a intervalos de diez minutos.

Al final de cada período de dosificación, se extraen un mililitro de sangre con EDTA, y diez mililitros de sangre citrada, y se determinan el recuento de plaquetas FBC, el tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial activada, el Factor VIII y vWF. Se congelan dos alícuotas de 300 µl c/u a -80°C para enviar a los investigadores para pruebas de laboratorio *in vitro* adicionales, de ser necesario. En forma similar, se extrae sangre, 0,5, 1, 2, 8, 24 y 48 horas después de finalizado los estudios de flujo. Al final de la dosis final, se llevan a cabo ensayos de agregación plaquetaria con muestras de ensayo y control.

Luego de la dosis acumulativa (por ej., cuando se observa inhibición completa de las CFR), se infunde epinefrina (Intramed) con una dosis de 2,2 µg/kg/min durante veinte minutos y se miden nuevamente las CFR. La epinefrina no produce agregación plaquetaria en mandriles por sí sola, pero puede restaurar las variaciones de flujo cíclico anuladas mediante la potenciación de otros factores de agregación plaquetaria (ver, por ej., G. Anfossi *et al.* (1996) Eur J Clin Invest. 26:353-370).

Estudios de Eficacia y Seguridad de GBR 600: Se realizan los estudios 1 a 4, descriptos a continuación, para determinar la eficacia y seguridad de GBR600.

Estudio 1: Se lleva a cabo un estudio piloto con n=1 animal para establecer una curva de respuesta a la dosis con cantidades crecientes de GBR 600 e identificar la dosis efectiva donde se observe la inhibición máxima de las CFR. Se determinan el tiempo de sangrado con plantilla y el sangrado incisional para todas las dosis ensayadas. Se toman muestras de sangre hasta cuarenta y ocho horas para establecer la farmacocinética del anticuerpo en su dosis más elevada.

Se inyectan las siguientes dosis crecientes de GBR 600 a intervalos de treinta minutos y se registra el flujo mientras dura el estudio: Dosis 1, 0,03 mg/kg; Dosis 2, 0,1 mg/kg; Dosis 3, 0,3 mg/kg; Dosis 4, 1 mg/kg; y Dosis 5, 10 mg/kg.

Luego, se llevan a cabo ensayos de sangrado diez minutos después de la inyección de cada dosis.

La Figura 5 y la Tabla 21 describen el efecto de dosis crecientes de GBR 600 sobre las CFR. La arteria se re-lesiona cerca del fin de la fase basal de treinta minutos, dado que, aparentemente, las CFR no eran estables. Una dosis de 0,03 mg/kg de GBR 600 redujo el número de CFR a 5/30 minutos en comparación con los 8/30 minutos para la fase con solución salina. La infusión de una dosis adicional de 0,1 mg/kg inhibió completamente las CFR. Esto es confirmado por el hecho de que una re-lesión de la arteria no causó un regreso de las CFR. Se observa la inhibición para todas las siguientes dosis crecientes. Luego de la infusión de la dosis máxima de GBR 600 (10mg/kg), se infunde epinefrina a una velocidad de 2,2 µg/kg/minuto para establecer si se logra una inhibición fuerte o débil de la deposición plaquetaria. La infusión de epinefrina dio lugar a un aumento temporal del flujo sanguíneo debido a su efecto sobre la presión sanguínea, pero no revirtió la inhibición de las CFR.

Tabla 21. Efecto de dosis crecientes de GBR 600 sobre las CFR (0,03 -10 mg/kg)

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulativa (mg/kg)	Número de CFR
Basal	0	8
Solución Salina	0	8
0,03	0,03	5
0,1	0,13	0
0,3	0,43	0
1	1,43	0
10	11,43	0

Estudio 2: Se lleva a cabo el Estudio 2 de un modo similar al Estudio 1, con la excepción de que se incluye una dosis de 0,01 mg/kg al comienzo del escalamiento de dosis, previa a la dosis de 0,03 mg/kg, dado que se ha observado en el Estudio 1 una inhibición parcial de las CFR a la dosis de 0,03 mg/kg.

En el Estudio 2 (ver, por ej., la Figura 6 y la Tabla 22), se observa un efecto sobre las CFR con una dosis de 0,01 mg/kg de GBR 600 (7CFR/30minutos, comparada con 9CFR/30minutos para la solución salina). Sin embargo, la infusión de una dosis adicional de 0,03 mg/kg (dosis acumulativa = 0,04 mg/kg) causó la inhibición completa de las CFR. Por lo tanto, la ED₁₀₀ de GBR 600 es 0,04 mg/kg. La re-lesión de la arteria no revirtió la inhibición de las CFR, lo que indica una inhibición real. El efecto inhibitorio se mantiene con las dosis más elevadas hasta

128

en la dosis máxima de 10 mg/kg. La infusión de epinefrina dio lugar a una reducción temporal del flujo sanguíneo debido a su efecto sobre la presión sanguínea, pero no revirtió la inhibición de las CFR.

Tabla 22. Efecto de dosis crecientes de GBR 600 sobre las CFR (0,01 – 10 mg/kg)

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulativa (mg/kg)	Número de CFR
Basal	0	9
Solución Salina	0	9
0,01	0,01	7
0,03	0,04	0
0,1	0,14	0
0,3	0,44	0
1	1,44	0
10	11,44	0

Estudio 3: Se lleva a cabo el Estudio 3 de un modo similar al Estudio 1 con la excepción de que se administra una dosis inicial de 0,005 mg/kg seguida de otra dosis de 0,005 mg/kg (dosis acumulativa=0,01 mg/kg) y luego se aumenta en 6 incrementos de 0,01 mg/kg.

En el Estudio 3 (ver, por ej., la Figura 7), se observa un efecto sobre las CFR (reducción de 8 CFR/30 minutos versus 7 CFR) por la infusión de una dosis de 0,005 mg/kg de GBR 600. Las CFR disminuyeron en forma lineal con dosis crecientes de GBR 600. El número de CFR por período de dosificación se muestra en la Tabla 23 y en la Figura 8. La Figura 8 representa la reducción lineal en el número de CFR asociadas con dosis crecientes de GBR 600. La relación entre el número de CFR y la dosis de GBR 600 se expresa mediante la siguiente ecuación. Los datos se ajustan a esta ecuación con R2= 0,9901.

Número de CFR/período de dosificación = -109 X dosis de GBR 600 (mg/kg) +7,4517.

En el Estudio 3, la ED₁₀₀ es de 0,07 mg/kg en comparación con la inhibición completa en el Estudio 2 causada por una dosis acumulativa de 0,04 mg/kg. El tiempo transcurrido entre las dosis crecientes es de treinta minutos en el Estudio 3. Esta discrepancia en las ED₁₀₀ observadas puede ser causada por una reducción de la concentración de GBR 600 en sangre como consecuencia de la depuración inicial del fármaco. La infusión de epinefrina revierte la inhibición de las CFR. Esto podría estar relacionado con la forma de la curva de CFR para la dosis acumulativa de 0,07 mg/kg. La inhibición se revierte lentamente con una dosis

acumulativa de 0,07 mg/kg, lo que es un indicador de un trombo en crecimiento. En estas condiciones particulares, la epinefrina parece ser capaz de revertir la CFR.

Tabla 23. Efecto de dosis acumulativas de GBR 600 sobre las CFR (0,005 – 0,07 mg/kg)

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulativa (mg/kg)	Número de CFR
Basal	0	8
Solución Salina	0	8
0,005	0,005	7
0,005	0,01	6
0,01	0,02	5
0,01	0,03	4
0,01	0,04	3
0,01	0,05	2
0,01	0,06	1
0,01	0,07	0

Estudio 4: Se lleva a cabo el Estudio 4 de un modo similar al Estudio 1, con la excepción de que se utiliza Clopidogrel como control positivo en tres Mandriles para comparar la eficacia y la tendencia al sangrado de GBR 600 administrada a razón de 1, 1,5, 2,5, 5 y 10 mg/kg contra clopidogrel.

En el Estudio 4, el clopidogrel inhibió completamente las CFR con una dosis acumulativa de 10 mg/kg en el Mandril 1 y 5 mg/kg en los Mandriles 2&3, según se muestra en la Tabla 24 y en la Figura 9 que ilustra los resultados del Mandril 3 en la Tabla 24. La infusión de epinefrina revirtió la inhibición de las CFR.

Tabla 24. Efecto de dosis crecientes (1 – 10 mg/kg) de clopidogrel en mandriles.

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulativa (mg/kg)	Número de CFR Mandril 1	Número de CFR Mandril 2	Número de CFR Mandril 3
Basal	0	13	8	6
Solución Salina	0	13	7	8
1	1	8	8	7
1,5	2,5	5	2	2
2,5	5	2	0	0
5	10	0	0	0
10	20	0	0	0

Tiempos de Sangrado con Plantilla: En los Estudios 1 y 2 los tiempos de sangrado con plantilla tienen una duración mayor a los quince minutos con todas las dosis superiores a 0,04 mg/kg. En el estudio de control positivo con clopidogrel (Bristol-Myers Squibb/Sanofi Pharmaceuticals), los tiempos de sangrado con plantilla se prolongan en la misma proporción observada con las dosis acumulativas mayores que 2,5 mg/kg. En el Estudio 3, los tiempos de sangrado con plantilla nunca se prologan más allá de los quince minutos. Los tiempos de sangrado con plantilla no son una medida muy precisa de la tendencia al sangrado ya que muestran una alta variabilidad basal (ver, por ej., los valores basales de clopidogrel en los Mandriles 1, 2, 3). Como tales, los tiempos de sangrado con plantilla no se consideran modelos demasiado predictivos para sangrados clínicamente relevantes, tal como en un ámbito preoperatorio (ver, por ej., Lind *et al. Platelets*, seg. ed., p485-493, Michelson AD ed., Academic Press.). El ensayo de sangrado incisional muestra una variación menor dado que cuantifica la cantidad real de sangre perdida a través de la incisión y que tiene un mayor rango dinámico. Por lo tanto, el ensayo de sangrado incisional se realiza además del ensayo de sangrado con plantilla. Estos datos se resumen en las Tablas 25 y 26.

Tabla 25. Tiempo de Sangrado con Plantilla para GBR 600 [minutos]

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulativa (mg/kg)	Estudio 1	Estudio 2	Estudio 3
Basal	0	5,5	6,25	2
Solución Salina	0	2,5	7	4,45
0,005	0,005	n.a.	n.a.	5,25
0,005	0,01	n.a.	n.a.	5,25
0,01	0,02	n.a.	n.a.	6
0,01	0,03	n.a.	n.a.	7,45
0,01	0,04	n.a.	n.a.	2,5
0,01	0,05	n.a.	n.a.	3,5
0,01	0,06	n.a.	n.a.	7,45
0,01	0,07	n.a.	n.a.	5,45
0,01	0,01	n.a.	2,45	n.a.
0,03	0,03/0,04	5,25	>15	n.a.
0,1	0,13/0,14	>15	>15	n.a.
0,3	0,43/0,44	>15	>15	n.a.
1	0,143/1,44	>15	>15	n.a.
10	11,43/11,44	>15	>15	n.a.

Tabla 26. Tiempo de Sangrado con Plantilla para Clopidogrel [minutos]

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulativa (mg/kg)	Mandril 1	Mandril 2	Mandril 3
Basal	0	>15	5,5	13

Solución Salina	0	n.d.	n.d.	n.d.
1	1	3,5	n.d.	7
1,5	2,5	>15	>15	>15
2,5	5	>15	>15	>15
5	10	>15	>15	>15
10	20	>15	>15	>15

Las Tablas 27 y 28 muestran los resultados obtenidos con el ensayo de sangrado incisional para clopidogrel y GBR 600. La cantidad de sangre absorbida por la gasa aumentó en un principio con la dosis y es autolimitativa en dosis elevadas. En todos los estudios, el mayor sangrado observado se produjo con la cuarta dosis, luego de lo cual se reduce el volumen de sangre absorbido por la gasa y parece que tiene lugar el sanado de la herida. En los Estudios 1 y 2, el sangrado máximo es similar al del clopidogrel, aunque el clopidogrel se ensaya con un múltiplo de 2-4 veces el valor de ED₁₀₀ y GBR 600 en un múltiplo de hasta 250 veces ese valor. En el Estudio 3, se observa un sangrado insignificante con todas las dosis inyectadas.

Tabla 27. *Ensayo de Sangrado Incisional para GBR 600 [múltiplos del valor de la solución salina]*

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulativa (mg/kg)	Estudio 1	Estudio 2	Estudio 3
Basal	0	n.a.	n.a.	n.a.
Solución Salina	0	1	1	1
0,005	0,005	n.a.	n.a.	0,13
0,005	0,01	n.a.	n.a.	0,08
0,01	0,02	n.a.	n.a.	0,05
0,01	0,03	n.a.	n.a.	0,05
0,01	0,04	n.a.	n.a.	0,02
0,01	0,05	n.a.	n.a.	0,03
0,01	0,06	n.a.	n.a.	n.d.
0,01	0,07	n.a.	n.a.	n.d.
0,01	0,01	n.a.	2,5	n.a.
0,03	0,03/0,04	0,125	0,5	n.a.
0,1	0,13/0,14	0,625	4,75	n.a.
0,3	0,43/0,44	3,125	7,75	n.a.
1	0,143/1,44	7,625	5,75	n.a.
10	11,43/11,44	4	1,75	n.a.

Tabla 28. *Ensayo de Sangrado Incisional para Clopidogrel [múltiplos del valor de la solución salina]*

Dosis (mg/kg)	Dosis Acumulativa (mg/kg)	Mandril 1	Mandril 2	Mandril 3
Basal	0	n.a	n.a.	n.a
Solución Salina	0	1	1	1
1	1	1,59	1,21	1,28
1,5	2,5	1,06	1	1,1
2,5	5	1,41	6,64	3,32
5	10	5,82	13,64	0,95
10	20	9,12	2,64	0,92

Ventana Terapéutica y Bleedscore de GBR600: En la Figura 10, se grafican los resultados del ensayo de sangrado incisional del Estudio 1 y 2 y los tres estudios con clopidogrel en función de las dosis de GBR 600 y clopidogrel (las dosis se expresan como múltiplos de sus ED₁₀₀ y se grafican en escala logarítmica).

GBR 600, aun con dosis mayores que 100 veces su ED₁₀₀, provoca sangrado a un nivel observado en clopidogrel con sólo hasta 4 veces su ED₁₀₀. Inesperadamente, GBR 600 tiene una ventana terapéutica de seguridad sin precedentes en términos de riesgo de sangrado.

El único aumento clínicamente relevante en el sangrado observado en este estudio es un aumento en el sangrado autolimitativo de cortes superficiales, según lo determinado por los métodos de sangrado con plantilla y sangrado incisional. Los animales son observados detenidamente durante un período de cuarenta y ocho horas después de la intervención quirúrgica y no se detectan signos adicionales de sangrado superficial tales como facilidad para la formación de magulladuras, petequia o equimosis. Lo que es aún más importante, no se observan signos de sangrado interno tales como hematoma, epistaxis, pérdida de sangre por la boca, vagina, melena, sangrado ocular, hematuria, hematemesis. La herida de la operación no sangró y sanó normalmente.

Tanto clopidogrel como GBR 600 tienen una puntuación de 1 en el esquema de calificaciones BleedScore, que se muestra en la Tabla 29. Además del aumento del sangrado en las heridas superficiales, no se detectan otros síntomas en los animales durante el experimento ni durante un período de observación de cuarenta y ocho horas luego de la conclusión de los estudios.

Tabla 29. Determinación del BleedScore para clopidogrel y GBR 600

Determinación del BleedScore				
Gravedad del Sangrado	Síntomas	Puntuación	Clopidogrel	GBR600
Sangrado Superficial	Facilidad para la formación de magulladuras	1	0	0
	Sangrado de cortes pequeños	1	1	1
	Petequia	1	0	0
	Equimosis	1	0	0
Sangrado Interno	Hematoma	3	0	0
	Epistaxis	3	0	0
	Pérdida de sangre dpor la boca, vagina	3	0	
	Melena	3	0	0
	Sangrado ocular	3	0	0
	Hematuria	3	0	0
	Hematemesis	3	0	0
Sangrado Alarmante	Transfusión requerida	6	0	0
	Intracraneal	6	0	0
	Potencialmente fatal	6	0	0
BleedScore			1	1

Hallazgos de los Estudios de Eficacia y Seguridad: Las Tablas 30-32 muestran el efecto de GBR 600 sobre los niveles de vWF, los niveles del Factor VIII, el recuento de Glóbulos Blancos, la concentración de Hemoglobina (Hb), el recuento de Plaquetas (Plt), el tiempo de Protrombina (PT) y el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (aPTT) en los Estudios 1 a 3.

En cuanto a los niveles de von Willebrand obtenidos en los Estudios 1 a 3, no se observa patrón alguno en el Estudio 1, pero en los Estudios 2 y 3 se observa una clara reducción en los niveles de von Willebrand. En el Estudio 2, donde se utilizan dosis mucho más elevadas, el efecto es más pronunciado que en el Estudio 3, donde se utilizan dosis relativamente bajas. En el estudio con un anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado de control que no se une a vWF, no se observa efecto alguno sobre los niveles de von Willebrand. Este efecto y las implicancias del mismo deben monitorearse detenidamente en estudios futuros. GBR 600 no tuvo un efecto marcado sobre los niveles del Factor VIII en ninguno de los Estudios.

Aunque se observa un aumento en WBC, éste es un efecto conocido del procedimiento invasivo y se correlaciona adecuadamente con los resultados observados para el anticuerpo IgG4 monoclonal de control que no se une a vWF y para todos los fármacos ensayos hasta aquí en este modelo. No puede

observarse un efecto marcado sobre la concentración de Hemoglobina causado por la infusión de GBR 600. Como un efecto de la infusión de GBR 600 sobre el recuento de plaquetas, se consumen plaquetas durante estos procedimientos dado que la deposición plaquetaria es responsable de la oclusión de la arteria durante las CFR. Por lo tanto, la inhibición efectiva de las CFR reducirá la proporción del consumo de plaquetas. Esto explica el mayor consumo de plaquetas observado con el anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado de control que no se une a vWF, donde no se observa inhibición de CFR.

Aparentemente no existe un efecto marcado de GBR 600 sobre PT y aPTT, que son indicadores de la integridad de las proteínas de coagulación. Se observan resultados similares para el anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado de control que no se une a vWF.

Tabla 30. Estudio 1

	Valor Basal	Solución Salina	0,03 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	1,0 mg/kg	10 mg/kg
WBC x 10 ⁹ /l	7,48	6,92	7,89	9,32	11,57	12,29	11,52
RBC x 10 ¹² /l	5,7	5,88	5,75	5,86	5,82	5,79	5,8
Hemoglobina g/dl	13,4	14,3	14,1	14,1	14,4	14	14
Hematocrito l/l	40,5	43,5	42,5	43,5	43,4	40,4	41,4
MCV fl	71,1	74,0	73,9	74,2	74,4	74,6	71,4
MCH pg	23,5	24,2	24,5	24,1	24,7	24,2	24,1
MCMC g/dl	33,1	32,9	33,2	32,4	33,2	32,4	33,3
Plaquetas x 10 ⁹ /l	306	249	234	236	245	257	262
Neutrófilos x 10 ⁹ /l	3,46	3,32	4,35	5,92	5,16	8,89	8,44
Linfocitos X 10 ⁹ /l	3,62	3,21	3,04	2,80	2,75	2,33	2,22
Monocitos x 10 ⁹ /l	0,36	0,36	0,46	0,53	0,61	0,50	0,73
Eosinófilos x 10 ⁹ /l	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03	0,01	0,02
Basófilos x 10 ⁹ /l	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
PT	9	10	10	10,00	10	10	10
aPTT	42	42	44	43	42	42	45
F VIII	107	89	33	88	80	73	73
Concentración de vWF	25	46	39	15	26	48	17
% de agregación	no	no	no	no	no	no	no

135

Tabla 31. Estudio 2

	Valor Basal	Solución Salina	0,01 mg/kg	0,03 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	1,0 mg/kg	10 mg/kg
WBC x 10 ⁹ /l	11,98	12,42	12,49	11,89	11,14	10,91	11,01	12,92
RBC x 10 ¹² /l	5,24	5,26	5,34	5,34	5,42	5,57	5,57	5,54
Hemoglobina g/dl	12,2	12,7	12,8	12,8	12,9	13,2	13,4	12,2
Hematocrito l/l	34,1	34,9	34,5	34,7	35,1	36,1	36,1	36,1
MCV fl	65,1	65,1	65,2	65,0	64,9	64,8	64,8	65,2
MCH pg	23,3	23,7	24,0	24,0	23,9	23,7	24,1	23,8
MCMC g/dl	35,8	36,4	36,3	36,9	36,9	36,6	37,1	36,6
Plaquetas x 10 ⁹ /l	313	281	276	281	237	263	266	268
Neutrófilos x 10 ⁹ /l	9,37	9,44	9,12	8,60	8,03	7,98	8,15	11,33
Linfocitos X 10 ⁹ /l	2,20	2,55	2,64	2,02	2,68	2,51	2,46	2,10
Monocitos x 10 ⁹ /l	0,38	0,40	0,47	0,42	0,27	0,36	0,32	0,38
Eosinófilos x 10 ⁹ /l	0,01	0,02	0,05	0,04	0,04	0,05	0,08	0,10
Basófilos x 10 ⁹ /l	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
PT	9	9	9	9	9	9	9	9
aPTT	55	7>120	53	60	61	55	55	53
F VIII	49	56	45	54	54	56	53	68
Concentración de vWF	34	31	26	21	16	14	14	10
% de agregación	no	no		no	no	no	no	no

Tabla 32. Estudio 3

	Valor Basal	Solución Salina	0,005 mg/kg	0,01 mg/kg	0,02 mg/kg	0,03 mg/kg	0,04 mg/kg	0,05 mg/kg	0,06 mg/kg	0,07 mg/kg
WBC x 10 ⁹ /l	4,97	5,63	5,10	6,36	7,22	8,3	11,56	13,5	14,06	14,38
RBC x 10 ¹² /l	6,12	6,25	6,2	6,1	6,22	6,19	6,27	6,17	6,16	5,65
Hemoglobina g/dl	14,0	14,6	14,8	14,7	14,5	14,4	14,7	14,7	14,3	13,5
Hematocrito l/l	44,1	45,2	46,4	45,8	45,1	44,7	45,2	46,6	46,5	42,7
MCV fl	71,9	72,3	74,3	75,1	72,5	72,2	72,1	75,5	75,5	75,8
MCH pg	22,8	23,4	23,9	24,1	23,3	23,3	23,4	23,8	24,0	23,9
MCMC g/dl	31,7	32,3	31,9	32,1	32,2	32,2	32,5	31,5	31,3	31,6
Plaquetas x 10 ⁹ /l	273	331	327	342	342	334	360	321	313	296
Neutrófilos x 10 ⁹ /l	3,21	3,63	3,11	4,13	5,26	6,35	9,73	11,90	12,36	12,90
Linfocitos X 10 ⁹ /l	1,59	1,54	1,73	1,97	1,60	1,56	1,45	1,33	1,34	1,14
Monocitos x 10 ⁹ /l	0,15	0,22	0,20	0,25	0,24	0,26	0,36	0,31	0,37	0,42
Eosinófilos x 10 ⁹ /l	0,01	0,01	0,05	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01
Basófilos x 10 ⁹ /l	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01
PT	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10
aPTT	39	41	40	40	39	39	39	38	41	42
F VIII	84	79	80	33	80	85	82	80	85	81
Concentración de vWF	53	50	46	51	46	44	42	55	36	35
% de agregación	no	no		no	no	no	no			no

GBR 600 parece ser un potente inhibidor de la deposición plaquetaria durante la trombosis arterial. La epinefrina no revirtió la inhibición, a diferencia del clopidogrel. No se observa sangrado adverso serio con GBR 600, aun cuando el fármaco se infunde en lo que comúnmente parece una dosis de hasta 250 veces la dosis efectiva. Con tales dosis, el sangrado medido por el modelo de sangrado

incisional dio resultados similares a los de clopidogrel infundido a razón de cuatro a ocho veces la dosis efectiva. GBR 600 no tuvo efecto alguno sobre las proteínas de coagulación, lo que se demuestra mediante los resultados de PT y aPTT. Sin embargo, se observa una reducción en los niveles del Factor von Willebrand. No obstante, no se observa ningún efecto de corte claro sobre los niveles del Factor Factor VIII. Lo dicho no tiene porqué ser un problema dado que la warfarina inhibe el sistema de coagulación reduciendo los niveles circulantes de las proteínas de coagulación funcionales dependientes de la vitamina K. No se observaron en este estudio efectos inesperados sobre los parámetros del Recuento Sanguíneo Completo (WBC, Hb y Plt).

Ejemplo 11: Termoestabilidad de las variantes humanizadas de NMC-4

Se comparó la estabilidad térmica de las variantes humanizadas de NMC-4, del fragmento FAB del NMC-4 murino y de un NMC4-IgG1 quimérico utilizando mediciones calorimétricas. Los perfiles de fusión de los anticuerpos monoclonales son característicos de sus isotipos (Garber y Demarest (2007), BBRC 355:751-7); sin embargo, la temperatura de fusión media del fragmento FAB puede identificarse con facilidad incluso en el contexto de una IgG de longitud completa. Tal punto de fusión medio de la porción FAB se utilizó para monitorear la estabilidad monoclonal de los candidatos humanizados.

Las mediciones calorimétricas se llevaron a cabo en un microcalorímetro diferencial de barrido VP-DSC (MicroCal, Northampton, UK). El volumen celular fue de 0,128 ml; la velocidad de calentamiento fue de 1°C/minuto; y el exceso de presión se mantuvo en 441 Kpa. Todos los fragmentos de proteína se utilizaron a una concentración de 1-0,5 mg/ml (74 µM) en PBS (pH 7,4). La capacidad calorífica molar de cada proteína se estimó por comparación con muestras por duplicado que contenían un buffer idéntico del cual se había omitido la proteína. Se analizaron las capacidades caloríficas molares y las curvas de fusión parciales utilizando procedimientos estándares. Los termogramas se corrigieron de acuerdo con los valores basales y la concentración se normalizó antes de un análisis adicional utilizando un modelo No de Dos Estados en el software Origin v7.0. Se muestra en la Figura 11 un ejemplo de los datos obtenidos para H14L10-IgG4 descrita en el Ejemplo 3. El fragmento FAB del NMC-4 murino muestra una transición única a 74,7°C, mientras que la transición del fragmento FAB H14L10-

IgG4 se produce a 81,1°C, lo que corresponde a una diferencia significativa en la estabilidad (6,4°C). Con el fin de investigar la influencia de los dominios constantes humanos FAB, se preparó una quimera que consistía en dominios variables del NMC-4 murino injertados sobre la IgG1 humana (el isotipo humano de mayor estabilidad; Garber y Demarest (2007), BBRC 355:751-7). Los valores aparentes de T_m de FAB para H14L10-IgG4 y $^{\circ}$ NMC4-IgG1 quimérico (79,1°C) aún muestran un aumento significativo en la estabilidad para H14-L10 FAB ($\Delta T_m > 1^{\circ}\text{C}$).

Ejemplo 12: Clonación de los genes que codifican la cadena pesada (VH9) y liviana (VL9) de GBR600

Se utilizaron los siguientes materiales y métodos para la clonación de los genes que codifican GBR600:

PfuUltra (Stratagene, Cat.-No.: 600380)

SpeI (NEB, Cat.-No.: R0133)

HindIII (NEB, Cat.-No.: R0104)

CIP (NEB, Cat.-No.: M0290)

pCR-blunt (Invitrogen, Cat.-No.: 44-0302)

Cebadores: Operon, Cologne, Germany

GLNPR107: TAACTAGTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTC

GLNPR108: AAGCTTACGGCTAGCTCACGACACCTGAAATGGAAG

GLNPR139: CCTCAGACAGTGGTTCAAAG

GLNPR 176 GCTAGCGCCACCATGGAGACAGACACAC

GLNPR 177 TAAGCTTCTATCATTTACCCAGAGACAGGG

GLNPR 178 TAAGCTTCTATCAACACTCTCCCCTGTTG

BGHREV: provisto por fasteris

Vectores de TMC pCI-NMC4-VL9 (p156) y pCI-NMC4-VH9 (p158) provistos por Chromos.

Kit de extracción Qiaquick Gel (Qiagen, Cat.-No.: 28706)

1kb+ ladder (Fermentas, Cat.-No.: R0491)

ADNpc3.1(-) (Invitrogen, Cat.-No.: V795-20)

pEF-Dest51[CD19] (RZPD, Cat.-No.: RZPD0839G0167-pEF-DEST51)

Secuenciación: Fasteris SA (Ginebra, Suiza)

kit Gigaprep (Macherey-Nagel, Cat.-No.: Nucleobond PC10000)

138

Clonación del vector de expresión pEFcDNA3.1

El vector de expresión pEFADNc se creó por el reemplazo del promotor CMV de ADNpc3.1(-) (Invitrogen) con el promotor EF1-alfa de pEF-DEST51. Con este fin, se amplificó el promotor EF1-alfa utilizando los cebadores GLNPR107 y 108 utilizando PfuUltra (Stratagene, temperatura de hibridación 55°C, 30 ciclos). Los cebadores amplifican el promotor EF1alfa completo y unen un lado de SpeI al extremo 5' y un lado de HindIII al extremo 3' del fragmento amplificado. El amplicón de PCR se clonó en pCR-blunt (Invitrogen) y los clones se analizaron mediante una digestión con SpeI/HindIII. El fragmento SpeI/HindIII del clon #4 se cortó y clonó en el esqueleto de ADNpc3.1(-) que se digirió utilizando la misma combinación de enzimas y CIPed. Los clones se analizaron utilizando SpeI y HindIII y el clon #2 aparentó ser positivo. Una segunda digestión con el esqueleto y el inserto confirmó aún más el tamaño correcto del fragmento promotor.

Clonación de GBR600 en ADNcpEF

Se amplificó VH9 GBR600 utilizando PfuUltra (condiciones estándares, temperatura de hibridación 55°C, 30 ciclos) y los cebadores GLNPR176 y 177. El molde fue el vector de TMC p156. Se amplificó VL9 de GBR600 utilizando los cebadores GLNPR176 y 178 descriptos para la cadena pesada. El molde utilizado fue el vector de TMC p158. Los cebadores agregan un sitio de restricción NheI den 5' y un sitio de restricción HindIII en 3' al amplicón respectivo. Los fragmentos de PCR obtenidos se clonaron en pCR-blunt y se analizaron mediante digestión por restricción utilizando NheI y HindIII. Se cortaron el clon #1 para la cadena liviana y el clon #3 para la cadena pesada y se clonaron en ADNcpEF que fue abierto utilizando las enzimas NheI y HindIII y CIPed. La digestión por restricción mostró que el clon #1 para la cadena liviana y el clon #6 para la cadena liviana contenían fragmentos del tamaño correcto. Ambos clones se enviaron a Fasteris para control de secuenciación como muestras GS256 y GS257. Los archivos de secuenciación se alinearon con secuencias de referencia. Debido a la baja calidad del ADN miniprep, la secuencia GS257 de cadena pesada no pudo confirmarse al 100%. Los plásmidos que codifican la cadena pesada VH9 de GBR600 (GS257) y la cadena liviana VL9 de GBR600 (GS256) se utilizaron para la preparación de Gigapreps. Las preparaciones de plásmidos se enviaron nuevamente para confirmación de secuencia a fasteris. Esta vez, los nombres de las muestras fueron

GS265 para la cadena pesada VH9 de GBR600 y GS264 para la cadena liviana VL9 de GBR600. Debido a la mejor calidad del ADN, pudo confirmarse la identidad de secuencia con la secuencia de referencia para la cadena pesada y liviana.

Aunque la presente revelación se ha descripto e ilustrado en la presente con referencias a diversos materiales, procedimientos y ejemplos específicos, debe comprenderse que la revelación no se restringe a las combinaciones particulares de materiales y procedimientos seleccionados para ese propósito. Pueden deducirse numerosas variaciones de tales detalles, como apreciarán aquellos con experiencia en la técnica. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren únicamente representativos, indicándose el alcance y espíritu real de la revelación a través de las siguientes reivindicaciones. Todas las referencias, patentes y solicitudes de patente de esta solicitud se incorporan en la presente en su totalidad como referencia.

12

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para el factor von Willebrand (vWF), anticuerpo humanizado que comprende: (a) una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19; y (b) una secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28.

2. Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, anticuerpo humanizado que comprende:

(a) una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237;

y

(b) una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

3. Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, anticuerpo humanizado que comprende:

(a) regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y liviana (CDR) correspondientes a las CDR presentes en las regiones variables de cadena pesada y liviana del anticuerpo murino NMC-4 (SEC ID NO: 1 y 2, respectivamente); y

(b) regiones de entramado de cadena pesada correspondientes a las regiones de entramado presentes en la región variable del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y/o regiones de entramado de cadena liviana correspondientes a las regiones de entramado presentes en la región variable del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO: 6).

4. Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, anticuerpo humanizado que comprende una o más CDR de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID

141

NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9); y/o una o más CDR de cadena liviana seleccionadas del grupo que consiste en: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

5. Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, anticuerpo humanizado que comprende las CDR de cadena pesada: HCDR1: GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), HCDR2: MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8) y HCDR3: DPADYGNIDYALDY (SEC ID NO: 9); y/o las CDR de cadena liviana: LCDR1: SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10), LCDR2: YTSSLHS (SEC ID NO: 11) y LCDR3: QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12).

6. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, que además comprende una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo humano AAC18165.1 (SEC ID NO: 4) y/o una región de entramado de cadena liviana del anticuerpo humano AAK94808 (SEC ID NO:6).

7. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 6, donde la región de entramado de cadena pesada comprende además uno o más residuos murinos.

8. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 6, donde la región de entramado de cadena pesada no comprende uno o más residuos murinos.

9. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 6, donde la región de entramado de cadena liviana comprende además uno o más residuos murinos.

10. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 6, donde la región de entramado de cadena liviana no comprende uno o más residuos murinos.

11. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde el anticuerpo humanizado comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146).

12. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde el anticuerpo humanizado comprende una región variable de cadena liviana seleccionada del grupo que consiste en: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

13. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde el anticuerpo humanizado comprende una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: H2 (SEC ID NO: 13), H4 (SEC ID NO: 14), H5 (SEC ID NO: 15), H6 (SEC ID NO: 16), H7 (SEC ID NO: 17), H8 (SEC ID NO: 18), H9 (SEC ID NO: 19), H12 (SEC ID NO: 20), H13 (SEC ID NO: 21), H14 (SEC ID NO: 22), H15 (SEC ID NO: 145) o H16 (SEC ID NO: 146); y una región variable de cadena liviana seleccionada del grupo que consiste en: L5 (SEC ID NO: 23), L4 (SEC ID NO: 24), L6 (SEC ID NO: 25), L7 (SEC ID NO: 26), L8 (SEC ID NO: 27), L9 (SEC ID NO: 28), L10 (SEC ID NO: 29) o L11 (SEC ID NO: 30).

14. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 5, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una región de entramado que es al menos idéntica en un 80% a la región de entramado de la SEC ID NO: 19 y/o una secuencia de región variable de cadena liviana que comprende una región de entramado que es al menos idéntica en un 80% a la región de entramado de la SEC ID NO: 28.

15. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 5 que además comprende regiones de entramado de cadena pesada correspondientes a regiones de entramado de la familia de anticuerpos humanos VH4; y regiones de entramado de cadena liviana correspondientes a regiones de entramado de la familia de anticuerpos humanos VK1.

16. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 5 que además comprende las regiones de entramado de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado presentes en la secuencia 4-59 de línea germinal de anticuerpo humano de cadena pesada, donde la región de entramado de cadena pesada 1 es QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS (SEC ID NO: 171); la región de entramado de cadena pesada 2 es WIRQPPGKGGLEWIG (SEC ID NO: 172); y la región de entramado de cadena pesada 3 es RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 173); y las regiones de entramado de cadena liviana 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado presentes en la secuencia 018 de línea germinal de anticuerpo humano de cadena liviana, donde la región de entramado de cadena liviana 1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 186); la región de entramado de

cadena liviana 2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 187); y la región de entramado de cadena liviana 3 es GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC (SEC ID NO: 188).

17. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 5 que además comprende las regiones de entramado de cadena pesada 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado presentes en la secuencia 4-34 de línea germinal de anticuerpo humano de cadena pesada, donde la región de entramado de cadena pesada 1 es QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY (SEC ID NO: 165); la región de entramado de cadena pesada 2 es WIRQPPGKGLEWIG (SEC ID NO: 166) y la región de entramado de cadena pesada 3 es RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEC ID NO: 167); y las regiones de entramado de cadena liviana 1, 2 y 3 correspondientes a regiones de entramado presentes en la secuencia de línea germinal de anticuerpo humano de cadena liviana 018, donde la región de entramado de cadena liviana 1 es DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 186); la región de entramado de cadena liviana 2 es WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 187); y la región de entramado de cadena liviana 3 es GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC (SEC ID NO: 188).

18. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde el anticuerpo humanizado se une a vWF con una afinidad (K_d) de 10nM o menor.

19. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde el anticuerpo humanizado compete para unirse a vWF con una afinidad (K_i) de 100nM o menor.

145

20. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde el anticuerpo humanizado se une al dominio A1 de vWF con una afinidad (K_d) de 10nM o menor.

21. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde el anticuerpo humanizado compete para unirse al dominio A1 de vWF con una afinidad (K_i) de 100nM o menor.

22. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde el anticuerpo humanizado tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que 65°C.

23. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde el anticuerpo humanizado tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB mayor que el anticuerpo progenitor no humanizado.

24. Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF, anticuerpo humanizado que comprende una CDR1 de cadena pesada que es GFSLTDYGVD (SEC ID NO: 7), una CDR2 de cadena pesada que es MIWGDGSTDYNSALKS (SEC ID NO: 8), una CDR3 de cadena pesada que es DPADYGNFYDLY (SEC ID NO: 9) y una CDR1 de cadena liviana, una CDR2 de cadena liviana y una CDR3 de cadena liviana que es QQYEKLPWT (SEC ID NO: 12), con la condición de que la CDR1 de cadena pesada no sea SASQDINKYLN (SEC ID NO: 10) y/o la CDR2 de cadena liviana no sea YTSSLHS (SEC ID NO: 11).

25. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 24, que además comprende regiones de entramado de anticuerpo humano de cadena pesada y/o regiones de entramado de anticuerpo humano de cadena liviana.

146

26. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 25, donde las regiones de entramado de cadena pesada corresponden a regiones de entramado de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59.

27. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 26, donde las regiones de entramado de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59 además comprenden uno o más residuos murinos.

28. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 26, donde las regiones de entramado de cadena pesada presentes en un anticuerpo humano derivado de 4-59 no comprenden uno o más residuos murinos.

29. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 25, donde las regiones de entramado de cadena liviana corresponden a las regiones de entramado de cadena liviana presentes en un anticuerpo humano derivado de 018.

30. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 29, donde las regiones de entramado de cadena liviana presentes en un anticuerpo humano derivado de 018 además comprenden uno o más residuos murinos.

31. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 29, donde las regiones de entramado de cadena liviana presentes en un anticuerpo humano derivado de 018 no comprenden uno o más residuos murinos.

32. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 26, donde el anticuerpo humano derivado de 4-59 es AAC18165.1.

33. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 29, donde el anticuerpo humano derivado de 018 es AAK94808.

34. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 24, donde LCDR1 y/o LCDR2 son de un anticuerpo humano.

35. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 34, donde LCDR2 es DASNLET (SEC ID NO: 118).

36. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y 24, donde HCDR1 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en F27G, L29I, T30S y V34W.

37. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y 24, donde HCDR2 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S61P y A62S.

38. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y 24, donde LCDR1 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S24Q, N30S y K31N.

39. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y 24, donde HCDR1 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en F27G, L29I, T30S y V34W, HCDR2 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S61P y A62S, y LCDR1 comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S24Q, N30S y K31N.

148

40. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, que además comprende una región de entramado de cadena pesada de un anticuerpo humano, donde la región de entramado de cadena pesada humana no comprende uno o más residuos murinos.

41. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, que además comprende una región de entramado de cadena liviana de un anticuerpo humano, donde la región de entramado de cadena liviana humana no comprende uno o más residuos murinos.

42. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde la región de entramado de cadena pesada no comprende uno o más residuos murinos.

43. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde la región de entramado de cadena liviana no comprende uno o más residuos murinos.

44. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, donde el anticuerpo humanizado retiene la misma actividad que el anticuerpo precursor no humanizado o que un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables del anticuerpo precursor no humanizado y una región Fc humana.

45. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 44, donde la actividad se mide como actividad de aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina.

46. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, donde el anticuerpo humanizado carece de función efectora.

47. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, donde el anticuerpo humanizado comprende una región Fc derivada de IgG4.

48. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, donde el anticuerpo humanizado es específico para el dominio A1 del vWF humano.

49. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, donde el anticuerpo humanizado es un anticuerpo de longitud completa.

50. El fragmento de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, donde el fragmento de unión es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ y un diacuerpo.

51. El fragmento de unión de la reivindicación 50, donde el fragmento de anticuerpo no es un Fab.

52. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43.

53. Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena liviana del vector GS264 depositada en un microorganismo con DSMZ que tiene el N° de acceso DSM 21059.

54. Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada del vector GS265 depositada en un microorganismo con DSMZ que tiene el N° de acceso DSM 21060.

55. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 19 y una

secuencia de región variable de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 28.

56. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo específico para vWF que comprende una secuencia de cadena pesada como la expuesta en la SEC ID NO: 237 y una secuencia de cadena liviana como la expuesta en la SEC ID NO: 238.

57. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 52 a 56.

58. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 52 a 56 o el vector de la reivindicación 57.

59. Un método para producir un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 58 de modo que el ácido nucleico se exprese y se produzca el anticuerpo.

60. El método de la reivindicación 59, que además comprende recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped.

61. El método de la reivindicación 59, donde el anticuerpo se recupera del medio de células huésped.

62. El método de la reivindicación 59, donde antes del cultivo, la célula huésped se co-transfecta con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada y con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena liviana.

63. Una composición que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

64. Una composición que comprende un primer anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 y un segundo anticuerpo que se une al dominio A1 de vWF.

65. La composición de la reivindicación 64, donde el segundo anticuerpo es AJW-200.

66. Un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF en un sujeto, método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43.

67. El método de la reivindicación 66, donde el sujeto es un humano.

68. El método de la reivindicación 66, donde el trastorno mediado por vWF es una enfermedad o trastorno trombótico.

69. El método de la reivindicación 68, donde la enfermedad o trastorno trombótico es una enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular tal como apoplejía isquémica.

70. El método de la reivindicación 69, donde la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con la diabetes.

71. El método de la reivindicación 68, donde la enfermedad o trastorno trombótico es inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad falciforme, rechazo de xenoinjerto, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes.

72. El método de la reivindicación 69, donde la enfermedad cerebrovascular es demencia vascular, apoplejía isquémica, o prevención de apoplejías recurrentes.

5

73. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66 a 72, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg.

74. El método de la reivindicación 73, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 20 mg/kg.

75. El método de la reivindicación 73, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 10 mg/kg.

76. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66 a 75, donde se administra al sujeto una dosis única o múltiples sub-dosis de la cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo.

77. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66 a 75, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es suficiente para inhibir la agregación plaquetaria pero insuficiente para causar signos clínicos significativos de sangrado.

78. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66 a 72, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces una ED₁₀₀ sin causar signos clínicos significativos de sangrado.

79. Uso de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 como medicamento que comprende administrar el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo en una cantidad efectiva para uso terapéutico.

80. Uso de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF que comprende administrar el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo en una cantidad efectiva para uso terapéutico.

151

81. El uso de la reivindicación 79, donde el medicamento se utiliza para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF.

82. El uso de la reivindicaciones 80 u 81, donde el trastorno mediado por vWF es una enfermedad o trastorno trombótico.

83. El uso de la reivindicación 82, donde el trastorno trombótico es una enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular tal como apoplejía isquémica.

84. El uso de la reivindicación 83, donde la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con la diabetes.

85. El uso de la reivindicación 82, donde la enfermedad trombótica comprende inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad falciforme, rechazo a xenoinjerto, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes.

86. El uso de la reivindicación 83, donde la enfermedad cerebrovascular es demencia vascular, apoplejía isquémica o prevención de apoplejías recurrentes.

87. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 79 a 86, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg.

88. El uso de la reivindicación 87, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 20 mg/kg.

89. El uso de la reivindicación 87, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 10 mg/kg.

90. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 79 a 89, donde se administra al sujeto una dosis única o múltiples sub-dosis de la cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo.

91. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 79 a 89, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es suficiente para inhibir la agregación plaquetaria pero insuficiente para causar signos clínicos significativos de sangrado.

92. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 79 a 86, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo se administra en una cantidad efectiva para uso terapéutico de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces una ED_{100} sin causar signos clínicos significativos de sangrado.

93. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 para su uso como medicamento que comprende administrar el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo en una cantidad efectiva para uso terapéutico.

94. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF que comprende administrar el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo en una cantidad efectiva para uso terapéutico.

95. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 93, donde el medicamento se utiliza para tratar una enfermedad o trastorno mediado por vWF.

96. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 94 o 95, donde el trastorno mediado por vWF es una enfermedad o trastorno trombótico.

5

97. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 96, donde el trastorno trombótico es una enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular tal como apoplejía isquémica.

98. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 97, donde la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis, restenosis, angina, infarto agudo de miocardio, síndrome coronario agudo o trastornos cardiovasculares asociados con la diabetes.

99. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 96, donde la enfermedad trombótica comprende inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad falciforme, rechazo de xenoinjerto, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, fibrosis quística, demencia vascular, enfermedad de Raynaud, artritis reumatoide o diabetes.

100. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 97, donde la enfermedad cerebrovascular es demencia vascular, apoplejía isquémica o prevención de apoplejías recurrentes.

101. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 93 a 100, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg.

102. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 101, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 20 mg/kg.

103. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 101, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 10 mg/kg.

104. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 93 a 103, donde se administra al sujeto una dosis única o sub-dosis múltiples de la cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo.

105. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 93 a 103, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico es suficiente para inhibir la agregación plaquetaria pero insuficiente para causar signos clínicos significativos de sangrado.

106. El anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 93 a 100, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo se administra en una cantidad efectiva para uso terapéutico de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces una ED₁₀₀ sin causar signos clínicos de sangrado.

107. Un anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo específico para el factor von Willebrand (vWF), que puede administrarse en una cantidad efectiva para uso terapéutico que oscila de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces la ED₁₀₀ sin causar signos clínicos de sangrado.

108. El anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 107, donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es específico para el dominio A1 del vWF humano.

109. Un método para administrar el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 a un sujeto necesitado de dicho tratamiento que comprende administrar una cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo suficiente para inhibir la agregación plaquetaria sin signos clínicos significativos de sangrado.

5

110. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66 o 109, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo se administra por vía subcutánea.

111. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66 o 109, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo se administra por vía intravenosa.

112. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66 o 109, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo se administra por vía intravenosa en combinación con tratamientos radiológicos.

113. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66 o 109, donde la cantidad efectiva para uso terapéutico del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo es de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces la ED₁₀₀.

114. El uso de la reivindicación 79, donde el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo se administra en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 veces la ED₁₀₀.

115. Un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF.

116. Un kit que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por vWF.

117. Uso del anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 en aplicaciones no terapéuticas.

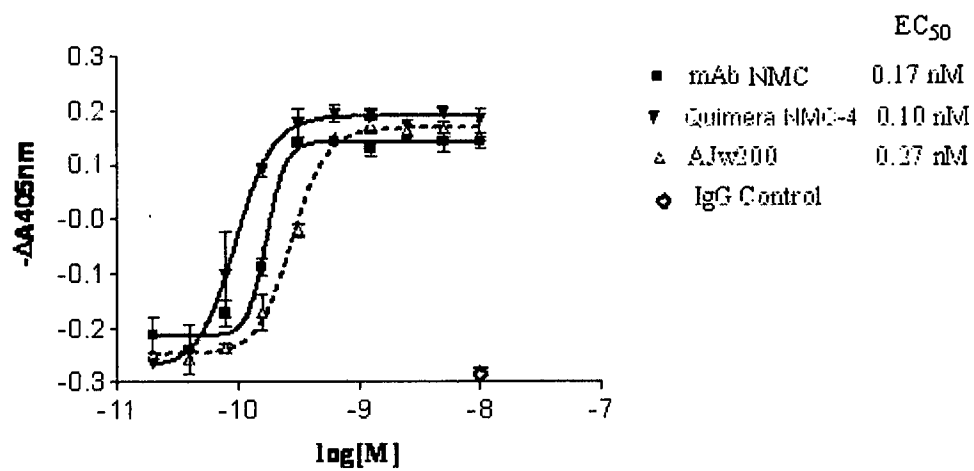
118. El uso de la reivindicación 117, donde la aplicación no terapéutica es un ensayo de diagnóstico.

58

RESUMEN

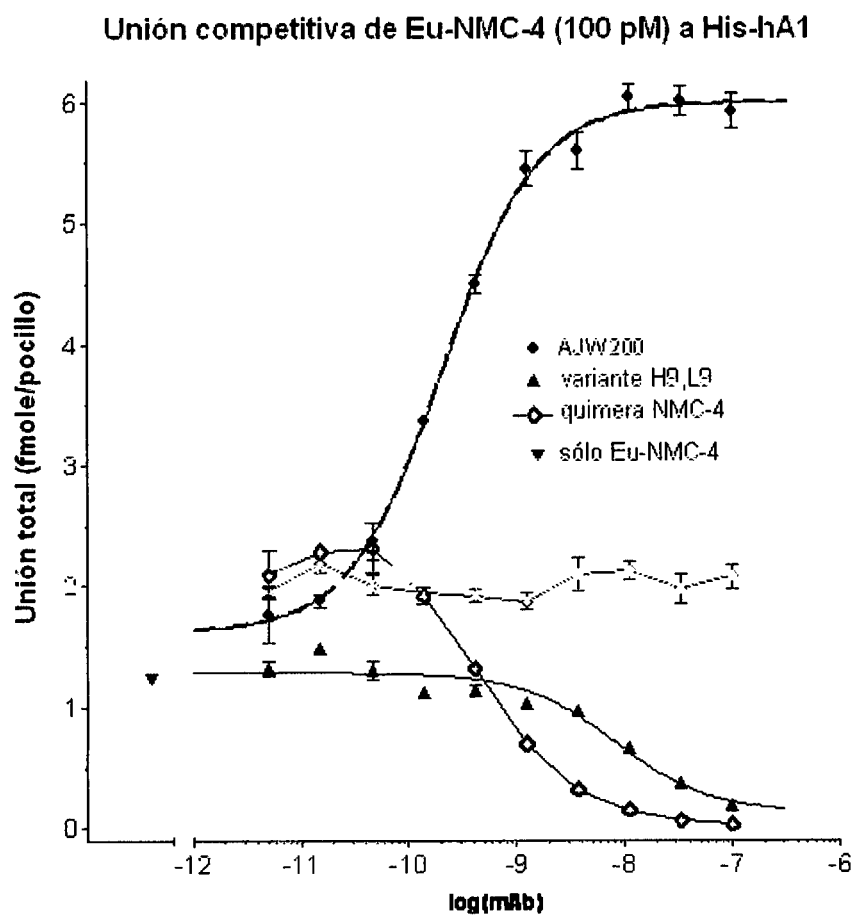
La presente revelación hace referencia a anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos específicos para el factor von Willebrand humano (vWF), a métodos para su preparación y uso, que incluyen métodos para tratar enfermedades o trastornos mediados por vWF.

Figura 1



151

Figura 2
A.



B.

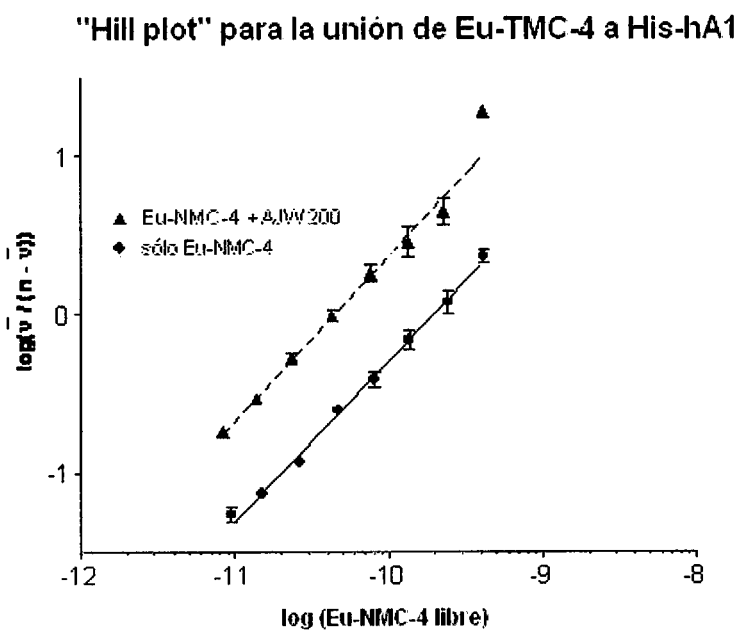
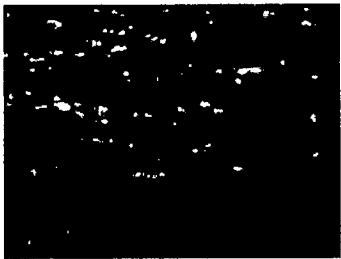


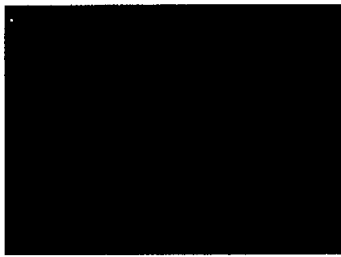
Figura 3



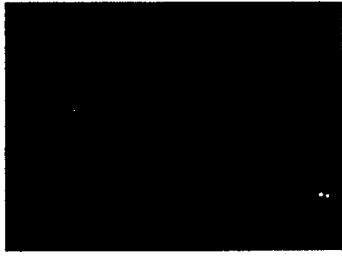
A.



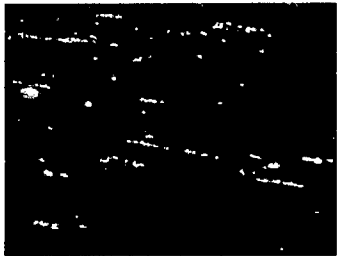
B.



C.

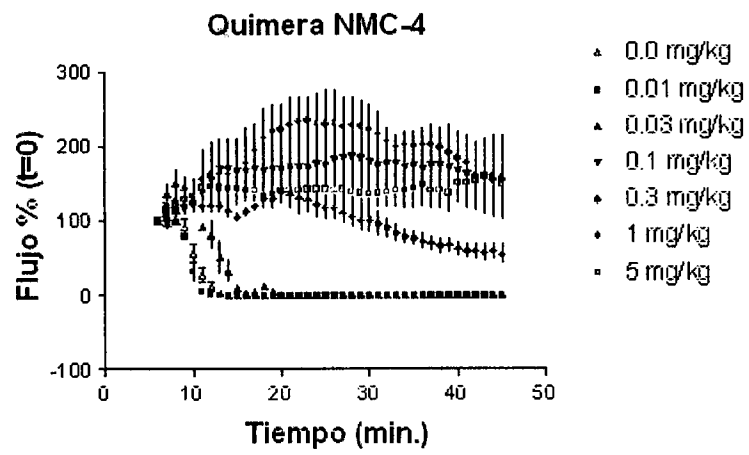


D.

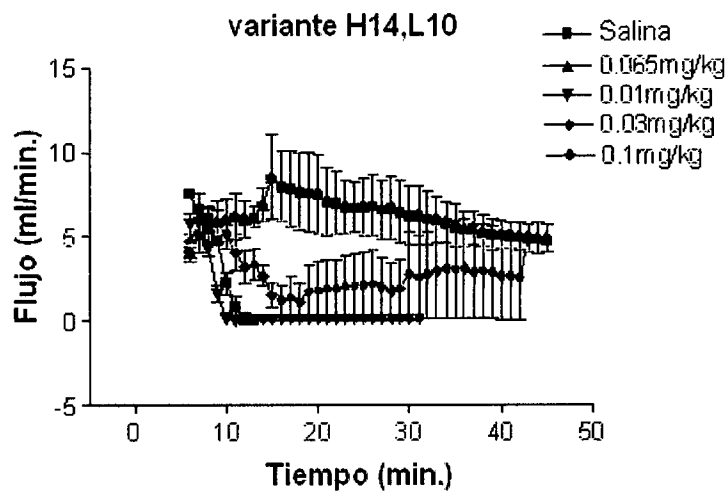


E.

Figura 4
A.



B.



C.

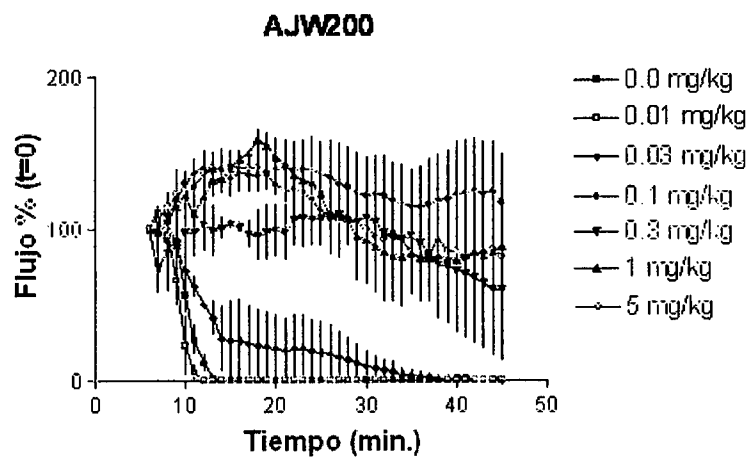
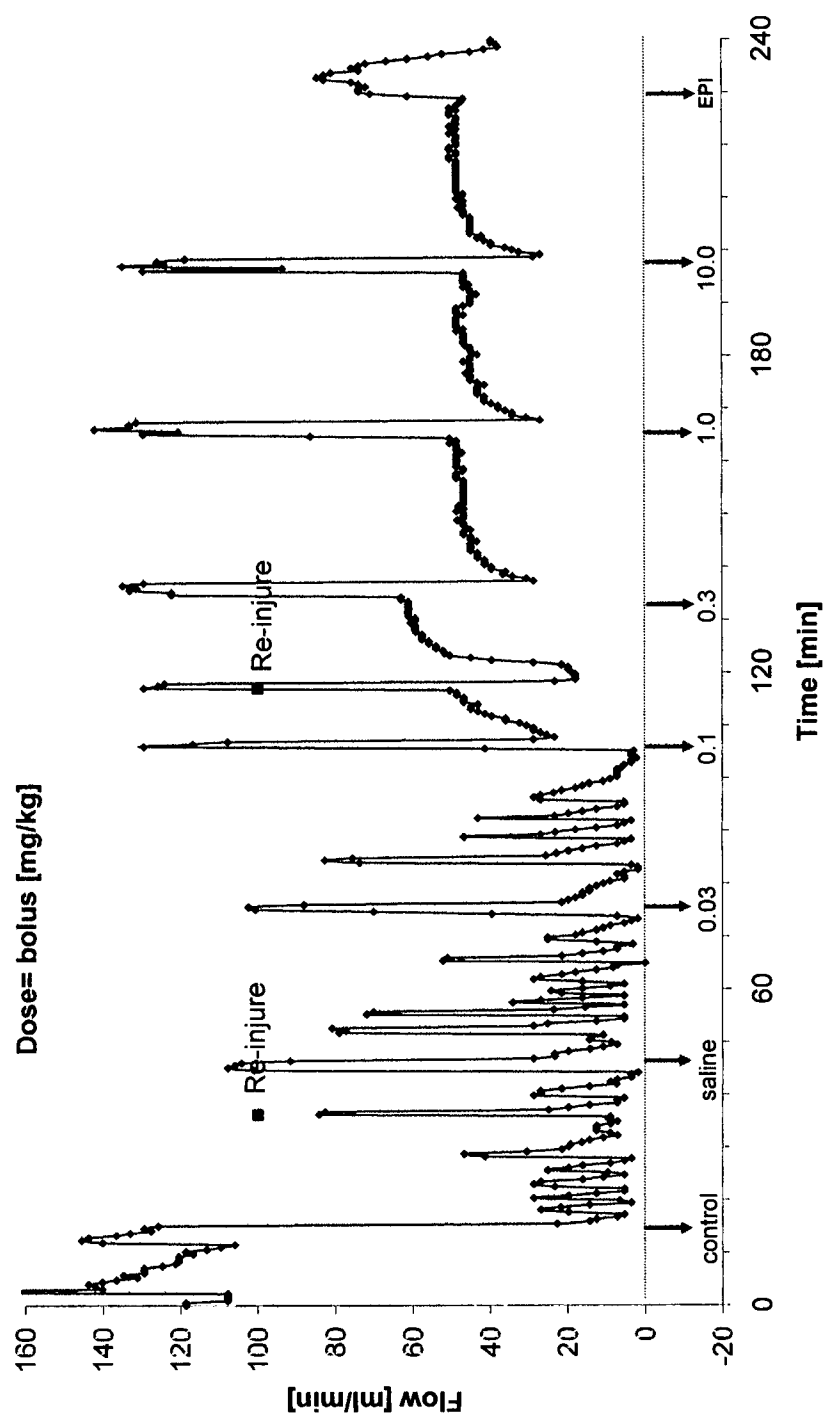
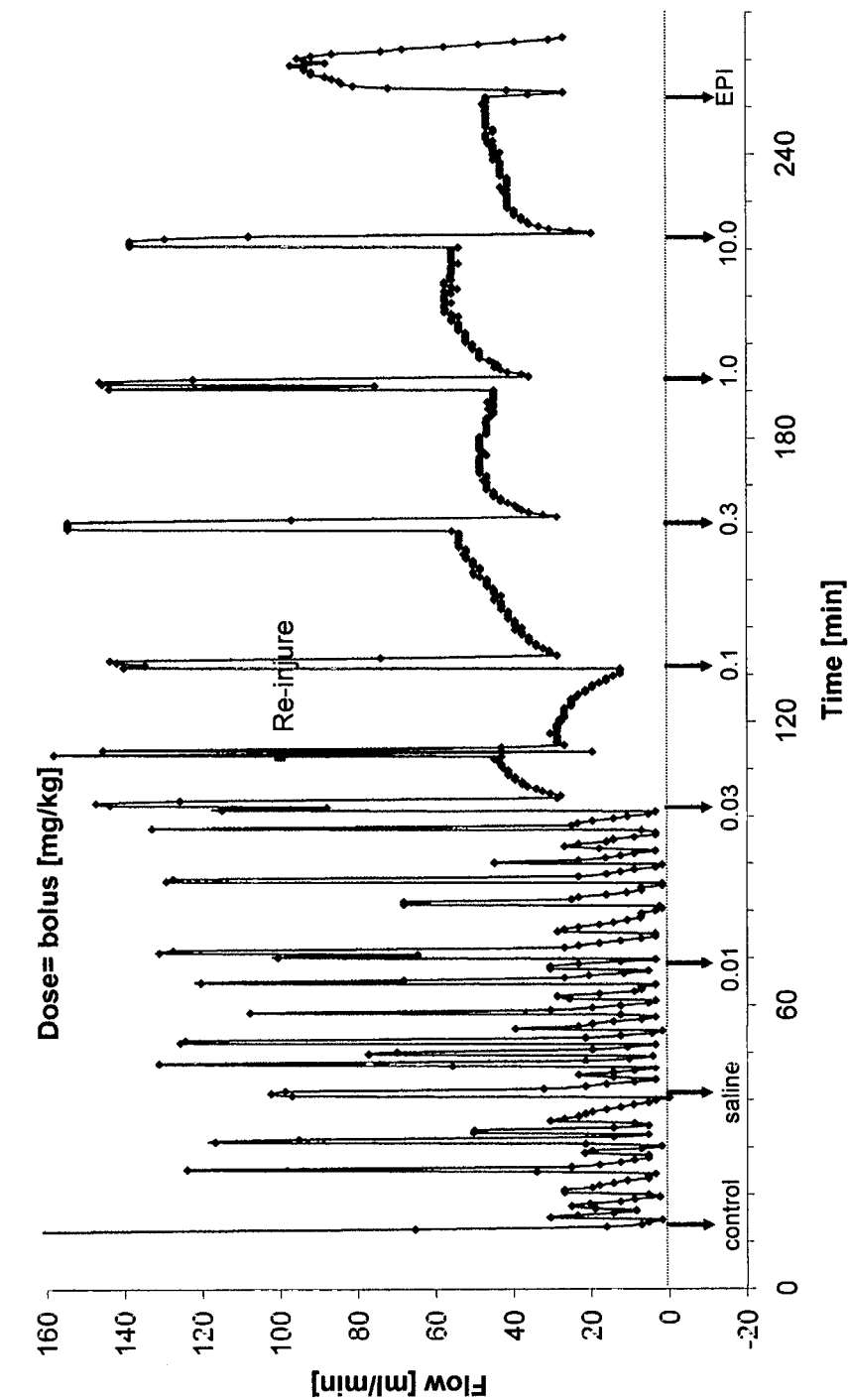


Figura 5



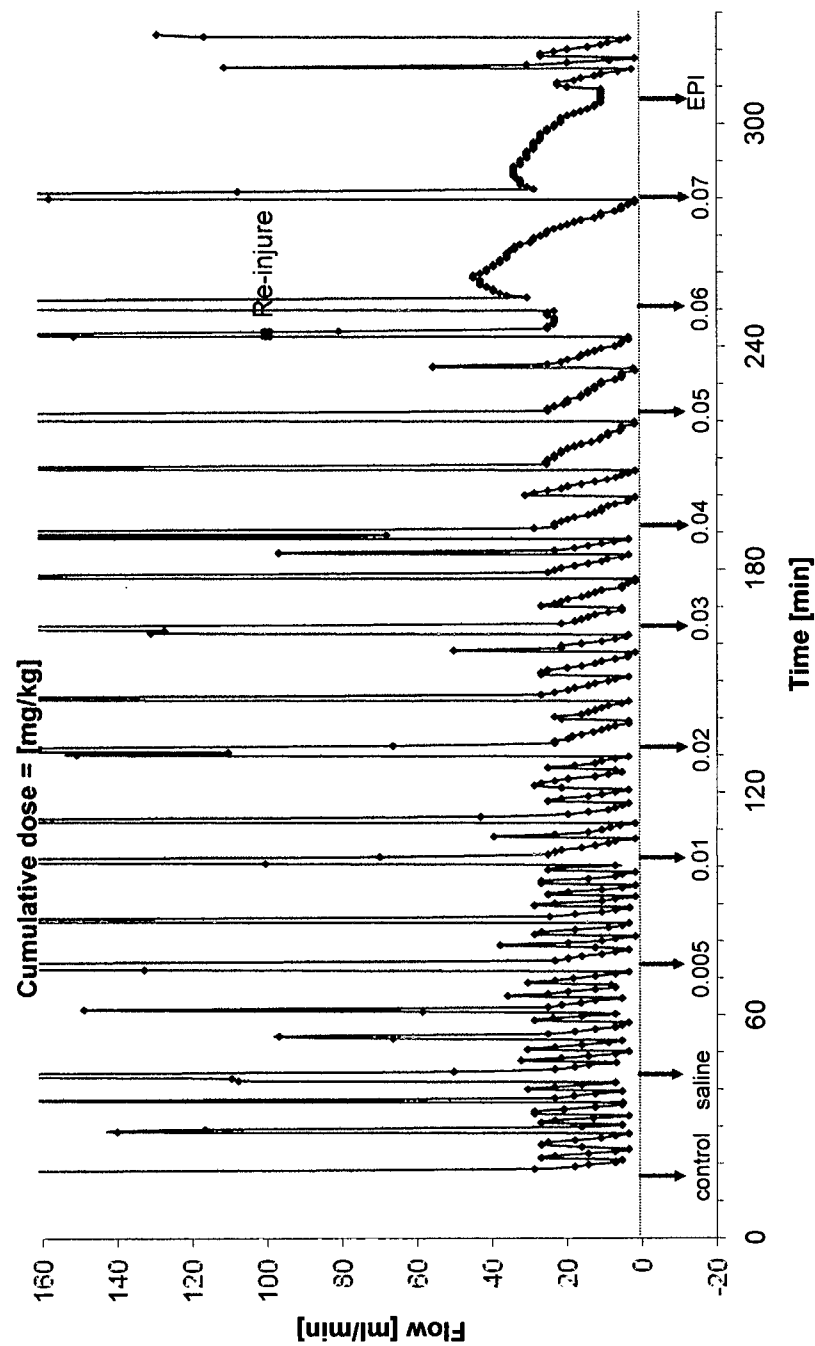
*Dose= bolus [mg/kg] : Dosis = bolo [mg/kg]
Flow [ml/min.] : Flujo [ml/min.]
Time [min.] : Tiempo [min.]
Re-injure : Re-lesión
Saline : Salina
Control : Control

Figura 6



*Dose= bolus [mg/kg] : Dosis = bolo [mg/kg]
Flow [ml/min.] : Flujo [ml/min.]
Time [min.] : Tiempo [min.]
Re-injure : Re-lesión
Saline : Salina
Control : Control

Figura 7



*Cumulative dose= [mg/kg] : Dosis cumulativa= [mg/kg]

Flow [ml/min.] : Flujo [ml/min.]

Time [min.] : Tiempo [min.]

Re-injure : Re-lesión

Saline : Salina

Control : Control

166

Figura 8

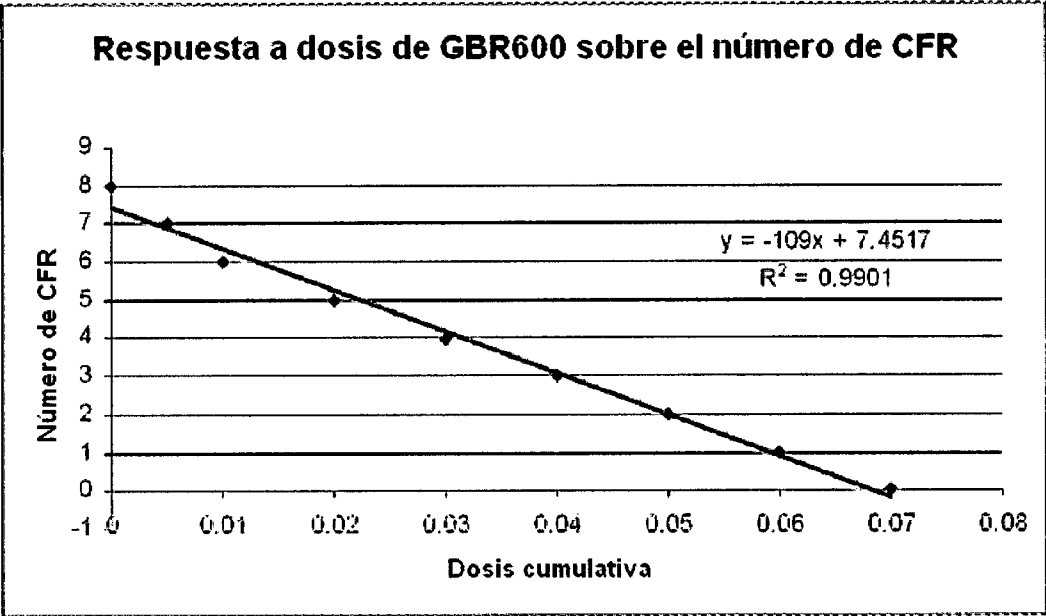
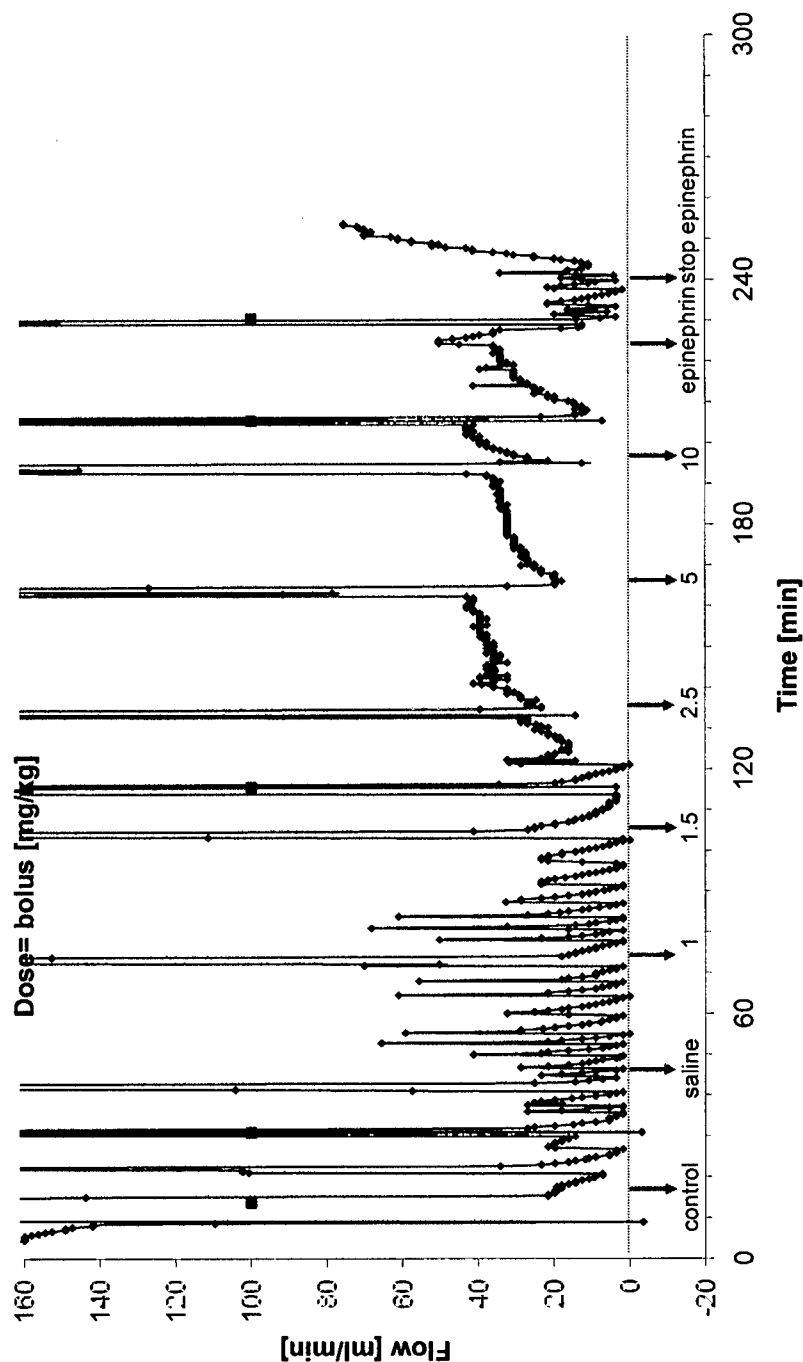


Figura 9



*Dose= bolus [mg/kg] : Dosis = bolo [mg/kg]
Flow [ml/min.] : Flujo [ml/min.]
Time [min.] : Tiempo [min.]
Saline : Salina
Control : Control
Epinephrin : Epinefrina
Stop epinephrin : Suspensi3n de la epinefrina

168

Figura 10

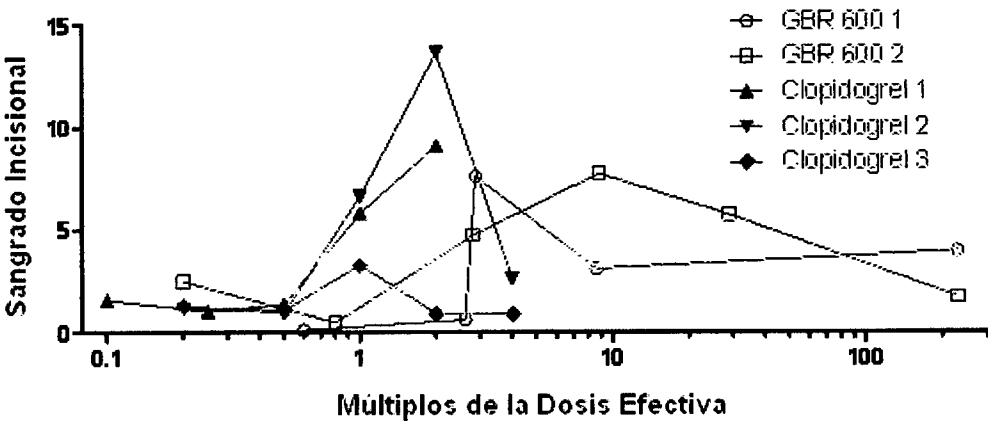
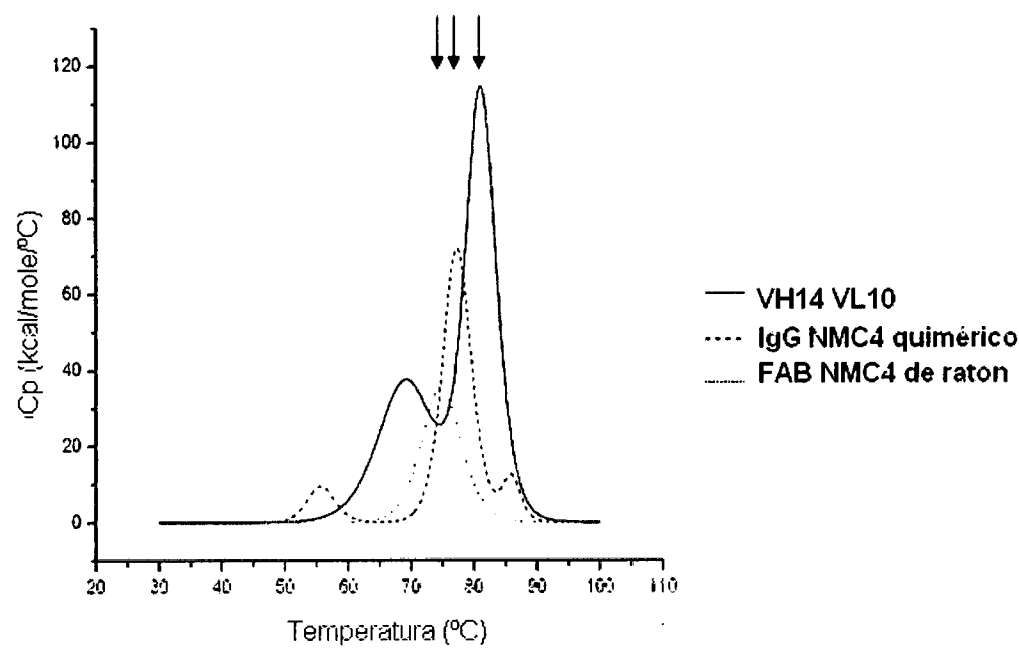
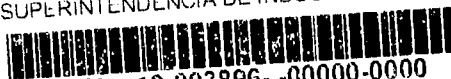


Figura 11

169



	FAB Tm (°C)
VH14 VL10 IgG	81.1
IgG NMC4 quimérico	79.1
FAB NMC4 de ratón	74.7



No. 10-093896- -00000-0000

Fecha: 2010-08-02 16:12:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYI! Evt. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 169

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN
Apoderado(a) y/o Representante de
GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

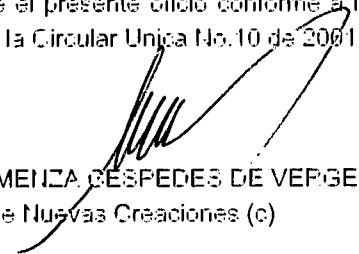
REFERENCIA	Radicación No.	10 093896
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/000124
	Fecha inicio fase nacional	22/08/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 10878

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal E) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT, el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título V de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 59 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIC CARMENZA GESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 AGO. 2010
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

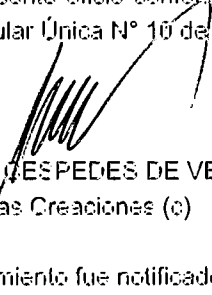
Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN
Apoderado(a) y/o Representante de
GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	10 093896
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/000124
	Fecha inicio fase nacional	23/08/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10879

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA QUESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 AGO. 2010
adpa11