



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-118562

54. TÍTULO

"Nuevas anticuerpos dirigidos contra factores
tisulares como anticoagulantes"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N, A61K 39/00

71. SOLICITANTE

Scheunig Aktiengesellschaft.

DOMICILIO

Berlin Alemania.

74. APODERADO

Guillermo Hollmann Zetsero

22. BOGOTÁ, D. C.,

25 de Noviembre de 2002

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① **SOLICITUD DE :**
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

SOLICITANTE (71)	Nombre: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Dirección: Müllerstrasse 178 D-13342 Berlin, Alemania Nacionalidad o Domicilio: Berlin, Alemania Lugar de Constitución: Alemania Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
----------------------------	---	--

③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO Dirección Cra. 11ª No. 94-76 - Of. 308 Teléfono: 6161948 Fax: 6163976 E-mail:	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☒ Cual _____ Número 2.878.023 TP 5903
------------------------------------	--	--

④ INVENTOR (ES) (72)	Nombre: LIGHT David ✓ Dirección 614 South Fremont Street, Nacionalidad o Domicilio: San Mateo, CA 94402 Estados Unidos
--------------------------------	---

⑤ PCT (88)
Solicitud Internacional No. PCT/US03/13521 Fecha Abril 30 de 2003
Publicación Internacional No. WO 03/093422 A2 Fecha Noviembre 13 de 2003

⑥ Título (54) NUEVOS ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES.

⑦ Clasificación Internacional (51) C12N A61K39/00

⑧ PRIORIDAD: SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>Estados Unidos</u>	(32) Fecha <u>Mayo 1. 2002</u>	(31) Numero de Solicitud <u>60/376,566</u>

Comprobante de pago No. _____ Fecha _____

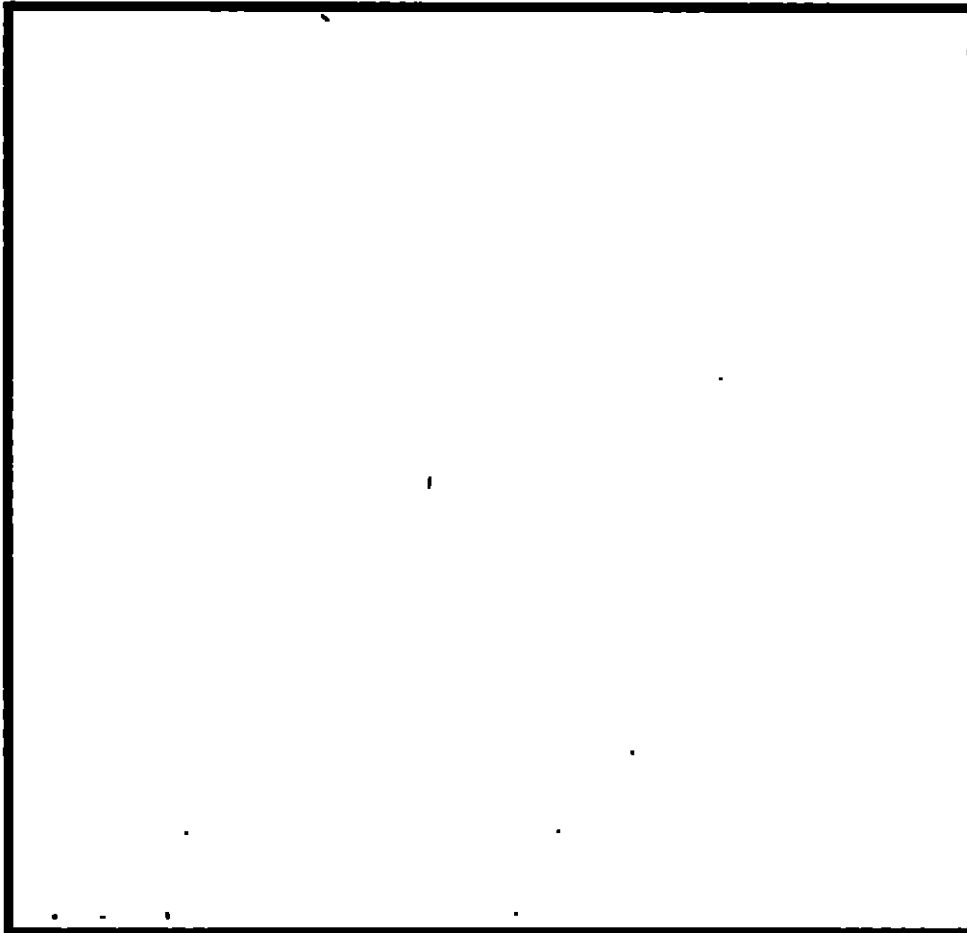
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario , ver reverso de esta página.

5657

ANEXOS

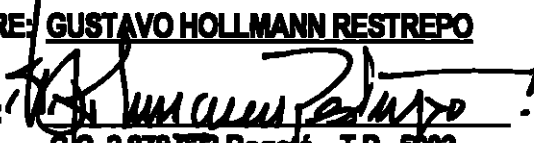
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ 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 del 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 Reporte de Búsqueda Internacional.

(11) FIGURA CARACTERISTICA



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO

FIRMA: 

C.C. 2.878.023 Bogotá T.P. 5903

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

Continuación nombre, dirección y domicilio de inventores:

<u>Nombre</u>	<u>Dirección</u>	<u>Domicilio</u>
MCLEAN Kirk	291 Capricorn Avenue,	Oakland, CA 94611 Estados Unidos

Otros anexos que se acompañan a la solicitud.

Copia formulario PCT/RO/101 correspondiente a la presentación de la solicitud internacional.

Copia formulario PCT/IB/304 correspondiente a la notificación relativa al envío o transmisión del documento de prioridad.

Copia formulario PCT/IB/301 correspondiente a la notificación de recibo de la copia de archivo copia del informe de búsqueda internacional.



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

Berlín, 23 de Agosto de 1999

No. 05/99

El suscrito **ENCARGADO DE LAS FUNCIONES CONSULARES DEL CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN BERLÍN**, República Federal de Alemania

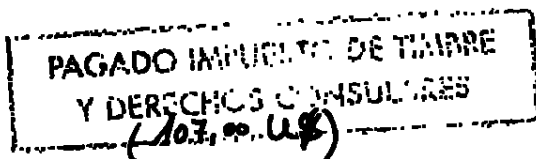
CERTIFICA:

1. Que el señor **GETFERDT**, quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha allí indicada, las funciones del Presidente Encargado del Tribunal Regional de Berlín, y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.
2. Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía **SCHERING AG** domiciliada en Berlín, República Federal de Alemania, existe legalmente, y que actualmente ejerce su objeto social de acuerdo con las leyes del respectivo país.
3. Que los señores **UWE HARTMANN** y **WALTER KLOSE** quienes firmaron el poder que precede, están autorizados para representarla en este acto y otorgar el certificado.

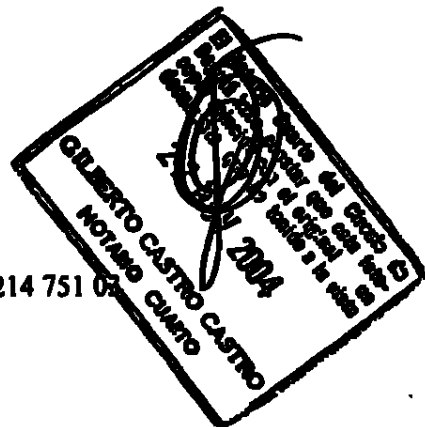
El Encargado de las Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.




GERMAN NEIRA
Encargado de las Funciones
Consulares



Tauentzienstr. 15, 10789 Berlin
TEL 030-214 751 63 - 030-214 751 64 - FAX 030-214 751 03



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

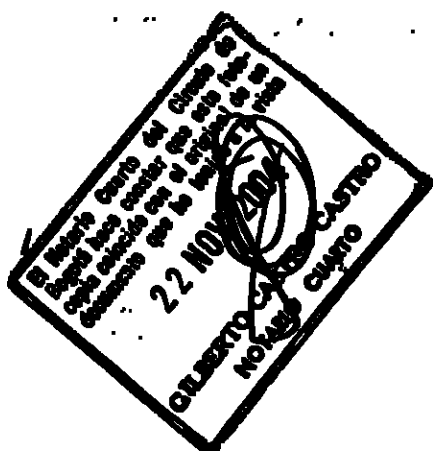
322052 Nueva
Gema

RECEIVED EN EL
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1999 OCT 14 P 12:47

SECRETARÍA DE RELACIONES
EXTERIORES
SANIAF INFORMATICA



PARA PATENTES, MARCAS Y LICENCIAS FARMACEUTICAS
FOR PATENTS, TRADE MARKS AND PHARMACEUTICAL LICENSES

The undersigned

acting on behalf of and representing

Company's
Name
domiciled in

Company's
Domicile

hereby appoint/s

domiciled in Bogotá, Republic of Colombia.

as our true and legal attorneys with the necessary powers; 1) to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining letter patents, industrial designs and models, trademark registrations, registration of commercial names as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name; 2) to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public offices or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and exploitations of licenses; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages; claims or remarks on patent applications, industrial designs and models; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measures or appeals related to industrial property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize him (them) to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures he (they) may deem convenient to protect my (our) interests, with all other necessary 'legal' faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any actions, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extrajudicial attorneys.

Signed in

On this day of 19

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
ppa.

Signature(s)
Firma(s)

To (nosotros)

Dr. Uwe Hartmann y Dr. Walter Klose

obrando a nombre y representación de

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

con domicilio en

Müllerstr. 178

D-13353 Berlin / Germany

nombre(s) a

GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO y/o

LUIS PATIÑO LEYVA

domiciliado(s) en Bogotá, República de Colombia, en
Cra. 11A No. 94-76 - Of. 308

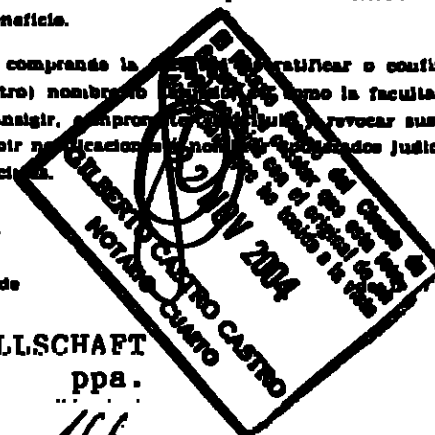
apoderados verdaderos y legales con poder especial amplio y suficiente: 1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas, administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, de dibujos y modelos industriales, registro de marcas, depósito de nombres comerciales y enseñas, así como sus traspaños, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre; 2) elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera de ellos; 3) intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre comercial, oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a solicitudes de patentes, modelos y dibujos industriales; en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial.

A este efecto, le(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, quiniendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las demás facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi(nuestro) nombre o en el de los apoderados, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, transigir, revocar sustituciones, recibir notificaciones y notificaciones judiciales o extrajudiciales.

Firmado en

si de



ppa.

Uwe Hartmann
Walter Klose

COMPANIES

ed

in accordance with the laws of

Signed in

On this day of

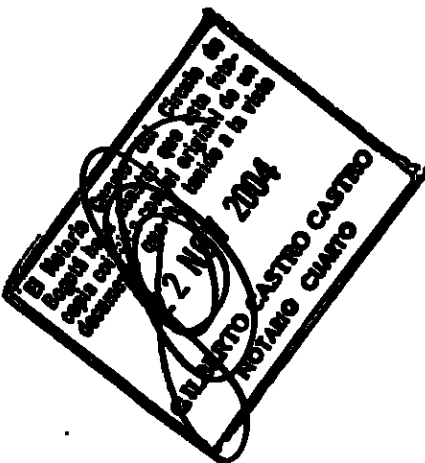
SOCIEDADES

da

conforme a las leyes de

Firmado en

de de 10



Die vorstehenden, heute vor mir gefertigten Unterschriften der mir persönlich bekannten Prokuristen,

1. Dr. Uwe Hartmann,
2. Dr. Walter Klose,

- beide geschäftsansässig in 13353 Berlin,
Müllerstraße 178 -,

beglaubige ich hiermit.

Zugleich bescheinige ich aufgrund des mir vorliegenden beglaubigten Handelsregistrauszuges zum Aktenzeichen 93 HRB 283 des Amtsgerichts Berlin-Charlottenburg vom 17. Juni 1999, daß die vorgenannten Herren als Prokuristen gemeinsam zur Vertretung der Schering Aktiengesellschaft, Berlin, berechtigt sind.

Ich habe den Beteiligten das Mitwirkungsverbot des § 3 Abs. 1 Nr. 7 BeurkG erläutert. Meine Frage, ob eine meine Mitwirkung an der Amtshandlung ausschließende Vorbefassung vorliege, wurde von den Beteiligten verneint.

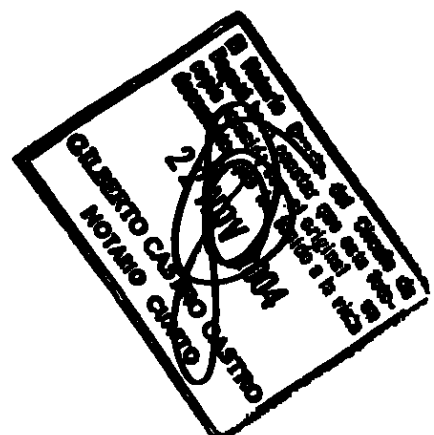
Berlin, den 11. August 1999
Urkundenrolle-Nr. 656/1999

Diack
Notarin

Kostenrechnung
§§ 141, 154 KostO
Geschäftswert: 20.000,00 DM
Beglaubigungsgebühr
Wegegebühr
Gebühr für Vertretungsbescheinigung
16 % Mehrwertsteuer

§ 45 I	25,00 DM
§ 58	25,00 DM
§ 150	25,00 DM
	<u>12,00 DM</u>
	<u>87,00 DM</u>

Diack
Notarin



Die Echtheit vorstehender Unterschrift der Notarin

Elisabeth Quack

in Berlin und die Echtheit des beigedruckten Dienstsiegels werden hiermit bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß die Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Berlin, den 17. August 1999

Der Präsident des Landgerichts
Im Auftrage

(Getferdt)

Richterin am Landgericht

9101 E-F. 2233/99

Gebühr: 25,00 DM
gezahlt

Berlin, den 17. August 1999

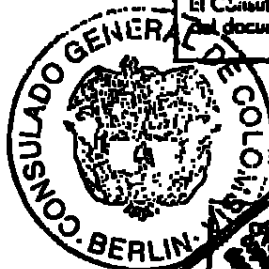
Justiz...

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

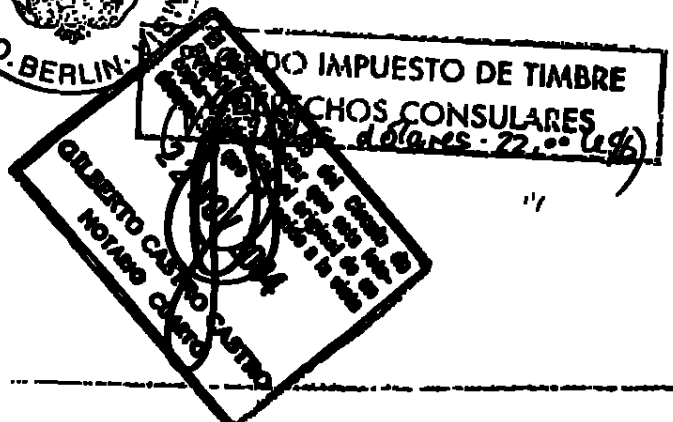
Berlin, 23 Agosto 1999 No. 357/99

El suscrito Cónsul General de Colombia CERTIFICA:

Que Br. Getferdt que autoriza el presente documento ejerce legalmente en la fecha allí expresada las funciones Encargado del Presidente del Tribunal Regional de Berlín y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usó y asumió en sus actos oficiales. El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

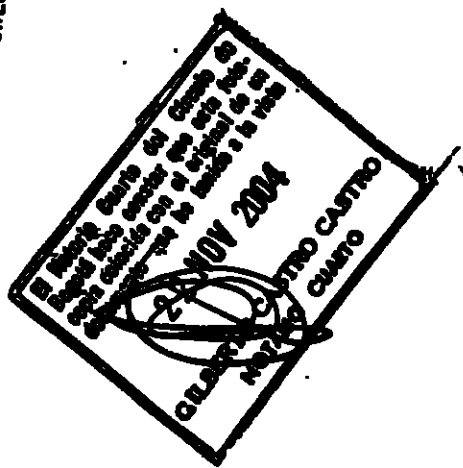


SECRETARÍA NOTARIAL
ENCARGADO DEL CONSULADO



RELACIONES
EXTERIORES

322057
German Velazquez
CUBA FIRMA APTA EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
1999 OCT 14 P 12:17
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTOFF DE BARRIA N 2

8

Traducción oficial del alemán de la notarización (Registro Notarial No. 656/1999) y de la legalización de firmas correspondientes al poder de la compañía SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT domiciliada D-13353 Berlín, República Federal de Alemania.

Por medio de este documento autentico oficialmente las firmas que aparecen anteriormente, ejecutadas en presencia mía el día de hoy por los Apoderados

1. Dr. Uwe Hartmann,

2. Dr. Walter Klose,

ambos con domicilio de negocios en Müllerstrasse 178, 13353 Berlín, y conocidos personalmente por la suscrita Notaria.

Al mismo tiempo, con base en el extracto autenticado del Registro Comercial HRB 283 Acta 93 del Juzgado Municipal de Berlín- Charlottenburg fechado el 17 de Junio de 1999, certifico que los mencionados Señores en su calidad de Apoderados están autorizados para representar conjuntamente a la compañía Schering Aktiengesellschaft domiciliada en Berlín.

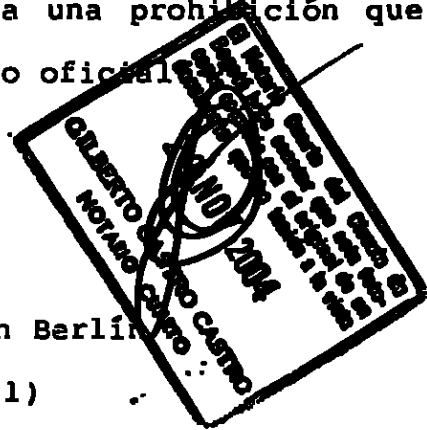
Yo les expliqué a los involucrados la prohibición de co-participación descrita en el Artículo 3 Inciso 1 Numeral 7 de la Ley de Certificaciones Notariales. Ellos contestaron negativamente mi pregunta acerca de si existía una prohibición que excluyera mi co-participación en este acto oficial.

Berlín, Agosto 11 de 1999

Registro Notarial No. 656/1999

Elisabeth Quack, Notaria en Berlín

(Firma y Sello Oficial)



------(continúa en la 2ª página)-----

Nota de gastos:

Artículos 141, 154 Disposición de ImpuestosValor del negocio: 20.000,-- DM

Derechos por autenticación Artículo 45I	25,00 DM
Derechos por concepto de porte Artículo 58	25,00 DM
Derechos por Cert. de Representación Art. 150	25,00 DM
16% Impuesto sobre el Valor Agregado	12,00 DM
Total:	87,00 DM

Elisabeth Quack, Notaria (firma)

Se confirma la autenticidad de la firma que aparece anteriormente, la cual pertenece a la Notaria Elisabeth Quack en Berlín, y también la autenticidad del sello oficial que aparece al lado de dicha firma. Al mismo tiempo, se certifica que la persona mencionada se encontraba legalmente autorizada para la ejecución de ese acto oficial.

Berlín, 17 de Agosto de 1999

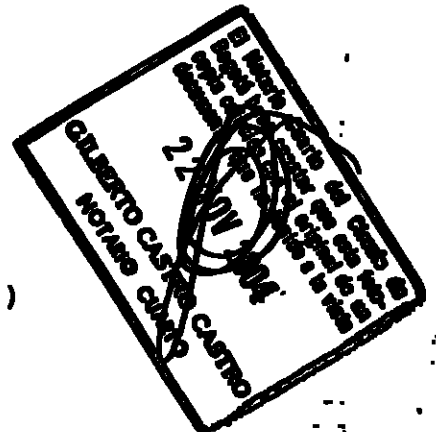
Getferdt, Representante del Presidente Tribunal Regional
(Firma y Sello Oficial)

910 E-F. 2233/99

Impuesto: 25,00 DM pagado

Berlín, 17 de Agosto de 1999

La inspectora de Impuestos (firma ilegible)



El documento traducido del alemán fue legalizado bajo el No. 322052 y bajo el No. 322053 el 14 de Octubre de 1999 en la Oficina de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores.

ADOLF WATZKE
Traductor Oficial
Reg. 2499

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

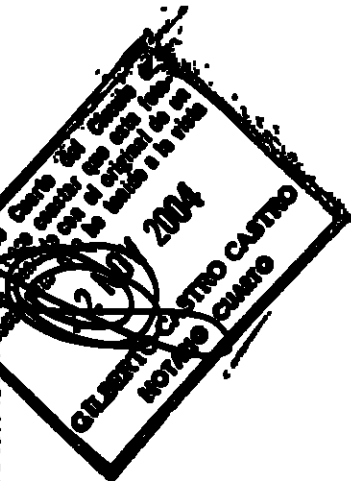
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

323271

ADOLF WATZKE
COPIA FIELMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESMONTADO
LOS FUNCIONES MINISTROS

1999 OCT 20 11:08

JEFE DE LEGALIZACIONES
STAFF OF AMBASSADOR



DOCUMENTO DE CESIÓN ASSIGNMENT DOCUMENT

Los suscritos,
(We, the undersigned)

1) DAVID LIGHT
con domicilio en San Mateo, California, Estados Unidos de América
(domiciled in)

2) KIRK MCLEAN
con domicilio en Oakland, California, Estados Unidos de América
(domiciled in)

declaramos que somos los inventores de la invención que lleva el título
(declare that we are the inventors of the invention titled)

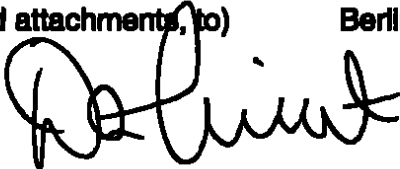
NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED ANTIBODIES AS ANTICOAGULANTS

y que hemos cedido el derecho sobre esta invención en Colombia, junto con los privilegios
(and that we have assigned our rights over this invention in Colombia, together with its
privileges)

y anexidades a favor de
(and attachments, to)

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
Berlin, Alemania

1)



2)



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by MARY ANN J. FLORES*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of MARY ANN J. FLORES, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 5th day of November 2004*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 215040*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



Kevin Shelley
KEVIN SHELLEY
Secretary of State

BY *[Signature]*



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

Contra Costa

ss.

On

October 20, 2014

before me,

Mary Ann J. Flores

Date

Name and Title of Officer (i.e., "Jane Doe, Notary Public")

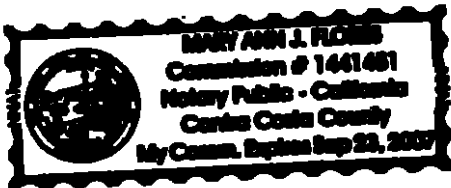
personally appeared

Kirk McLean

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Mary Ann J. Flores

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

52295M2 Columbia Assignment

Document Date:

Number of Pages:

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name:

☐ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s):

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

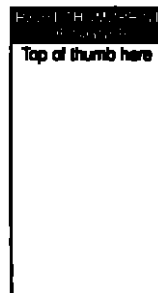
☐ Attorney-in-Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other:

Signer is Representing:



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by ALISHIA L. ROWE-BABB*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of ALISHIA L. ROWE-BABB, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 5th day of November 2004*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 215042*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



Kevin Shelley
KEVIN SHELLEY
Secretary of State

BY *[Signature]*



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

23
14

State of California

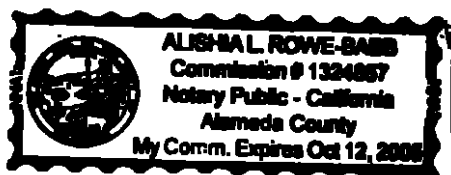
County of Contra Costa } ss.

on November 2, 2004 before me, Alishia L. Rowe-Babb
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared David Light
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Alishia L. Rowe-Babb
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer — Title(s): _____
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney-In-Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other: _____

Signer is Representing: _____



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 November 2003 (13.11.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/093422 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US03/13521
- (22) International Filing Date: 30 April 2003 (30.04.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Date:
60/376,566 1 May 2002 (01.05.2002) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-13342 BERLIN (DE).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): LIGHT, David [US/US]; 614 South Fremont Street, San Mateo, CA 94402 (US). MCLEAN, Kirk [US/US]; 291 Capricorn Avenue, Oakland, CA 94611 (US).
- (74) Agents: ZELANO, Anthony, J. et al.; Millen, White, Zelano & Brunglin, P.C., Arlington Courthouse Plaza 1, Suite 1400, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

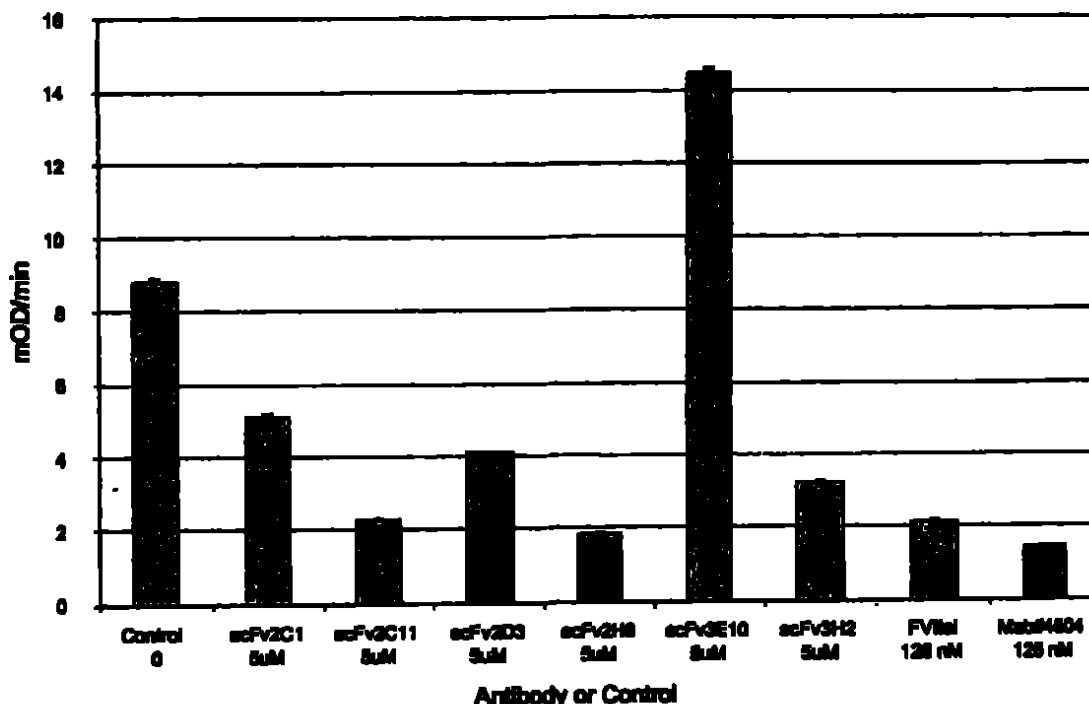
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED ANTIBODIES AS ANTICOAGULANTS



(57) Abstract: This invention relates to novel antibodies that bind with greater affinity to the factor VIIa/tissue factor (FVIIa/TF) complex than to tissue factor (TF) alone, do not compete for binding to TF with FVII and FX, an inhibit FX activation. The antibodies bind at the site of injury and prevent the initiation of thrombosis. The antibodies can be used to treat a variety of thrombotic conditions including but not limited to deep vein thrombosis, disseminated intravascular coagulation, and acute coronary syndrome.



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED ANTIBODIES AS ANTICOAGULANTS

BACKGROUND

Maintaining the proper balance between procoagulant and anticoagulant activity within blood vessels is essential for normal hemostasis (Davie, E.W. *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30(43):10363-10370). Perturbing the balance toward coagulation leads to thrombosis, which can cause heart attack, stroke, pulmonary embolism, and venous thrombosis. There is a need for more effective and safer anticoagulants for the treatment of specific thrombotic disorders.

Tissue factor ("TF") is a transmembrane glycoprotein that is the major initiator of the coagulation cascade (Nemerson, Y. (1995) *Thromb. Haemost.* 74(1):180-184). Under normal physiological conditions active TF is not in contact with blood. During vascular injury, exposure to blood of subendothelial TF and collagen leads to activation of coagulation factors and platelets and subsequently to hemostatic plug formation. Exposed TF acts as a cofactor for the factor VIIa ("FVIIa") catalyzed activation of factor IX ("FIX") and factor X ("FX"), critical components of the intrinsic tenase and prothrombinase complexes, respectively. This leads to rapid formation of FXa and thrombin. Thrombin then cleaves fibrinogen to fibrin, which subsequently polymerizes to form the fibrin clot. The inappropriate induction of TF expression in a variety of clinical settings can lead to life threatening thrombosis and/or contribute to pathological complications. TF exposure following plaque rupture is believed to be responsible for thrombotic occlusion leading to acute myocardial infarction and stroke. In these settings, proinflammatory signaling pathways activated by coagulation factors also contribute to edema formation and increased infarct size. Vascular injury associated with angioplasty leads to upregulation of TF on SMC's which is believed to induce cell signaling pathways associated with restenosis. TF overexpression in cancer and gram-negative sepsis leads to life threatening thrombosis and activation of inflammatory pathways.

The FVIIa/TF complex is involved in the pathogenic mechanism in a variety of thrombotic diseases and the circulating level of TF is a risk factor for certain patients. FVIIa and TF play unique roles in vascular injury in maintaining hemostasis and initiating thrombosis.

TF is expressed in the adventitia normally, but is upregulated and expressed inappropriately in the media and neointima in vascular disease. TF expression in atherosclerotic plaques is increased and shielded from the blood by a thin fibrous cap that may rupture to expose TF. Surgical interventions such as balloon angioplasty, stenting, or endarterectomy damage the vessel wall and expose underlying TF. In the atherosclerotic, lipid-rich, thin-walled plaque, spontaneous rupture or endothelial erosion leads to TF exposure and thrombosis, resulting in unstable angina and myocardial infarction. TF can circulate in cell-derived microparticles and circulating TF levels are elevated in unstable angina, suggesting that this circulating TF may contribute to thrombus formation (Soejima, H. et al. (1999) *Circulation* 99(22):2908-2913). Often cancer is associated with a hypercoagulable state attributed to overexpression of TF on tumor cells. This predisposes the patient to deep vein thrombosis, pulmonary embolism and low grade disseminated intravascular coagulation ("DIC"). DIC results in microvascular fibrin deposition contributing to multi-organ failure.

Protein based anticoagulants that target TF include TF neutralizing antibodies, active site inhibited factor VIIa ("FVIIa"), tissue factor pathway inhibitor ("TFPI"), and Nematode anticoagulant protein ("NAPC2"). Results from acute arterial injury models of thrombosis indicate that protein based inhibitors of FVIIa/TF are effective antithrombotics, with less bleeding compared to heparin, direct thrombin inhibitors, platelet inhibitors, and FXa inhibitors (Himber, J. et al. (2001) *Thromb. Haemost.* 85:475-481; Harker, L.A. et al. (1995) *Thromb. Haemost.* 74(1):464-472. In addition, FVIIa/TF inhibition is superior to other anticoagulants (e.g., heparin, FXa inhibitors) in preventing neointimal thickening and vascular stenosis following balloon injury (Jang, Y. et al. (1995) *Circulation* 92(10):3041-3050).

Inhibition of TF, FVIIa or the FVIIa/TF complex is an efficacious antithrombotic approach for preventing DIC and reducing mortality in experimental models of sepsis. TFPI analogs prevent both thromboplastin and endotoxin-induced DIC in rabbits (Day, K.C. et al. (1990) *Blood* 76:1538-1545; Bregengard, C. et al. (1993) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 4:699-706). Monoclonal antibodies against FVIIa (Biemond, B.J. et al. (1995) *Thromb. Haemost.* 73:223-230) or (Levi, M. et al. (1994) *J. Clin. Invest.* 93:114-120) prevent endotoxin-induced DIC in monkeys. TF neutralizing antibodies, FVIIa, and TFPI, inhibit DIC and reduce mortality in a baboon model of *E. coli*-induced sepsis (Creasey, A.A. et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 91:2850-2860; Taylor, F.B. et al. (1991a) *Blood* 78:364-368; Taylor, F.B. et al. (1991b) *Circ. Shock*

33:127-134; Taylor, F.B. (1996) *Haemostasis Suppl.* 1 26:83-91). Both free FXa and the FVIIa/TF/FXa complex are known to induce the production of proinflammatory cytokines that are associated with an increased risk of death in patients with sepsis (Riewald, M. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:7742-7747). Interestingly, FVIIa was shown to lower plasma levels of IL-6 and IL-8 in the baboon model (Taylor, F.B. *et al.* (1998) *Blood* 91:1609-1615), suggesting that FVIIa/TF inhibition may have additional antiinflammatory effects not shared by other anticoagulant mechanisms.

Several antibodies that are effective anticoagulants, which bind to and neutralize either TF or the FVIIa/TF complex or both, have been described (see e.g., Carson, S.D. *et al.* (1985) *Blood* 66(1):152-156; Tanaka, H. *et al.* (1985) *Thromb. Res.* 40(6):745-756; Kirchhofer, D. *et al.* (2000) *Thromb. Haemost.* 84(6):1072-1081; Kirchhofer, D. *et al.* (2001) *Biochemistry* 40(3):675-682; Faelber, K. *et al.* (2001) *J. Mol. Biol.* 313:83-97; and U.S. Patent Nos. 5,506,134, 5,986,065, and 6,274,142). The TF targeted antibodies of the present invention are effective anticoagulants that have improved characteristics over previously described TF antibodies. In particular, the antibodies of the invention bind with greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone, and are non-competitive with FVII or FX for binding to TF.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides antibodies, which act as anticoagulants, that bind with greater affinity to the factor VIIa/tissue factor ("FVIIa/TF") complex than to tissue factor ("TF") alone. In one embodiment, the antibodies of the invention bind with at least 2-fold greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone, as measured in a microcalorimetry assay. In a preferred embodiment, the antibodies of the invention bind with at least 5-fold greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone. In a more preferred embodiment, the antibodies of the invention bind with at least 10-fold greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone. In another embodiment, the antibodies of the invention do not compete for binding to TF with one or more coagulation factors selected from the group consisting of factors VII ("FVII"), IX ("FIX"), and X ("FX"). In a preferred embodiment, the antibodies of the invention do not compete for binding to TF with FVII and with FX. In a more preferred embodiment, the antibodies of the invention bind with greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone and do not compete for binding to TF with FVII and with FX.

Also disclosed are methods of making the antibodies of the invention, both recombinant and synthetic.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Activity of TF-binding single chain antibodies in the sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay. The sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay was performed as described under Example 4 using an equilibrium mixture of FVIIa (5 nM) and sTF (10 nM), based on the affinity of FVIIa for sTF ($K_{D(app)} = \sim 10$ nM). Hydrolysis of the chromogenic peptide substrate S2266 was monitored as described. Final concentrations of the bacterially expressed single chain antibodies, and the control proteins FVIIai (FVIIa inactivated by a chloromethylketone peptide, PPACK) and Mab#4504 (American Diagnostica), are indicated.

Figure 2. Binding of scFv(TF)3e10 to sTF increases the apparent affinity of sTF for FVIIa. The sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay was performed as described under Example 4 using 2 nM FVIIa in the presence and absence of 800 nM bacterially expressed scFv(TF)3e10. The sTF was titrated into the assay and the rate of cleavage of the chromogenic peptide substrate S2266 was determined. The K_D apparent for sTF was calculated using a standard 4-parameter fit.

Figure 3. Activity of TF-binding single chain antibodies in the prothrombin time (PT) assay. The PT assay was performed as described under Example 4 using recombinant human thromboplastin (Dade, Inc.) containing full length human TF in phospholipid vesicles. Final concentrations of the bacterially expressed single chain antibodies and the control protein FVIIai are indicated.

Figure 4. Measurement of apparent binding affinity of scFv(TF)3e10 for sTF. The sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay was performed as described under Example 4 using 3 nM sTF and 2 nM FVIIa. The concentration of sTF used was below the K_D for binding to FVIIa. Bacterially expressed scFv(TF)3e10 was added at increasing concentrations and the increased rate of reaction was used to determine the K_D apparent of this antibody for sTF using a standard 4-parameter fit. The affinity of scFv(TF)3e10 for the sTF / FVIIa complex ($K_{D(app)} = 65$ nM) is greater than the affinity of scFv(TF)3e10 for sTF measured using BIAcore ($K_{D(app)} = 470$ nM).

Figure 5. Measurement of binding affinity of scFv(TF)3e10 for TF and the FVIIa/TF complex. The microcalorimetry assay was performed as described under Example 4 using scFv(TF)3e10 expressed in CHO cells. This assay shows that scFv(TF)3e10 has a ~20-fold greater affinity for the sTF/FVIIa complex ("Complex") than for sTF ("Free TF").

Figure 6. scFv(TF)3e10 dose dependently inhibits FX activation. The FX activation assay was performed as described under Example 4 using increasing concentrations of bacterially expressed scFv(TF)3e10, 250 nM FX, and the FVIIa/TF complex on a phospholipid surface (10 pM FVIIa). The IC_{50} represents the dose required to reach 50% maximum inhibition.

Figure 7. scFv(TF)3e10 noncompetitively inhibits FX activation by the FVIIa/TF complex. The FX activation assay was performed as described under Example 4 using bacterially expressed scFv(TF)3e10, 25 nM to 400 nM FX, and the FVIIa/TF complex on a phospholipid surface (10 pM FVIIa). Increasing concentrations of scFv(TF)3e10 were titrated into the assay (0 nM, open square; 0.25 nM, open diamond; 0.74 nM, open triangle, 2.2 nM, open circle; 6.7 nM, filled diamond, 20 nM, filled triangle). This Lineweaver-Burk plot of $(1/[S])$, where S (substrate) = factor X (μ M); versus $1/v$, where v (rate) = mOD/min from S2222 hydrolysis by the FXa produced during a 5 min interval) indicates that scFv(TF)3e10 is a noncompetitive inhibitor with respect to the substrate, FX. All lines intercept on (or near) the x-axis as anticipated for a noncompetitive inhibitor (for a competitive inhibitor all lines would intercept on the y-axis).

Figure 8. scFv(TF)3e10 is efficacious in an *in vivo* model of disseminated intravascular coagulation ("DIC"). The TF-antibody scFv(TF)3e10 expressed in CHO cells was evaluated in the rat thromboembolism model described in Example 6 for (A) percent mortality and (B) morbidity-mortality score. (A) In the vehicle-treated group, the dose of TF used resulted in 60% lethality (LD_{60}). scFv(TF)3e10 at 0.7 nmol/kg had no impact on death, but at 7.0 nmol/kg reduced lethality to <40%. (B) In the vehicle-treated group, the *in vivo* dose of TF resulted in an average morbidity-mortality score of 2.6. scFv(TF)3e10 at 0.7 nmol/kg had no impact on death and little or no effect on respiratory distress, but at 14 nmol/kg, the average morbidity-mortality score was reduced to ~1.5.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The anticoagulant antibody of the present invention is an antibody that binds with greater affinity to the factor VIIa/tissue factor ("FVIIa/TF") complex than to tissue factor ("TF") alone. The antibody of the invention binds with at least 2-fold greater affinity, preferably at least 5-fold greater affinity, and more preferably at least 10-fold greater affinity, to the FVIIa/TF complex than to TF alone. The antibody of the invention also does not compete for binding to TF with one or more coagulation factors selected from the group consisting of factor VII ("FVII"), factor IX ("FIX"), and factor X ("FX"). Preferably, the antibody of the invention does not compete for binding to TF with FVII and with FX.

Definitions:

In describing the present invention, the following terms are defined as indicated below.

"Recombinant proteins or polypeptides" refer to proteins or polypeptides produced by recombinant DNA techniques, i.e., produced from cells, microbial or mammalian, transformed by an exogenous DNA construct encoding the desired polypeptide. Proteins or polypeptides expressed in most bacterial cultures will be free of glycan. Proteins or polypeptides expressed in yeast may have a glycosylation pattern different from that expressed in mammalian cells.

"Native" proteins or polypeptides refer to proteins or polypeptides recovered from a source occurring in nature. The term "native antibody" would include naturally occurring antibodies and fragments thereof.

A DNA "coding sequence" is a DNA sequence which is transcribed into mRNA and translated into a polypeptide in a host cell when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' N-terminus and a translation stop codon at the 3' C-terminus. A coding sequence can include prokaryotic sequences, cDNA from eukaryotic mRNA, genomic DNA sequences from eukaryotic DNA, and synthetic DNA sequences. A transcription termination sequence will usually be located 3' to the coding sequence.

"Nucleotide sequence" is a heteropolymer of deoxyribonucleotides (bases adenine, guanine, thymine, or cytosine). DNA sequences encoding the antibodies of this invention can be assembled from synthetic cDNA-derived DNA fragments and short oligonucleotide linkers to provide a synthetic gene that is capable of being expressed in a recombinant expression vector. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of cDNA.

"Recombinant expression vector" is a replicable DNA construct used either to amplify or to express DNA encoding the antibodies of the present invention. An expression vector contains DNA control sequences and a coding sequence. DNA control sequences include promoter sequences, ribosome binding sites, polyadenylation signals, transcription termination sequences, upstream regulatory domains and enhancers. Recombinant expression systems as defined herein will express the antibodies upon induction of the regulatory elements.

"Transformed host cells" refer to cells that have been transformed and transfected with exogenous DNA. Exogenous DNA may or may not be integrated (covalently linked) to chromosomal DNA making up the genome of the cell. In prokaryotes and yeast, for example, the exogenous DNA may be maintained on an episomal element, such as a plasmid or stably integrated into chromosomal DNA. With respect to eukaryotic cells, a stably transformed cell is one in which the exogenous DNA has become integrated into the chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the eukaryotic cell lines or clones to produce a population of daughter cells containing the exogenous DNA.

The terms "analog", "fragment", "derivative", and "variant", when referring to the antibodies of this invention means analogs, fragments, derivatives, and variants of the antibodies which retain substantially the same biological function or activity, as described further below.

An "analog" includes a pro-polypeptide which includes within it, the amino acid sequence of the antibody of this invention. The active antibody of this invention can be cleaved from the additional amino acids that complete the pro-antibody molecule by natural, *in vivo* processes or by procedures well known in the art such as by enzymatic or chemical cleavage.

For example, the recombinant scFV(TF)3e10 polypeptide (SEQ ID NO:1) is expressed as a 282 amino acid pro-polypeptide which is then processed *in vivo* to release the 264 amino acid active mature polypeptide.

A "fragment" is a portion of the antibody of the invention that retains substantially similar functional activity, as shown in the *in vitro* assays disclosed herein as described further below.

A "derivative" includes all modifications to the antibodies of this invention that substantially preserve the functions disclosed herein and include additional structure and attendant function, e.g., PEGylated antibodies which have greater half-life, and biotinylated antibodies, as described further below. A derivative also includes N- or O-linked glycosylated antibodies that can be generated by inserting N- or O-glycosylation sites into the antibody sequences by standard recombinant DNA technology.

"Substantially similar functional activity" and "substantially the same biological function or activity" each means that the degree of biological activity that is within about 30% to 100% or more of that biological activity demonstrated by the polypeptide to which it is being compared when the biological activity of each polypeptide is determined by the same procedure or assay. For example, an antibody that has substantially similar functional activity to the antibody of Example 1 (SEQ ID NO:1) is one that, when tested in the sTF/FVIIa peptide hydrolysis and FX activation assays described in Example 4, demonstrates the ability to bind to and neutralize the FVIIa/TF complex.

"Similarity" between two polypeptides is determined by comparing the amino acid sequence and its conserved amino acid substitutes of one polypeptide to the sequence of a second polypeptide. Such conservative substitutions include those described above in *The Atlas of Protein Sequence and Structure 5* by Dayhoff (1978) and by Argos (1989) *EMBO J.* 8:779-785. For example, amino acids belonging to one of the following groups represent conservative changes:

- Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr;
- Cys, Ser, Tyr, Thr;
- Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;
- Lys, Arg, His;

-Phe, Tyr, Trp, His; and
-Asp, Glu.

"Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin ("Ig") molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv, which are capable of binding an epitope of the selected target protein, for example, soluble TF ("sTF"). Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. However, epitopes which involve non-contiguous amino acids may require more, e.g. at least 15, 25, or 50 amino acids.

All other technical terms used herein have the same meaning as is commonly used by those skilled in the art to which the present invention belongs.

Antibodies of the Invention and their Generation:

The anticoagulant antibodies of this invention bind with greater affinity to the factor VIIa/tissue factor ("FVIIa/TF") complex than to tissue factor ("TF") alone. In a preferred embodiment, the antibodies of the invention bind with at least 2-fold greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone, more preferably with at least 5-fold greater affinity, and still more preferably with at least 10-fold greater affinity, as measured in a microcalorimetry assay. In another preferred embodiment of this invention, the antibodies also do not compete with one or more coagulation factors selected from the group consisting of factors VII ("FVII"), IX ("FIX"), and X ("FX") for binding to TF. In a more preferred embodiment, the antibodies of the invention do not compete with FVII and with FX for binding to TF. In the most preferred embodiment, the antibodies of the invention bind with greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone and do not compete for binding to TF with FVII and with FX.

Generally speaking, an antibody that binds specifically to a selected target protein (e.g., the FVIIa/TF complex or TF) provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20- fold higher than a detection signal provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies that bind specifically to the selected target protein do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate the target protein from solution.

The selected target protein can be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human to produce polyclonal antibodies. If desired, the target

protein can be conjugated to a carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g., lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (*bacillus Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

Monoclonal antibodies that bind specifically to a selected target protein can be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Kohler *et al.* (1985) *Nature* 256:495-497; Kozbor *et al.* (1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030; and Cote *et al.* (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Neuberger *et al.* (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda *et al.* (1985) *Nature* 314:452-454). Monoclonal and other antibodies also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences can be minimized by replacing residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual residues or by grafting of entire complementarity determining regions. Alternatively, humanized antibodies can be produced using recombinant methods, as described in GB2188638B. Antibodies that bind specifically to a selected target protein can contain antigen-binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. Patent 5,565,332.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies ("scFv") that bind specifically to a selected target protein. Antibodies with related specificity, but of distinct

idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from random combinatorial Ig libraries (Burton (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11120-11123).

Single chain antibodies also can be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion *et al.* (1996) *Eur. J. Cancer Prev.* 5:507-511). Single chain antibodies can be mono- or bispecific, and can be bivalent or tetravalent. Construction of tetravalent, bispecific single chain antibodies is taught, for example, in Coloma and Morrison (1997) *Natl. Biotechnol.* 15:159-163. Construction of bivalent, bispecific single chain antibodies is taught in Mallendar and Voss (1994) *J. Biol. Chem.* 269:199-216.

A nucleotide sequence encoding a single chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence. Alternatively, single chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage display technology (Verhaar *et al.* (1995) *Int. J. Cancer* 61:497-501; and Nicholls *et al.* (1993) *J. Immunol. Meth.* 165:81-91).

Antibodies that bind specifically to a selected target protein can also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening Ig libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837; Winter *et al.* (1991) *Nature* 349:293-299).

The DNA encoding the antibody of the invention may be cloned in cDNA or in genomic form by any cloning procedure known to those skilled in the art. See for example, Sambrook, J.F. *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), which is herein incorporated by reference).

In the case where the antibody is a monoclonal antibody, once a DNA sequence has been identified that encodes a Fv region which when expressed shows specific binding activity, antibodies comprising that Fv region may be prepared by methods known to one of skill in the art. Thus, for example, Chaudhary, V.K. *et al.* (1989) *Nature* 339(6223): 394-397; Batra, J.K. *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265(25):15198-15202; Batra, J.K. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(21):8545-8549; Chaudhary, V.K. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(3):1066-

1070, all incorporated by reference, describe the preparation of various single chain antibody proteins.

In a preferred approach, the TF-binding antibodies of the invention are single chain antibodies, which are prepared using a phage display library. The epitope-binding region of a single chain antibody is made up from two variable region domains: one from the heavy chain and the other from the light chain. In the first step of constructing a phage display library, the variable genes (V_H (from IgM) V_κ and V_L) are PCR cloned from pooled mRNA from human bone marrow, lymph node and spleen using a set of family specific primers. The resultant pCITE- V_H (3.8×10^8 members), pZ604- V_κ (1.6×10^7) and pZ604- V_L (3.2×10^7) libraries represent a permanent and high diversity of V genes. The V_H genes are then amplified from pCITE- V_H library. The V_κ and V_L genes are PCR amplified from the pZ604- V_κ and pZ604- V_L library with reverse J_H and linker sequence at the 5'end. The gel purified V_H , V_κ , and V_L containing PCR products are then spliced together to make the scFv gene repertoire. The scFv gene repertoire is cloned to a phagemid vector pZ603, and the ligation product is electroporated into competent TG1 *E. coli* cells to generate the scFv phage display library, HuPhabL3, with 5.2×10^8 individual transformants (Kay, B.K. *et al.* (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego CA; Marks, J.D. *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222(3):581-597; Sheets, M.D. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(11):6157-6162).

The TF-binding phage from the scFv phage display library are selected, amplified, and subsequently identified using panning techniques that are well known in the art. Soluble TF is immobilized in plastic tubes, and non-fat milk can be used to reduce non-specific binding to the plastic. The population of scFv phage is exposed to the immobilized sTF in the plastic tubes, and the unbound phage are removed by extensive washing. The TF-binding scFv phage are eluted from the tubes and then amplified by infecting TG1 *E. coli* cells in solution. This panning procedure is repeated three times, and the resulting TF-binding scFv phage are isolated by transforming TG1 cells. Transformants expressing TF-binding antibodies are identified using a standard ELISA with sTF immobilized onto plastic in 96-well dishes. The DNA of the single chain antibody inserts of ELISA-positive transformants are sequenced. Based on DNA sequencing, six unique single chain antibodies, scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h8, scFv(TF)3e10 and scFv(TF)3h2, are identified herein, and were expressed and purified from *E. coli*, and characterized as described below under Example 5.

Expression and Purification of Antibodies of the Invention:

There are several ways to express the recombinant antibodies of the invention *in vitro*, including *E. coli*, baculovirus, yeast mammalian cells or other expression systems. Methods for the expression of cloned genes in bacteria are well known. To obtain high level expression of a cloned gene in a prokaryotic system, it is essential to construct expression vectors that contain, at the minimum, a strong promoter to direct mRNA transcription termination. Examples of regulatory regions suitable for this purpose are the promoter and operator region of the *E. coli* beta-glucosidase gene, the *E. coli* tryptophan biosynthetic pathway, or the leftward promoter from phage Lambda. The inclusion of selection markers in DNA vectors transformed in *E. coli* is useful. Examples of such markers include the genes specifying resistance to ampicillin, tetracycline, or chloramphenicol.

Of the higher eukaryotic cell systems useful for expression of the antibodies of the invention, and analogs, fragments, derivatives or variants thereof, there are numerous cell systems to select from. Illustrative examples of mammalian cell lines include but are not limited to RPMI 7932, VERO and HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, WI38, BHK, COS-7, C127 or MDCK cell lines. A preferred mammalian cell lines is CHL-1. When CHL-1 is used hygromycin is included as a eukaryotic selection marker. CHL-1 cells are derived from RPMI 7032 melanoma cells, a readily available human cell line. The CHL-1 cell line has been deposited with ATCC according to conditions of the Budapest Treaty and has been assigned #CRL 9446, deposited Jun. 18, 1987. Cells suitable for use in this invention are commercially available from the ATCC. Illustrative cell lines include *Spodoptera frugiperda* and *Bombyx mori*.

The prokaryotic system, *E. coli*, is not able to do post-translational modification, such as glycosylation. In addition, proteins with complex disulfide patterns are often misfolded when expressed in *E. coli*. With the prokaryotic system, the expressed protein is either present in the cell cytoplasm in an insoluble form so-called inclusion bodies, found in the soluble fraction after the cell has lysed, or is directed into the periplasm by addition of appropriate secretion signal sequences. If the expressed protein is in insoluble inclusion bodies, solubilization and subsequent refolding of the inclusion bodies is usually required.

Many prokaryotic expression vectors are known to those of skill in the art such as pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, CA, USA), and pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, USA), which are commercially available.

Promoters commonly used in recombinant microbial expression systems include the beta-lactamase (penicillinase) and lactose promoter system (Chang, A.C. *et al.* (1978) *Nature* 275(5681):617-624; Goeddel, D.V. *et al.* (1979) *Nature* 281(5732):544-548), the tryptophan (trp) promoter system (Goeddel, D.V. *et al.* (1980) *Nucl. Acids Res.* 8(18):4057-4074) and tac promoter (Maniatis, T. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Another useful bacterial expression system employs the lambda phage pL promoter and cits857 thermoinducible repressor (Bernard, H.U. *et al.* (1979) *Gene* 5(1):59-76; Love, C.A. *et al.* (1996) *Gene* 176(1-2):49-53). Recombinant antibodies may also be expressed in yeast hosts such as *Saccharomyces cerevisiae*. It usually gives the ability to do various post-translational modifications. The expressed antibody can be secreted into the culture supernatant where not many other proteins reside, making purification easier. Yeast vectors for expression of the antibodies in this invention contain certain requisite features. The elements of the vector are generally derived from yeast and bacteria to permit propagation of the plasmid in both. The bacterial elements include an origin of replication and a selectable marker. The yeast elements include an origin of replication sequence (ARS), a selectable marker, a promoter, and a transcriptional terminator.

Suitable promoters in yeast vectors for expression include the promoters of TRP1 gene, the ADH1 or ADHII gene, acid phosphatase (PH03 or PH05) gene, isocytichrome gene, or the promoters involved with the glycolytic pathway, such as the promoter of enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH), 3-phosphoglycerate kinase (PGK), hexokinase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase and phosphoglucose isomerase (Hitzeman, R.A. *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255(24):12073-12080; Hess, B. *et al.* (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149-167; and Holland, M.J. and Holland, J.P. (1978) *Biochemistry* 17(23):4900-4907).

Commercially available yeast vectors include pYES2, pPIC9 (Invitrogen, San Diego, CA), Yepc-pADH2a, pYcDE-1 (Washington Research, Seattle, WA), pBC102-K22 (ATCC # 67255), and YpGX265GAL4 (ATCC # 67233). Mammalian cell lines including but not limited to

COS-7, L cells, C127, 3T3, Chinese Hamster Ovary (CHO), HeLa, BHK, CHL-1, NSO, and HEK293 can be employed to express the recombinant antibodies in this invention. The recombinant proteins produced in mammalian cells are normally soluble and glycosylated and have authentic N-termini. Mammalian expression vectors may contain non-transcribed elements such as an origin of replication, promoter and enhancer, and 5' or 3' nontranslated sequences such as ribosome binding sites, a polyadenylation site, acceptor site and splice donor, and transcriptional termination sequences. Promoters for use in mammalian expression vectors usually are for example viral promoters such as Polyoma, Adenovirus, HTLV, Simian Virus 40 (SV 40), and human cytomegalovirus (CMV).

Depending on the expression system and host selected, a homogeneous recombinant antibody can be obtained by using various combinations of conventional chromatography used for protein purification. These include: immunoaffinity chromatography, reverse phase chromatography, cation exchange chromatography, anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, gel filtration chromatography, and HPLC. If the expression system secretes the antibody into the growth media, the protein can be purified directly from the media. If the antibody is not secreted, it is isolated from cell lysates. Cell disruption can be done by any conventional method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or use of cell lysing agents.

The plasmid construct based on pCANTAB5 (Pharmacia) was used for the bacterial expression of the single chain antibodies of this invention. For example, a plasmid containing the single chain antibody scFv(TF)3e10 is pZ612/3e10 and encodes the single chain antibody sequence followed by an e-tag sequence, which can be used to purify the protein. The amino acid sequence of the scFv(TF)3e10 antibody corresponds to SEQ ID NO:1 (Example 1), and the DNA sequence encoding scFv(TF)3e10 corresponds to SEQ ID NO:2.

The plasmid construct based on pTHR525 (see U.S. Patent No. 5,827,824) was used for the mammalian expression of the single chain antibodies of this invention. For example, primers were designed to generate a DNA fragment spanning the pro-scFv(TF)3e10 amino acid sequence, including the N-terminal signal sequence and the C-terminal e-tag sequence, in the bacterial expression plasmid. PCR was performed to generate a DNA fragment that was inserted into the mammalian expression plasmid, which contains the ampicillin resistance gene.

and the hygromycin and DHFR selection markers. Expression of the single chain antibodies of the invention was driven by the MPSV LTR promoter.

In a preferred embodiment of this invention, the mammalian expression constructs were transfected into CHO DXB11 cells. Stable populations were selected using 400 µg/ml hygromycin B in HAMS/F12 medium. Expression levels were approximately 500 µg/L. To increase expression levels a population was selected using 100 nM methotrexate in alpha MEM medium. The approximate expression level of this population was 5 mg/L.

The antibodies of this invention can be purified by methods well known in the art. For example, antibodies can be affinity purified by passage over a column to which TF is bound. The bound TF-antibodies can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

The single chain antibodies described herein contain the e-tag sequence at the C-terminus of the protein. Anti-e-tag affinity columns were purchased from American/Pharmacia Biotech. Cell culture media was filtered through a 0.22 µm filter and loaded into 5 ml e-tag column at 2 ml/min. The column was washed with 0.2 M phosphate buffer 0.05% NaN₃, pH 7.0, and then collected into tubes containing 0.1 volume 1M Tris buffer, pH 8.2 to neutralize the elution buffer. Alternately, the filtered culture medium was loaded onto a protein A column. In this case, the column was washed with 50 mM citric acid, 300 mM NaCl, pH 6.5 and eluted with the same buffer at pH 3.0. In both cases, the purified samples were subsequently loaded onto a Sephadex 200 column to separate monomer from dimer forms of the antibody.

Selection of Antibodies of the Invention:

Once antibodies are generated, expressed and purified, they can further characterized using BIAcore, a sTF dependent factor VIIa assay (sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay), a FX activation assay, and the PT assay described under Example 4 in order to identify the antibodies of this invention.

In a preferred embodiment of this invention, TF-binding scFv antibodies that bind with greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone are selected using the sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay. In this assay, TF-antibodies that bind with greater affinity to the

FVIIa/TF complex than to TF are expected to increase the $K_{D(app)}$. Figure 2 shows that the single chain antibody scFv(TF)3e10 increased the $K_{D(app)}$ ~5-fold. A microcalorimetry assay is used to measure the affinity of the TF-antibodies for the FVIIa/TF complex as compared to TF alone. Figure 5 shows that the single chain antibody scFv(TF)3e10 has a K_D of binding to the FVIIa/TF complex and free TF of 800 nM and 33 nM, respectively, which corresponds to ~20-fold greater affinity for the FVIIa/TF complex as compared to TF alone. The antibodies of this invention have at least 2-fold, preferably at least 5-fold, and more preferably at least 10-fold greater affinity for the FVIIa/TF complex than for TF.

TF-binding scFv antibodies that do not compete with FVII for binding to TF are selected using the sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay. In this assay, TF-antibodies that compete with FVIIa for binding to TF are expected to inhibit the hydrolysis of the chromogenic substrate S2266. Figure 1 shows that the single chain antibody scFv(TF)3e10 did not inhibit, and actually increased, FVIIa activity.

TF-binding scFv antibodies that inhibit FX activation are selected using the PT assay and the FX activation assay. In the PT assay, TF-antibodies that prolong PT are expected to inhibit FX activation. Figure 3 shows that the single chain antibody scFv(TF)3e10 prolonged the PT, indicating that this antibody inhibits FX activation. In the FX activation assay, TF-antibodies that inhibit FXa activity are expected to inhibit the hydrolysis of the chromogenic substrate S2222. Figure 6 shows that the single chain antibody scFv(TF)3e10 inhibited FXa activity.

TF-binding scFv antibodies that do not compete with FX for binding to TF are selected using the FX activation assay. In this assay, TF-antibodies that are non-competitive with FX are expected to inhibit FX activation independently from the concentration of FX used. Figure 7 shows that the single chain antibody scFv(TF)3e10 inhibited FXa activity in a FX concentration-independent manner.

In a preferred embodiment of the present invention, a single chain antibody (scFv(TF)3e10) was identified which has a single V_H/V_L binding site for TF. The amino acid sequence of scFv(TF)3e10, is shown in Example 1 and corresponds to SEQ ID NO:1. The DNA sequence encoding scFv(TF)3e10 corresponds to SEQ ID NO:2.

Analog, Fragment, Derivative and Variant of Antibodies of the Invention:

An analog, fragment, derivative, or variant of the antibodies of the present invention may be: (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code; or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group, or (iii) one in which the mature antibody is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the antibody (for example, polyethylene glycol), or (iv) one in which additional amino acids are fused to the mature antibody, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature antibody. Such analogs, fragments, derivatives, and variants are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

Preferably, the derivatives of the present invention will contain conservative amino acid substitutions (defined further below) made at one or more predicted, preferably nonessential amino acid residues. A "nonessential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of a protein without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Non-conservative substitutions would not be made for conserved amino acid residues or for amino acid residues residing within a conserved protein domain, unless the substitutions were made for the purpose of selecting for variant antibodies as described further below. Fragments or biologically active portions include polypeptide fragments suitable for use as a medicament, as a research reagent, and the like. Fragments include peptides comprising amino acid sequences sufficiently similar to or derived from the amino acid sequences of an antibody of this invention and exhibiting at least one

activity of that polypeptide, but which include fewer amino acids than the full-length polypeptides disclosed herein.

Moreover, preferred derivatives of the present invention include mature antibodies that have been fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide and/or to reduce potential immunogenicity of the polypeptide (for example, polyethylene glycol, "PEG"). The PEG can be used to impart water solubility, size, slow rate of kidney clearance, and reduced immunogenicity to the antibody. See e.g., U.S. Patent 6,214,966. In the case of PEGylations, the fusion of the antibody to PEG can be accomplished by any means known to one skilled in the art. For example, PEGylation can be accomplished by first introducing a cysteine mutation into the antibody, followed by site-specific derivatization with PEG-maleimide. The cysteine can be added to the C-terminus of the peptides. See, e.g., Tsutsumi *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(15):8548-8553. Another modification which can be made to the antibody involves biotinylation. In certain instances, it may be useful to have the antibody biotinylated so that it can readily react with streptavidin. Methods for biotinylation of proteins are well known in the art. Additionally, N- or O-glycosylation sites may be introduced into the antibody sequences so that post-translational N- or O-linked glycosylation of the antibodies may occur *in vivo*.

Variants of the antibodies of this invention include polypeptides having an amino acid sequence sufficiently similar to the amino acid sequence of the original antibodies. The term "sufficiently similar" means a first amino acid sequence that contains a sufficient or minimum number of identical or equivalent amino acid residues relative to a second amino acid sequence such that the first and second amino acid sequences have a common structural domain and/or common functional activity. For example, amino acid sequences that contain a common structural domain that is at least about 45%, preferably about 75% through 98%, identical are defined herein as sufficiently similar. Preferably, variants will be sufficiently similar to the amino acid sequence of the preferred antibodies of this invention. Variants include variants of antibodies encoded by a polynucleotide that hybridizes to a polynucleotide of this invention or a complement thereof under stringent conditions. Such variants generally retain the functional activity of the antibodies of this invention. Libraries of fragments of the polynucleotides can be used to generate a variegated population of fragments for screening and subsequent selection. For example, a library of fragments can be generated by treating a double-stranded PCR

fragment of a polynucleotide with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double-stranded DNA, renaturing the DNA to form double-stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single-stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, one can derive an expression library that encodes N-terminal and internal fragments of various sizes of the antibodies of this invention.

Variants include antibodies that differ in amino acid sequence due to mutagenesis. For example, mutagenesis may be performed according to recombinant DNA techniques well known in the art to modify the V_L and V_H domains of the Ig light and heavy chains to create variants that have increased binding affinity to the FVIIa/TF complex as compared to free TF. Particularly preferred variants include antibodies with modifications within the complementarity determining regions of the V_L and V_H domains.

Variants also include antibodies that differ in amino acid sequence due to the insertion or deletion of amino acid residues by mutagenesis. For example, mutagenesis may be performed according to recombinant DNA techniques well known in the art to insert or delete amino acids in the N-terminal or C-terminal portions of the V_H or V_L domains of the Ig light and heavy chains to create variants that retain substantially similar functional activity. Particularly preferred variants include single chain antibodies with insertions or deletions of amino acid residues in the V_H - V_L linker between the V_H and V_L domains. The V_H - V_L linker sequence in the single chain antibody depicted in Example 1 is 5 amino acid residues in length. It will be apparent that other short linker sequences, from 0 to 20 amino acids may be used, wherein the antibody retains substantially similar functional activity. Modifications of the existing V_H - V_L linker may be aimed at increasing the stability of the dimer form of the single chain antibody.

In one embodiment, a variegated library of variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential variant amino acid sequences is expressible as individual polypeptides, or, alternately, as a set of larger fusion proteins (for example, for phage display) containing the set of sequences therein. There are a

variety of methods that can be used to produce libraries of potential variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential variant sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (see, e.g., Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984a) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984b) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of antibodies for TF- or FVIIa/TF complex-binding activity or FX activation inhibitory activity. The most widely used techniques, which are amenable to high throughput analysis for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a technique that enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify the desired variants.

Example 1 depicts the amino acid sequence of one TF-binding single chain antibody, scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO:1), and delineates the V_H-V_L linker and the V_H and V_L domains. Variants that have TF- or FVIIa/TF complex-binding activity or inhibit FX activation can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, for example insertion, truncation or point mutants, of the antibodies of this invention using the sTF/FVIIa peptide hydrolysis or FX activation assays described in Example 4. The antibodies of the present invention include the antibodies of Example 1 and 3 (SEQ ID NOs:1 and 3), as well as those antibodies having insubstantial variations in sequence from it. An "insubstantial variation" would include any sequence, substitution, or deletion variant that maintains substantially at least one biological function of the antibodies of this invention, e.g., the ability to inhibit FX activation. These functional equivalents may preferably include antibodies which have at least about a 90%

identity to the V_L or V_H region domains of the single chain antibody of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, and more preferably at least a 95% identity to the V_L or V_H region domains of the single chain antibody of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, and still more preferably at least a 97% identity to the V_L or V_H region domains of the single chain antibody of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, and also include portions of such antibody having substantially the same biological activity. However, any antibody having insubstantial variation in amino acid sequence from the antibody of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 that demonstrates functional equivalency as described further herein is included in the description of the present invention.

Pharmaceutical Compositions:

The invention also provides pharmaceutical compositions which can be administered to a patient to achieve a therapeutic effect. Pharmaceutical compositions of this invention can be prepared for administration by combining the antibody of this invention having the desired degree of purity and the pharmaceutically effective amount with physiologically acceptable carriers.

The antibodies of the present invention can be used in pharmaceutical compositions, for intravenous administration or subcutaneous administration or intrathecal administration. Thus, the above described antibodies preferably will be combined with an acceptable sterile pharmaceutical carrier, such as five percent dextrose, lactated Ringer's solution, normal saline, sterile water, or any other commercially prepared physiological buffer solution designed for intravenous infusion. It will be understood that the selection of the carrier solution and the dosage and administration of the composition will vary with the subject and the particular clinical setting, and will be governed by standard medical procedures.

In accordance with the methods of the present invention, these pharmaceutical compositions may be administered in amounts effective to inhibit the pathological consequences associated with excess thrombin generation in the subject.

Administration of the antibody may be by a bolus intravenous injection, by a constant intravenous infusion or by a combination of both routes. Alternatively, or in addition, the antibody mixed with appropriate excipients may be taken into the circulation from an intramuscular site. Systemic treatment with antibody can be monitored by determining the activated partial thromboplastin time (PT) on serial samples of blood taken from patient. The

coagulation time observed in this assay is prolonged when a sufficient level of the antibody is achieved in the circulation.

The recombinant antibodies and pharmaceutical compositions of this invention are useful for parenteral, topical, intravenous, oral or local administration. The pharmaceutical compositions can be administered in a variety of unit dosage forms depending upon the method of administration. For example, unit dosage forms can be administered in the form including but not limited to tablets, capsules, powder, solutions, and emulsions.

The recombinant antibodies and pharmaceutical compositions of this invention are particularly useful for intravenous administration. The compositions for administration will commonly comprise a solution of the single chain antibody dissolved in a pharmaceutically acceptable carrier, preferably in an aqueous carrier. A variety of aqueous carriers can be used, e.g., buffered saline and the like. These solutions are sterile and generally free of undesirable matter. The compositions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques.

A typical pharmaceutical composition for intravenous administration can be readily determined by one of ordinary skill in the art. The amounts administered are clearly protein specific and depend on its potency and pharmacokinetic profile. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more detail in such publications as *Remington's Pharmaceutical Science*, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa (1980).

The compositions containing the present antibodies of the invention or a cocktail thereof (i.e., with other proteins) can be administered as therapeutic treatments. In therapeutic applications, compositions are administered to a patient suffering from a bleeding disorder or disease in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the bleeding. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective amount". Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's health.

Single or multiple administration of the compositions may be administered depending on the dosage and frequency as required and tolerated by the patient. In any event, the composition should provide a sufficient quantity of the proteins of this invention to effectively treat the patient.

The antibodies of the invention, or their pharmaceutically acceptable compositions, are administered in a therapeutically effective amount, which will vary depending upon a variety of factors including the activity of the specific antibody employed; the metabolic stability and length of action of the antibody; the age, body weight, general health, sex, and diet of the patient; the mode and time of administration; the rate of excretion; the drug combination; the severity of the particular disease-states; and the host undergoing therapy. Generally, a daily therapeutically effective amount is from about 0.14 mg to about 14.3 mg/kg of body weight per day of an antibody of the invention, or a pharmaceutically acceptable composition thereof; preferably, from about 0.7 mg to about 10 mg/kg of body weight per day; and most preferably, from about 1.4 mg to about 7.2 mg/kg of body weight per day. For example, for administration to a 70 kg person, the dosage range would be from about 10 mg to about 1.0 gram per day of an antibody of the invention, or a pharmaceutically acceptable composition thereof, preferably from about 50 mg to about 700 mg per day, and most preferably from about 100 mg to about 500 mg per day.

Cell and Gene Therapy:

An antibody of the invention may be employed in accordance with the present invention by expression of such antibody *in vivo* by a method referred to as "cell therapy". Thus, for example, cells may be engineered with a polynucleotide (DNA or RNA) encoding the antibody *ex vivo*, and the engineered cells are then provided to a patient to be treated with the antibody. Such methods are well known in the art. For example, cells may be engineered by procedures known in the art by use of a retroviral particle containing RNA encoding the antibody of the present invention.

An antibody of the invention may also be employed in accordance with the present invention by expression of such antibody *in vivo* by a method referred to as "gene therapy". Thus, for example, a virus may be engineered with a polynucleotide (DNA or RNA) encoding the antibody, and the engineered virus is then provided to a patient to be treated with the antibody. Such methods are well known in the art. For example, recombinant adenoviruses

may be engineered by procedures known in the art containing DNA encoding the antibody of the present invention.

Local delivery of the anticoagulant antibodies of the present invention using cell or gene therapy may provide the therapeutic agent to the target area, the endothelial cells lining blood vessels.

Both *in vitro* and *in vivo* cell and gene therapy methodologies are contemplated. Several methods for transferring potentially therapeutic genes to defined cell populations are known. See, e.g., Mulligan (1993) *Science* 260:926-931. These methods include:

- 1) Direct gene transfer. See, e.g., Wolff *et al.* (1990) *Science* 247: 1465-1468;
- 2) Liposome-mediated DNA transfer. See, e.g., Caplen *et al.* (1995) *Nature Med.* 3:39-46; Crystal (1995) *Nature Med.* 1:15-17; Gao and Huang (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:280-285;
- 3) Retrovirus-mediated DNA transfer. See, e.g., Kay *et al.* (1993) *Science* 262:117-119; Anderson (1992) *Science* 256:808-813.
- 4) DNA Virus-mediated DNA transfer. Such DNA viruses include adenoviruses (preferably Ad2 or Ad5 based vectors), herpes viruses (preferably herpes simplex virus based vectors), and parvoviruses (preferably "defective" or non-autonomous parvovirus based vectors, more preferably adeno-associated virus based vectors, most preferably AAV-2 based vectors). See, e.g., All *et al.* (1994) *Gene Therapy* 1:367-384; U.S. Patent 4, 797,368, Incorporated herein by reference, and U.S. Patent 5,139,941, Incorporated herein by reference.

The choice of a particular vector system for transferring the gene of interest will depend on a variety of factors. One important factor is the nature of the target cell population. Although retroviral vectors have been extensively studied and used in a number of gene therapy applications, these vectors are generally unsuited for infecting non-dividing cells. In addition, retroviruses have the potential for oncogenicity. However, recent developments in the field of lentiviral vectors may circumvent some of these limitations. See Naldini *et al.* (1996) *Science* 272:263-267.

Retroviruses from which the retroviral plasmid vectors hereinabove mentioned may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma Virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, adenovirus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus. In one embodiment, the retroviral plasmid vector is derived from Moloney Murine Leukemia Virus.

Adenoviruses have the advantage that they have a broad host range, can infect quiescent or terminally differentiated cells, such as neurons or hepatocytes, and appear essentially non-oncogenic. See, e.g., Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 367. Adenoviruses do not appear to integrate into the host genome. Because they exist extrachromosomally, the risk of insertional mutagenesis is greatly reduced. Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 373.

Adeno-associated viruses exhibit similar advantages as adenoviral-based vectors. However, AAVs exhibit site-specific integration on human chromosome 19 (Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 377).

In a preferred embodiment, the DNA encoding the antibodies of this invention is used in cell or gene therapy for disorders including, but not limited to, deep vein thrombosis, disseminated intravascular coagulation, acute coronary syndrome or cancer with evidence of coagulopathy.

According to this embodiment, cell or gene therapy with DNA encoding the antibodies of this invention is provided to a patient in need thereof, concurrent with, or immediately after diagnosis.

The skilled artisan will appreciate that any suitable gene therapy vector containing DNA encoding the antibody of the invention or DNA encoding analogs, fragments, derivatives or variants of the antibody of the invention may be used in accordance with this embodiment. The techniques for constructing such a vector are known. See, e.g., Anderson, W.F. (1998) *Nature* 392:25-30; Verma I.M. and Somia, N. (1998) *Nature* 389:239-242. Introduction of the antibody DNA-containing vector to the target site may be accomplished using known techniques.

Retroviruses from which the retroviral plasmid vectors hereinabove mentioned may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma Virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, adenovirus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus. In one embodiment, the retroviral plasmid vector is derived from Moloney Murine Leukemia Virus.

Adenoviruses have the advantage that they have a broad host range, can infect quiescent or terminally differentiated cells, such as neurons or hepatocytes, and appear essentially non-oncogenic. See, e.g., Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 367. Adenoviruses do not appear to integrate into the host genome. Because they exist extrachromosomally, the risk of insertional mutagenesis is greatly reduced. Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 373.

Adeno-associated viruses exhibit similar advantages as adenoviral-based vectors. However, AAVs exhibit site-specific integration on human chromosome 19 (Ali *et al.* (1994), *supra*, p. 377).

In a preferred embodiment, the DNA encoding the antibodies of this invention is used in cell or gene therapy for disorders including, but not limited to, deep vein thrombosis, disseminated intravascular coagulation, acute coronary syndrome or cancer with evidence of coagulopathy.

According to this embodiment, cell or gene therapy with DNA encoding the antibodies of this invention is provided to a patient in need thereof, concurrent with, or immediately after diagnosis.

The skilled artisan will appreciate that any suitable gene therapy vector containing DNA encoding the antibody of the invention or DNA encoding analogs, fragments, derivatives or variants of the antibody of the invention may be used in accordance with this embodiment. The techniques for constructing such a vector are known. See, e.g., Anderson, W.F. (1998) *Nature* 392:25-30; Verma I.M. and Somia, N. (1998) *Nature* 389:239-242. Introduction of the antibody DNA-containing vector to the target site may be accomplished using known techniques.

The cell or gene therapy vector includes one or more promoters. Suitable promoters which may be employed include, but are not limited to, the retroviral LTR; the SV40 promoter; and the human cytomegalovirus (CMV) promoter described in Miller *et al.* (1989) *Biotechniques* 7(9):980-990, or any other promoter (e.g., cellular promoters such as eukaryotic cellular promoters including, but not limited to, the histone, pol III, and β -actin promoters). Other viral promoters which may be employed include, but are not limited to, adenovirus promoters, thymidine kinase (TK) promoters, and B19 parvovirus promoters. The selection of a suitable promoter will be apparent to those skilled in the art from the teachings contained herein.

The nucleic acid sequence encoding the antibody of the present invention is under the control of a suitable promoter. Suitable promoters which may be employed include, but are not limited to, adenoviral promoters, such as the adenoviral major late promoter; or heterologous promoters, such as the cytomegalovirus (CMV) promoter; the respiratory syncytial virus (RSV) promoter; inducible promoters, such as the MMT promoter, the metallothionein promoter; heat shock promoters; the albumin promoter; the ApoA1 promoter; human globin promoters; viral thymidine kinase promoters, such as the Herpes Simplex thymidine kinase promoter; retroviral LTRs (including the modified retroviral LTRs hereinabove described); the β -actin promoter; and human growth hormone promoter.

The retroviral plasmid vector is employed to transduce packaging cell lines to form producer cell lines. Examples of packaging cells which may be transfected include, but are not limited to, the PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X; VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+~~#~~-86, GP+envAm12, and DAN cell lines as described in Miller (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14, which is incorporated herein by reference in its entirety. The vector may transduce the packaging cells through any means known in the art. Such means include, but are not limited to, electroporation, the use of liposomes, and CaPO_4 precipitation. In one alternative, the retroviral plasmid vector may be encapsulated into a liposome, or coupled to a lipid, and then administered to a host. The producer cell line generates infectious retroviral vector particles which include the nucleic acid sequence(s) encoding the polypeptides. Such retroviral vector particles then may be employed, to transduce eukaryotic cells, either *in vitro* or *in vivo*. The transduced eukaryotic cells will express the nucleic acid sequence(s) encoding the polypeptide. Eukaryotic cells which may be transduced include, but are not limited to, embryonic stem cells,

embryonic carcinoma cells, as well as hematopoietic stem cells, hepatocytes, fibroblasts, myoblasts, keratinocytes, endothelial cells, and bronchial epithelial cells.

A different approach to gene therapy is "transkaryotic therapy" wherein the patient's cells are treated *ex vivo* to induce the dormant chromosomal genes to produce the protein of interest after reintroduction to the patient. Transkaryotic therapy assumes the individual has a normal complement of genes necessary for activation. Transkaryotic therapy involves introducing a promoter or other exogenous regulatory sequence capable of activating the nascent genes, into the chromosomal DNA of the patients' cells *ex vivo*, culturing and selecting for active protein-producing cells, and then reintroducing the activated cells into the patient with the intent that they then become fully established. The "gene activated" cells then manufacture the protein of interest for some significant amount of time, perhaps for as long as the life of the patient. U.S. Patent Nos. 5,641,670 and 5,733,761 disclose in detail this concept, and are hereby incorporated by reference in their entirety.

Kits:

This invention further relates to kits for research or diagnostic purposes. Kits typically include one or more containers containing the antibodies of the present invention. In a preferred embodiment, the kits comprise containers containing single chain antibodies in a form suitable for derivatizing with a second molecule. In a more preferred embodiment the kits comprise containers containing the antibody of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.

In another embodiment, the kits may contain DNA sequences encoding the antibodies of the invention. Preferably the DNA sequences encoding these antibodies are provided in a plasmid suitable for transfection into and expression by a host cell. The plasmid may contain a promoter (often an inducible promoter) to regulate expression of the DNA in the host cell. The plasmid may also contain appropriate restriction sites to facilitate the insertion of other DNA sequences into the plasmid to produce various antibodies. The plasmids may also contain numerous other elements to facilitate cloning and expression of the encoded proteins. Such elements are well known to those of skill in the art and include, for example, selectable markers, initiation codons, termination codons, and the like. In a more preferred embodiment the kits comprise containers containing the DNA sequences of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4.

Therapeutic Indications:

Diseases in which thrombus formation play a significant etiological role include myocardial infarction, disseminated intravascular coagulation, deep vein thrombosis, pulmonary embolism, ischaemic stroke, septic shock, acute respiratory distress syndrome, unstable angina and other arterial and venous occlusive conditions. The antibodies of this invention are useful in all of these, as well as in other diseases in which thrombus formation is pathological. Other pathological conditions where the antibody of this invention may be useful include cancer with coagulopathy and inflammation. The antibodies may also find use in skin and vein grafts and organ transplants. By useful it is meant that the antibodies are useful for treatment, either to prevent disease or to prevent its progression to a more severe state. The antibodies of this invention also provide a safe and effective anticoagulant, for example, in patients receiving bioprostheses such as heart valves. These antibodies may replace heparin and warfarin in the treatment of, for example, pulmonary embolism or acute myocardial infarction. The antibodies of this invention may also find use in coating medical devices where coagulation is an issue of concern.

Assays:

A number of laboratory assays for measuring the *in vitro* anticoagulant activity of an antibody of this invention are available. The anticoagulant effect of an antibody can be measured using plasma clotting time assays such as the activated partial thromboplastin time ("APTT"), thrombin clotting time ("TCT") and/or prothrombin time ("PT"). These assays distinguish between different mechanisms of coagulation inhibition, and involve the activation of protein C. Prolongation of the clotting time in any one of these assays demonstrates that the molecule can inhibit coagulation in plasma.

The above assays are used to identify antibodies with anticoagulant activity which are able to bind TF in both purified systems and in a plasma milieu. Further assays are then used to evaluate other activities of the antibodies of the invention, such as inhibition of thrombin catalyzed formation of fibrin from fibrinogen (Jakubowski, H.V. *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 261(8): 3876-3882), inhibition of thrombin activation of factor V (Esmon, C.T. *et al.* (1982). *J. Biol. Chem.* 257(14):7944-7947), accelerated inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II (Esmon, N.L. *et al.* (1983) *J. Biol. Chem.* 258(20):12238-12242), inhibition of thrombin activation of factor XIII (Polgar, J. *et al.* (1987) *Thromb. Haemost.* 58(1):140),

inhibition of thrombin mediated inactivation of protein S (Thompson, E.A. and Salem, H.H. (1986) *J. Clin. Inv.* 78(1):13-17), and inhibition of thrombin mediated platelet activation and aggregation (Esmon, N.L. *et al.* (1983), *supra*).

The following assays, described in detail under Example 4, are used to measure the *in vitro* potency or the *in vitro* binding affinity of the antibodies of the invention: 1) sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay; 2) factor X activation assay; 3) PT assay; and 4) microcalorimetry assay.

In carrying out the procedures of the present invention it is of course to be understood that reference to particular buffers, media, reagents, cells, culture conditions and the like are not intended to be limiting, but are to be read so as to include all related materials that one of ordinary skill in the art would recognize as being of interest or value in the particular context in which that discussion is presented. For example, it is often possible to substitute one buffer system or culture medium for another and still achieve similar, if not identical results. Those of skill in the art will have sufficient knowledge of such systems and methodologies so as to be able, without undue experimentation, to make such substitutions as will optimally serve their purposes in using the methods and procedures disclosed herein.

The present invention will now be further described by the following non-limiting examples as a guide to assist in the practice of the invention. In applying the disclosure of the example it should be kept clearly in mind that other and different embodiments of the methods disclosed according to the present invention will no doubt suggest themselves to those of skill in the relevant art.

In the foregoing and in the following examples, all temperatures are set forth uncorrected in degrees Celsius and, all parts and percentages are by weight, unless otherwise indicated.

The entire disclosure(s) of all applications, patents and publications, cited above are hereby incorporated by reference.

48
49

EXAMPLE 1

Single Chain Anti-TF Antibody Construct scFv(TF)3e10

(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M A Q
V N L R E S G G T L V Q P G G S L R L S C A A S
G F S F T D A W M S W V R Q A P G K E L E W V S
S I S G S G G S T Y Y A G S V K G R F T I S R D
N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
R V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V
S A G G G G S G A P N F M L T Q P H S V S A S P
G K T V T I S C T R S S G S V A S Y Y V Q W Y Q
Q R P G S S P T T V I Y E D N H R P S G V P D R
F S G S I D T S S N S A S L T I S G L K T E D E
A D Y Y C Q S Y D S N N L V V F G G G T K L T V
L G A A A G A P V P Y P D P L E P R A A (264)

The single chain anti-TF antibody scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO:1) consists of a signal peptide (-18 to -1), V_H domain (1 to 126), V_H-V_L linker (127 to 131), V_L domain (132 to 246), and e-tag sequence (247 to 264). The scFv(TF)3e10 DNA sequence (SEQ ID NO:2) encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

EXAMPLE 2

Single Chain Anti-TF Antibody Construct scFv(TF)3e10Δ

(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M A Q
V N L R E S G G T L V Q P G G S L R L S C A A S
G F S F T D A W M S W V R Q A P G K E L E W V S
S I S G S G G S T Y Y A G S V K G R F T I S R D
N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
R V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V
S A G G G G S N F M L T Q P H S V S A S P G K T
V T I S C T R S S G S V A S Y Y V Q W Y Q Q R P
G S S P T T V I Y E D N H R P S G V P D R F S G
S I D T S S N S A S L T I S G L K T E D E A D Y

49
SO

- 33 -

Y C Q S Y D S N N L V V F G G G T K L T V L G A
A A G A P V P Y P D P L E P R A A (243)

The single chain anti-TF antibody scFv(TF)3e10Δ (SEQ ID NO:3) consists of a signal peptide (-18 to -1), V_H domain (1 to 126), V_H-V_L linker (127 to 131), and V_L domain (132 to 243). scFv(TF)3e10Δ differs from scFv(TF)3e10 by deletion of 3 amino acids (GAP) at the N-terminus of the V_L domain and by deletion of the C-terminal e-tag sequence. The scFv(TF)3e10Δ DNA sequence (SEQ ID NO:4) encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

EXAMPLE 3

Expression of the Anti-TF Antibodies in Bacterial and Mammalian Cells

Six different single chain antibodies, scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6, scFv(TF)3e10 and scFv(TF)3h2, were identified from TF-binding phage, over-expressed in *E. coli*, and affinity purified using an e-tag affinity column as described above. The affinities of the six purified antibodies for sTF were measured using BIAcore, and then these antibodies were characterized in the sTF/FVIIa peptide hydrolysis, FX activation, PT, and microcalorimetry assays described under Example 4, the results of which are described under Example 5.

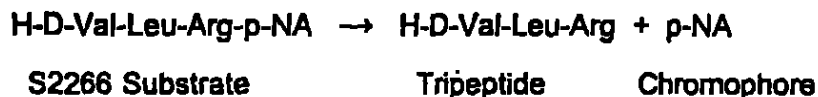
The scFv(TF)3e10 antibody (SEQ ID NO: 1) was also expressed in CHO cells. The expression plasmid contained the DNA sequence encoding scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO:2) and both the hygromycin B and DHFR selection markers. Original selection was done in 400 μg/ml hygromycin to select a population. The resulting population was then subjected to 100 nM methotrexate selection. During this selection, cells that have amplified copies of the region of DNA containing the selection marker, and target gene, are selected from amongst the population. The expression levels were increased from approximately 0.3 mg/L to about 6 mg/L as a result of this selection.

EXAMPLE 4

In Vitro Potency and Binding Affinity Assays

1. sTF/FVIIa Peptide Hydrolysis Assay

The principle of this assay is depicted below. The tripeptide p-nitroanilide amide bond of the substrate is hydrolyzed by the sTF/FVIIa complex. The liberated chromophore product, p-nitroanilide, is monitored at 405 nm and the concentration of product formed per unit time is calculated using a molar extinction coefficient of $9920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IC_{50} values (C) are determined by fitting the initial rates into the 4 parameter equation: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$



Reagents and solutions:

1. Assay buffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5mM CaCl_2 , 0.1% BSA, pH7.5
2. Human FVIIa (HCVIIA-0060, Haematologic Technologies Inc.): 10 x working solution- prepare 20 nM solution in assay buffer prior to use.
3. Soluble TF (Berlex): 10 x working solution- prepare 30 nM solution in assay buffer prior to use.
4. Chromogenic substrate S2266 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.): Stock solution: 10 mM in H_2O , stored at 4 C. 2.5 x working solution- prepare 2.5 mM solution in assay buffer prior to use.
5. Antibody: Prepare 2.5x dilutions in assay buffer prior to use.

Assay Conditions:

Assays are performed in a 96-well microtiter plate at room temperature. The final concentrations of the components are as follows:

sTF	3 nM
Antibody	vary from 1000 to 0.625 nM
FVIIa	2 nM
S2266	1 mM

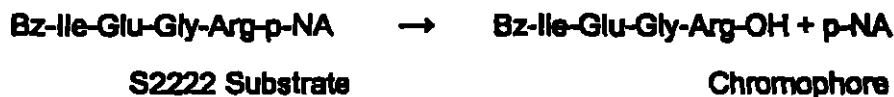
Assay Procedure:

1. Pipette 0.1 ml of 2.5x AB (or buffer control) into each well.
2. Add 0.025 ml 10x sTF and incubate 10 min at room temperature with mild shaking.
3. Add 0.025 ml 10x FVIIa, incubate 10 min at room temperature with mild shaking.
4. Add 0.1 ml 2.5x S2266 substrate, immediately transfer the plate into a plate reader and measure enzyme kinetics at 405 nm at 10 seconds interval for 15 min.

This assay may be used to measure an apparent K_D of binding of the antibodies of the invention to sTF or the FVIIa/TF complex, and to determine whether the antibodies of the invention compete with FVII for binding to TF.

2. Factor X Activation Assay

The principle of this assay is depicted below. FVIIa is incubated with recombinant human TF vesicles to form a protease complex capable of activating the substrate, FX. This complex is formed in the presence (or absence) of different concentrations of antibody, then the substrate FX is introduced and the reaction is allowed to proceed to form the product, active protease FXa, which is capable of hydrolyzing the p-nitroanilide amide bond of the chromogenic substrate S2222. The liberated chromophore product, p-nitroanilide, is monitored at 405 nm and the concentration of product formed per unit time is calculated using a molar extinction coefficient of $9920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IC_{50} values (C) are determined by fitting the initial rates into the 4-parameter equation: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$



Reagents and solutions:

1. Assay buffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5mM CaCl_2 , 0.1% BSA, pH7.5
2. Human FVIIa (HCVIIA-0031, Haematologic Technologies Inc.): 4 x working solution-prepare 100 pM solution in assay buffer prior to use.
3. Recombinant Human TF (reconstituted in our lab from Innovin, Dade): working solution-prepare 1:480 dilution in assay buffer prior to use.
4. Human factor X (HCX-0060, Haematologic Technologies Inc.): 4 x working solution-prepare 1000 nM solution in assay buffer prior to use.
5. Chromogenic substrate S2222 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.):
 Stock solution: 6 mM in H_2O , stored at 4 C.
 Working solution- prepare 0.78 mM solution in 3.57 mM EDTA (to stop the reaction), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 prior to use.
6. Antibody:
 Prepare 4x dilutions in assay buffer prior to use.

Assay Conditions:

Assays are performed in a 96-well microtiter plate at room temperature. The final concentrations of the components are as follows:

rTF vesicles	¼ of 1:480 dilution
Antibody	vary from 1000 to 0.625 nM
FVIIa	25 pM
FX	250 nM
S2222	0.546 mM

Assay Procedure:

1. Pipette 0.015 ml of 4xAB (or buffer control) into each well.
2. Add 0.015 ml 4x rTF vesicles.
3. Add 0.015 ml 4x FVIIa, incubate 10 min at room temperature with mild shaking.
4. Add 0.015 ml 4x FX, incubate 5 min at room temperature with mild shaking.
5. Add 0.14 ml S2222 substrate, immediately transfer the plate into a plate reader and measure enzyme kinetics at 405 nm at 10 seconds interval for 15 minutes.

This assay may be used to determine whether the antibodies of the invention inhibit the FVIIa/TF complex to activate FX, and to determine whether the antibodies of the invention compete with FX for binding to the FVIIa/TF complex.

3. Prothrombin Time (PT) Assay

For the standard PT reaction, 90 µl of an appropriate concentration of the antibody or PBS is added to 20 µl Thromboplastin IS (Dade) and 90 µl of 25 mM CaCl₂ in a cuvette. The mixture is incubated for 1 min at 37°C, then 100 µl of citrated plasma (Helena Laboratories). Alternatively, an appropriate volume of concentrated antibody is added to 100 µl of recombinant human thromboplastin (Ortho Recombiplastin) and approximately 2 min later, 100 µl reconstituted human plasma is added. Clotting time for each individual coagulation assay is measured by taking the average of two measurements using an Electra 900C Coagulometer (Hemollance) and the average values determined from replicate assays (n = 3 or 4). Dose response curves were generated for each inhibitor and then regression analysis was used to calculate the concentration (ln nM) necessary for a two-fold extension of the clotting time.

53
84

This assay may be used to evaluate the effect of the antibodies of the invention on the extrinsic blood coagulation pathway. The amount of antibody required to double the PT is determined, and may be compared to other anticoagulants to assess the relative potency of the antibodies of the invention.

4. Microcalorimetry Assay

The microcalorimetry (isothermal titration calorimetry) assay is used to measure the binding affinity (K_D) of the antibodies of the invention to TF alone or the FVIIa/TF complex. This assay is performed using a MicroCal VP-ITC instrument. The FVIIa/TF complex is preformed by adding a 2.3 fold molar excess of FVIIa to sTF. Size exclusion chromatography is used to verify that the sTF in the assay is completely complexed. For determination of the antibody affinity for the complex, 1.2 μ M VIIa/TF complex is added to the microcalorimeter cell and 65 μ M antibody is added to the syringe. For determination of the antibody affinity for sTF alone, 10 μ M sTF is added to the cell and 141 μ M antibody is added to the syringe. Data analysis is performed using MicroCal Origin software. The data is fit to a single binding site.

EXAMPLE 5

In Vitro Characteristics of the Anti-TF Antibodies of this Invention

Six different TF-binding antibodies were isolated from a fully human single chain antibody phage display library: scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6, scFv(TF)3e10 and scFv(TF)3h2. The affinities of these sTF-binding antibodies, expressed in *E. coli*, as measured using the BIAcore, were between 35 and 470 nM. The sTF/VIIa peptide hydrolysis assay described under Example 4 was used to determine if these antibodies blocked the formation of an active VIIa/TF complex. In this assay, binding of VIIa to sTF accelerates the rate of cleavage against the chromogenic peptide substrate S2266 by >20-fold. Antibodies that inhibit binding of FVIIa to TF block this acceleration. Five of the single chain antibodies, scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6, and scFv(TF)3h2, inhibited S2266 hydrolysis, suggesting that they inhibit FVIIa binding to sTF (Figure 1). In contrast, the single chain antibody scFv(TF)3e10 did not inhibit the sTF/VIIa peptide hydrolysis assay and, in fact, this antibody increased the rate of S2266 hydrolysis, suggesting that scFv(TF)3e10 increases the affinity of sTF for FVIIa. Using the sTF/VIIa peptide hydrolysis assay, the scFv(TF)3e10 antibody increased the affinity of FVIIa for sTF, decreasing the K_D apparent 5-fold (Figure 2).

scFv(TF)3e10 did not affect the rate of hydrolysis by FVIIa in the absence of sTF, indicating that this antibody does not interact with FVIIa alone. The K_D of the scFv(TF)3e10 antibody for sTF, measured using the sTF/FVIIa peptide hydrolysis assay, was 65.4 nM (Figure 4). A microcalorimetry assay was used to compare the affinity of scFv(TF)3e10 for TF as compared to the FVIIa/TF complex. These experiments revealed that mammalian cell expressed scFv(TF)3e10 has a ~20-fold higher affinity for the TF/FVIIa complex as compared to free sTF (33 nM vs. 600 nM, Figure 5).

The six TF-binding single chain antibodies, expressed in bacteria, were compared using the FX activation assay and the PT assay. None of the five antibodies that inhibited the rate of S2266 hydrolysis by the sTF/FVIIa complex, scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6, and scFv(TF)3h2, extended the PT beyond the PBS buffer control (Figure 3). In contrast, although the scFv(TF)3e10 antibody did not have the highest affinity as measured by BIAcore, and it increased the affinity of FVIIa for sTF, scFv(TF)3e10 was the only antibody in the group that inhibited FX activation (Figure 6 and data not shown) and prolonged clotting time in the PT assay (Figure 3). The IC_{50} of the scFv(TF)3e10 (dimer) antibody for inhibition in the FX activation assay was 0.44 nM (Figure 6). Finally, the FX activation assay was used to determine whether the scFv(TF)3e10 antibody competes with FX for binding to the FVIIa/TF complex. scFv(TF)3e10 dose dependently inhibited FX activation with the same $K_D(app)$ at all concentrations of the substrate FX, indicating that scFv(TF)3e10 is noncompetitive with FX and does not bind to TF or to the FVIIa/TF complex at the same site as FX (Figure 7).

The scFv(TF)3e10 antibody was identified on the basis of binding to recombinant human soluble TF. The sequence homology of TF between the human and murine or human and rabbit is 58% and 71%, respectively. The antibody appears to bind to a unique epitope on human TF that interferes with activation of FX by the FVIIa/TF complex. Physiologically, this antibody has an advantage over antibodies that compete with FVII or FVIIa binding to TF. The K_D of FVIIa for soluble TF is ~10 nM (Figure 2), a value that is consistent with published values for the binding of FVIIa to sTF (4.8 nM, Neuenschwander, P. F. and Morrissey, J. H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(11):8007-8013) or the binding of FVII, FVIIa and DIP inactivated-FVIIa to full length TF reconstituted in neutral phosphatidylcholine vesicles (Bach R. *et al.* (1986) *Biochemistry* 25:4007-4020). The affinity of FVII or FVIIa binding to full length TF increases greatly when charged phosphatidyl serine is included in the phospholipid vesicles (Bach R. *et*

85
Sp

et al. (1986) *supra*), due to the interaction of the GLA domain of FVII or FVIIa with the charged membrane surface (Neuenschwander, P. F. and Morrissey, J. H. (1994) *supra*). Under these optimal conditions, the FVIIa binds to full length TF with a very high affinity (41 pM). A TF antibody that competes with FVII or FVIIa binding will have difficulty competing for this high affinity FVIIa/TF complex. In contrast, the scFv(TF)3e10 antibody not only has greater affinity for the FVIIa/TF complex than to TF, but it does not compete with FVIIa for binding to TF. An antibody such as scFv(TF)3e10, which does not compete with FVIIa, will inhibit the activation of FX independent of the plasma concentration of FVII, which is ~10 nM.

The scFv(TF)3e10 antibody also has an advantage over antibodies that compete with FX for binding to TF. The K_m of FX for the VIIa/TF complex is between 0.061 and 0.099 μ M based on the data shown in Figure 7, consistent with published values (0.1 μ M, Baugh, R. J. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275(37):28826-28833). The concentration of FX in human plasma is 140 nM (1.4 to 2-fold K_m). An antibody such as scFv(TF)3e10, which does not compete with FX as shown in Figure 7, will inhibit the activation of FX independent of the plasma concentration of FX.

EXAMPLE 6

In vivo Rat Thromboembolism Model

The TF-binding single chain antibody scFv(TF)3e10 is specific for primate TF. A thromboembolism model triggered by human TF (thromboplastin reagent containing human recombinant TF, Ortho) was developed in conscious male Sprague-Dawley rats (350 – 400 g, $n > 7$ /group). In this model of disseminated intravascular coagulation (DIC), TF, via thromboplastin injection, induces pulmonary fibrin deposition, respiratory failure, and death. Doses of mammalian cell expressed scFv(TF)3e10 or vehicle were injected into the tail vein followed, 15 min later, by a bolus injection of thromboplastin (0.5 ml/kg). In the vehicle treated group, this dose of TF resulted in 60% lethality (LD_{60}), usually within 5 min after thromboplastin injection. The rats were scored according to the following morbidity-mortality scoring system: 0 = unaffected; 1 = mild respiratory distress (recover within 30 min); 2 = severe respiratory distress (moribund, recovery required more than 60 min); and 3 = death. The average score was used for comparing the efficacy of the different treatment groups. The results using this *in*

vivo assay are depicted in Figure 8. The antibody of the invention was able to reduce mortality and reduce respiratory distress in this assay.

The preceding examples can be repeated with similar success by substituting the generically or specifically described reactants and/or operating conditions of this invention for those used in the preceding examples.

While the invention has been illustrated with respect to the production of certain antibody constructs, it is apparent that variations and modifications of the invention can be made without departing from the spirit or scope of the invention.

What is claimed is:

1. An anticoagulant antibody that binds with greater affinity to the factor VIIa/tissue factor (FVIIa/TF) complex than to tissue factor (TF) alone.
2. The antibody of Claim 1, wherein said antibody binds with at least 2-fold greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone as measured in a microcalorimetry assay.
3. The antibody of Claim 2, wherein said antibody binds with at least 5-fold greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone.
4. The antibody of Claim 3, wherein said antibody binds with at least 10-fold greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone.
5. The antibody of Claim 1, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
6. The antibody of Claim 5, wherein said antibody is a single chain antibody, a Fab dimer antibody or an IgG antibody.
7. The antibody of Claim 6, wherein said antibody is a single chain antibody.
8. The antibody of Claim 7, wherein said antibody does not compete for binding to TF with one or more of the coagulation factors selected from the group consisting of factor VII (FVII), factor IX (FIX), and factor X (FX).
9. The antibody of Claim 8, wherein said coagulation factors are FVII and FX.
10. The antibody of Claim 1, wherein said antibody is glycosylated.
11. The antibody of Claim 1, wherein said antibody is modified by the addition of polyethylene glycol.
12. The antibody of Claim 1, wherein said antibody is biotinylated for binding streptavidin.

13. A pharmaceutical composition, comprising the antibody of Claim 1, which composition comprises a pharmaceutically acceptable excipient and a therapeutically effective amount of said antibody.
14. A method for protecting against thrombus formation, comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody of Claim 1, wherein said antibody inhibits the generation of thrombin without directly affecting other coagulation parameters such as the activation and aggregation of platelets.
15. The method of Claim 14, wherein said method is to protect against thrombus formation in ischaemic stroke, thrombotic complications following angioplasty, or microvascular surgery.
16. A method for reducing and treating deep vein thrombosis (DVT), disseminated intravascular coagulation (DIC), acute coronary syndrome, or cancer with evidence of coagulopathy in a patient, comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody of Claim 1 to said patient.
17. A method for regulating the inflammatory response in a patient, comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody of Claim 1 to said patient.
18. The method of Claim 17, wherein said inflammatory response is selected from the group consisting of sepsis, skin and vein grafts, and organ transplants.
19. The antibody of Claim 1, wherein said antibody can be used to form a non-thrombogenic coating on the surface of a medical device, wherein said medical device comes in contact with blood.
20. A kit, comprising the antibody of Claim 1.
21. A kit, comprising DNA sequences encoding the antibody of Claim 1.

22. A gene therapy composition, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, which encodes the antibody consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, in combination with a therapeutically effective amount of a gene therapy vector.
23. An anticoagulant antibody, wherein said antibody is a single chain antibody that binds with greater affinity to the FVIIa/TF complex than to TF alone and wherein said antibody does not compete for binding to TF with FVII and FX.
24. The antibody of Claim 23, wherein said antibody comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.
25. A polynucleotide sequence encoding the antibody of Claim 23, wherein said polynucleotide sequence comprises the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4.

SEQUENCE LISTING

<110> Light, David
McLean, Kirk

<120> Novel Tissue Factor Targeted Antibodies as Anticoagulants

<130> 52295AWOM2

<150> US 60/376,566

<151> 2002-05-01

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of scFv(TF)3e10 antibody

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

2/5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
165 170 175

Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
180 185 190

Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
195 200 205

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
210 215 220

Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro
260 265 270

Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala
275 280

<210> 2
<211> 849
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence encoding scFv(TF) 3e10 antibody

<400> 2
atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggcag gcctggctct ccccgagatg 60
gccaggtca acttaaggga gtctggggga accttggtcc agcctggggg gtccctgaga 120
ctctcctgtg cagcctctgg attcagtttc actgacgcct ggatgagctg ggtccgccag 180
gctccaggga aggagctgga gtgggtctca agtattagtg gtagtggtgg aagcacatac 240
tacgcaggct ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 300
tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgagagta 360
ttatcgctga ccgattacta ctggtacggc atggacgtct ggggccaagg caccctggtc 420
accgtctcgg ccggtggcgg cggatctggc ggcgcaaatt ttatgctgac tcagccccac 480
tctgtgtcgg cgtctccggg gaagacggta accatctcct gcaccgcag cagtggcagc 540

gttgccagct actatgtgca gtggtaccag cagcgcccgg gcagttcccc caccactgtg 600
 atctatgagg ataaccacag accctctggg gtccttgatc gggtctctgg ctccatcgac 660
 acctcctcca actctgcctc cctcaccatc tctggactga agactgagga cgaggctgac 720
 tactactgtc agtcttatga tagcaacaac cttgtggttt tcggcggagg gaccaagctg 780
 accgtcctag gtgcggccgc aggagctccg gtgccggatc cggatccgct ggaaccgcgt 840
 gccgcatga 849

<210> 3
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of scFv(TF)3e10delta antibody

<400> 3
 Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
 1 5 10 15
 Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60
 Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
 115 120 125
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser
 145 150 155 160

Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly
 165 170 175

Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser
 180 185 190

Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro Ser Gly Val
 195 200 205

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser
 210 215 220

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly
 260

<210> 4

<211> 783

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence encoding scFv(TF)3e10delta antibody

<400> 4

atgcttgggg tcttggtcct tggcgcgctg gccctggcag gcctgggtcct ccccgagatg 60

gcccaggtca acttaagggg gtctggggga accttggtcc agcctggggg gtccttgaga 120

ctctcctgtg cagcctctgg attcagtttc actgacgcct ggatgagctg ggtccgccag 180

gctccagggg aggagctgga gtgggtctca agtattagtg gtagtgggtg aagcacatac 240

tacgcaggct ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 300

tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgagagta 360

ttatcgctga ccgattacta ctggtacggc atggacgtct ggggcccaagg caccctggtc 420

accgtctcgg ccggtggcgg cggatctaata tttatgctga ctacagccca ctctgtgtcg 480

gcgtctccgg ggaagacggt aaccatctcc tgcacccgca gcagtggcag cgttgccagc 540

tactatgtgc agtggtacca gcagcgcccg ggcagttccc ccaccactgt gatctatgag 600

gataaccaca gaccctctgg ggtccctgat cggttctctg gctccatcga cacctcctcc 660

64
65

aactctgcct cctcaccat ctctggactg aagactgagg acgaggctga ctactactat 720

cagtcttatg atagcaacaa ccttgtggtt ttccggcggag ggaccaagct gaccgtccta 780

ggt 783

FIGURE 1

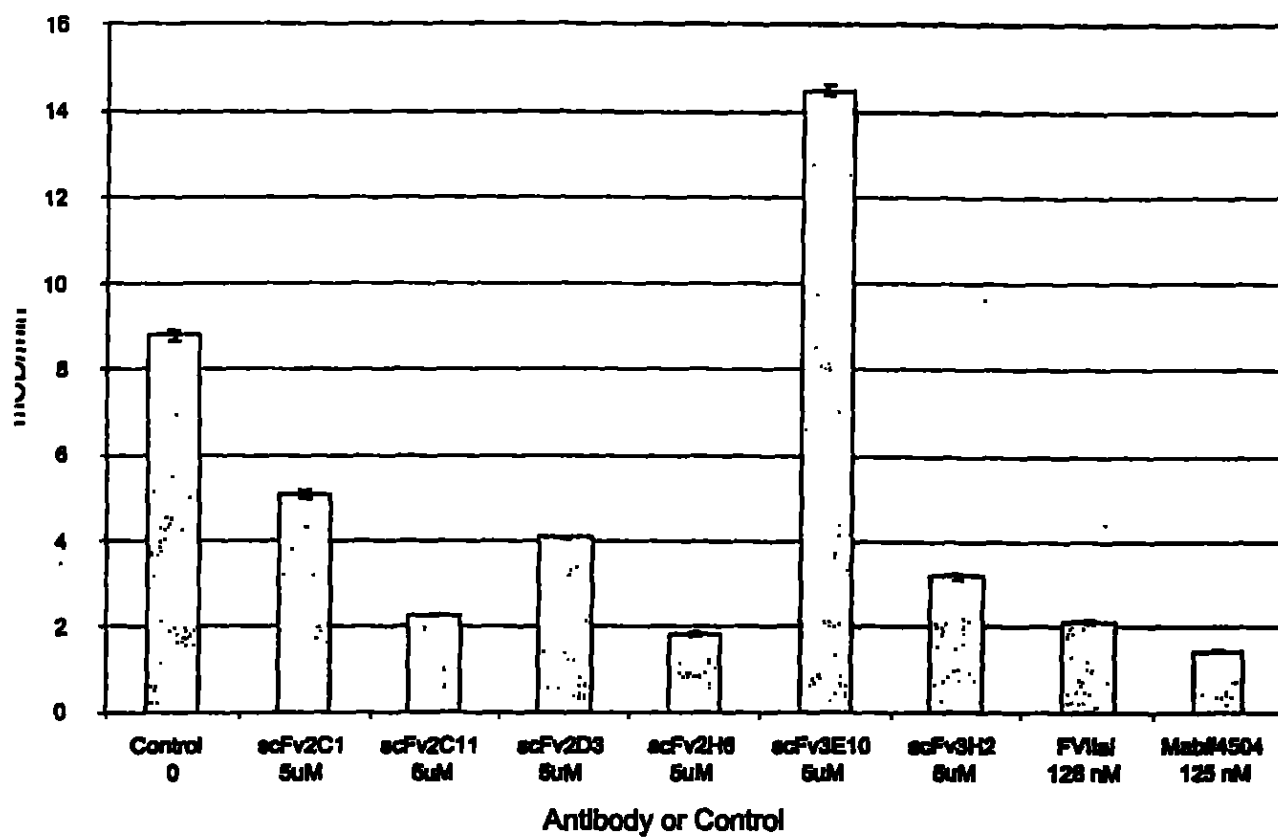


FIGURE 2

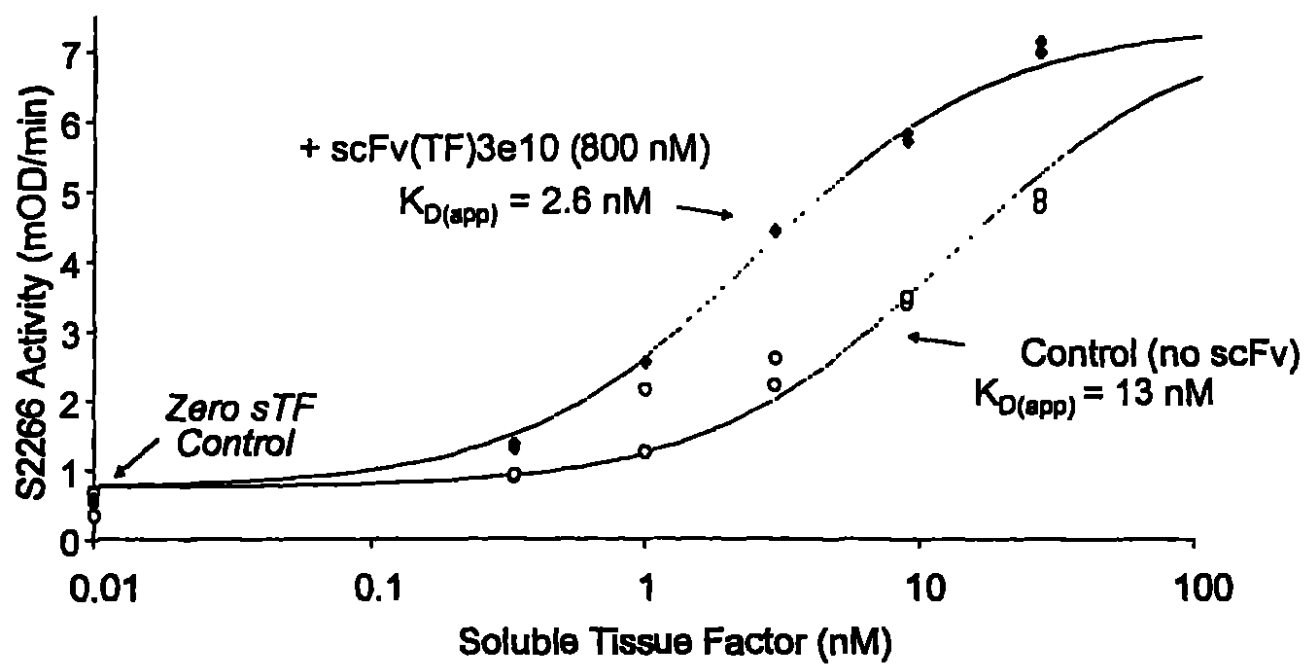


FIGURE 3

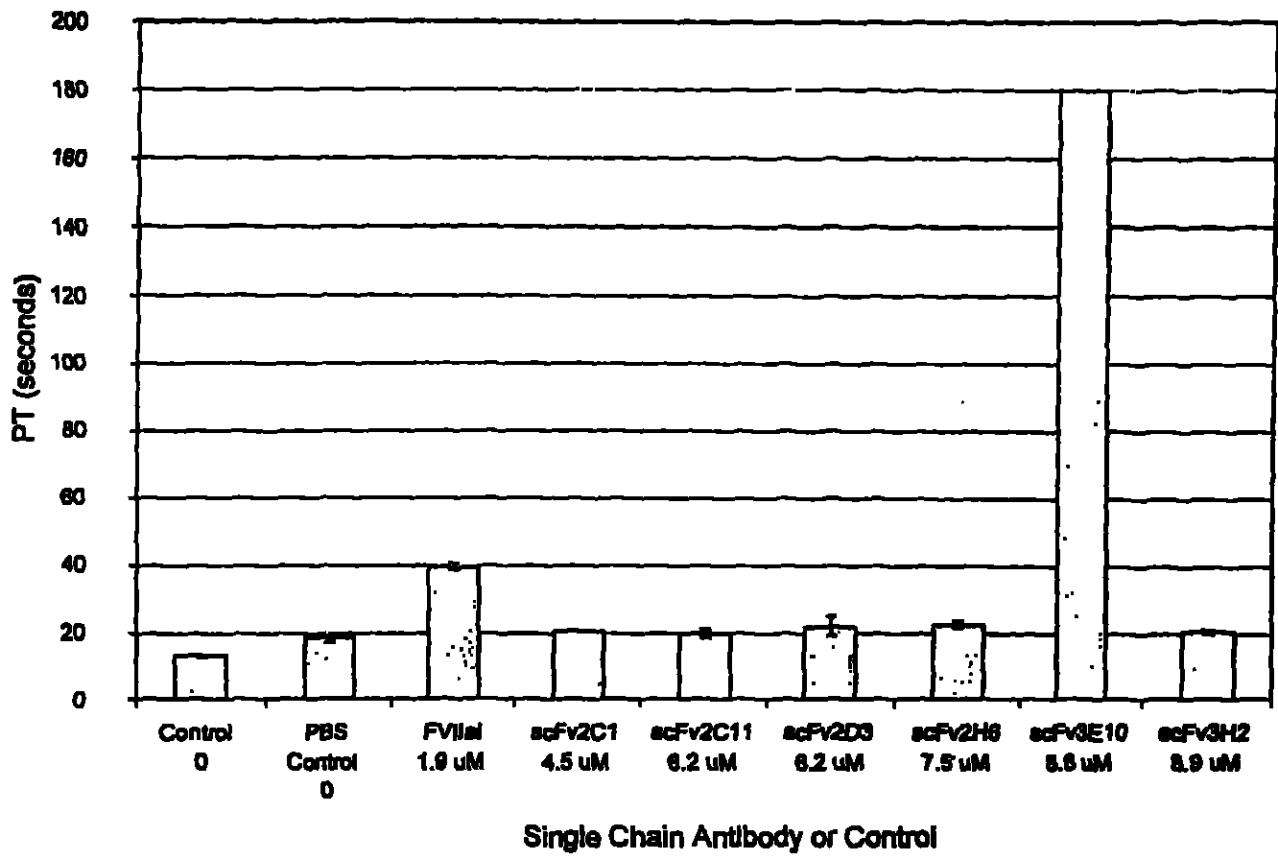


FIGURE 4

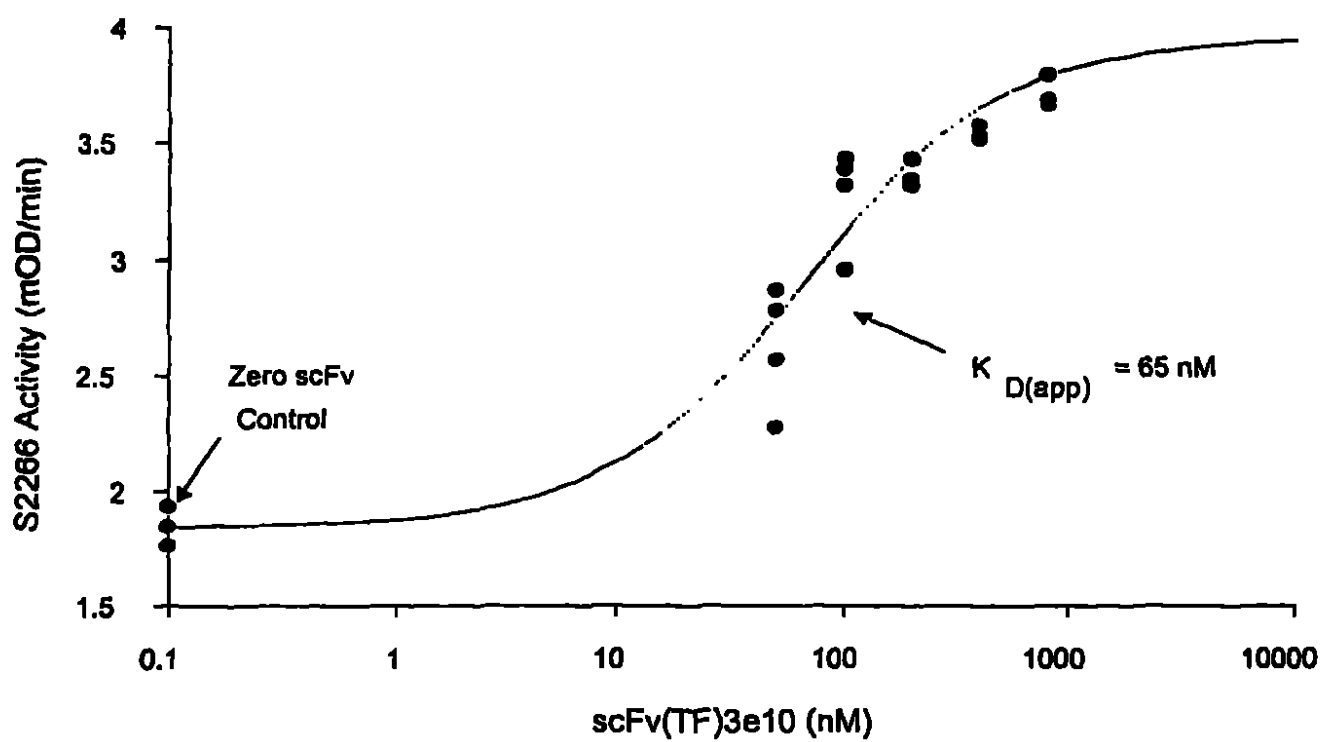
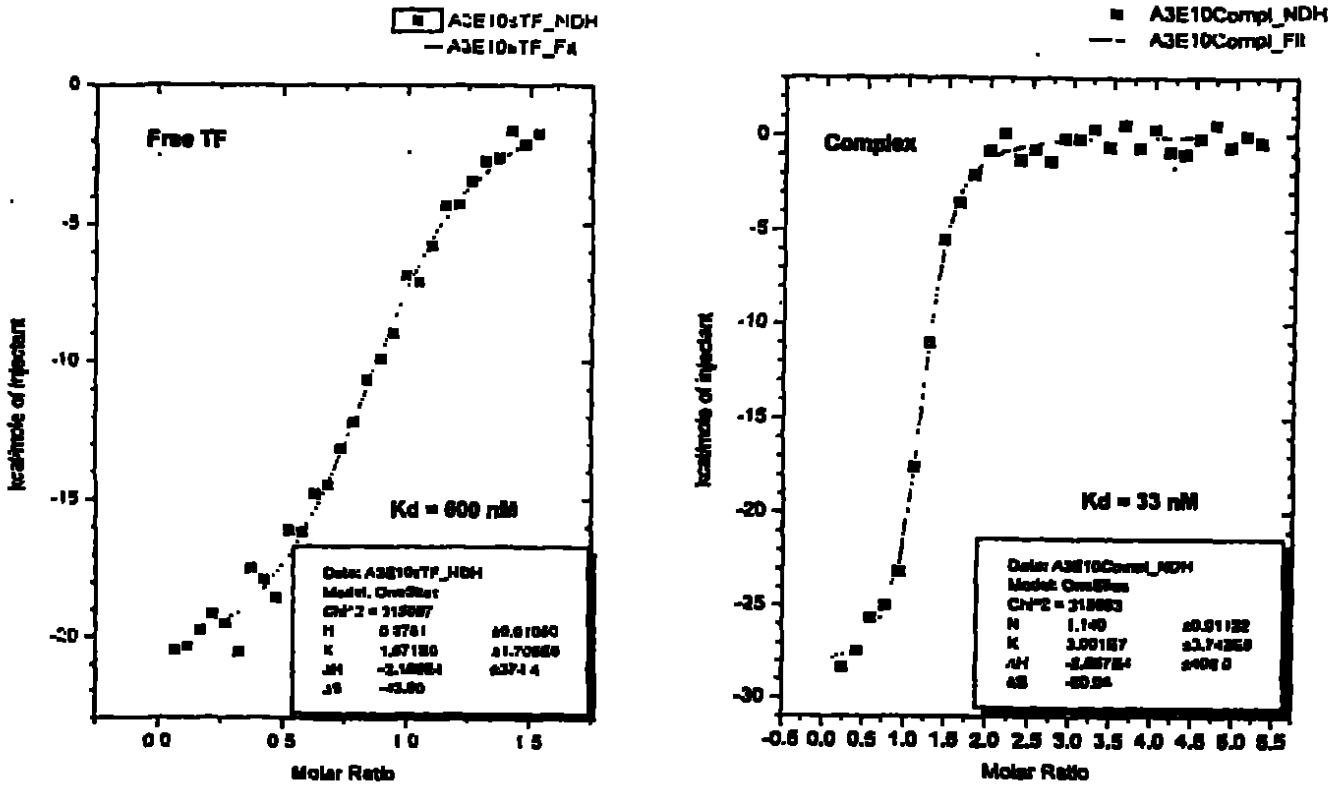


FIGURE 5



70
71

FIGURE 6

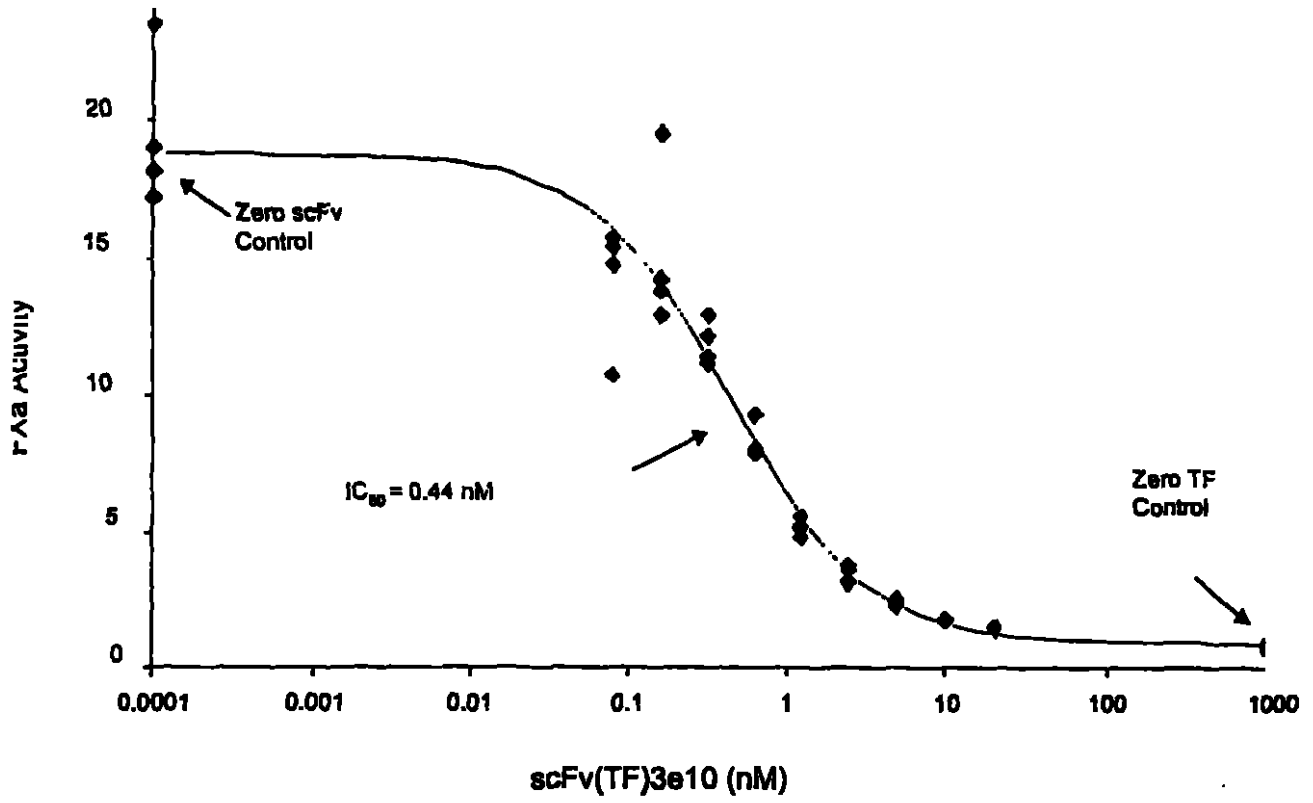
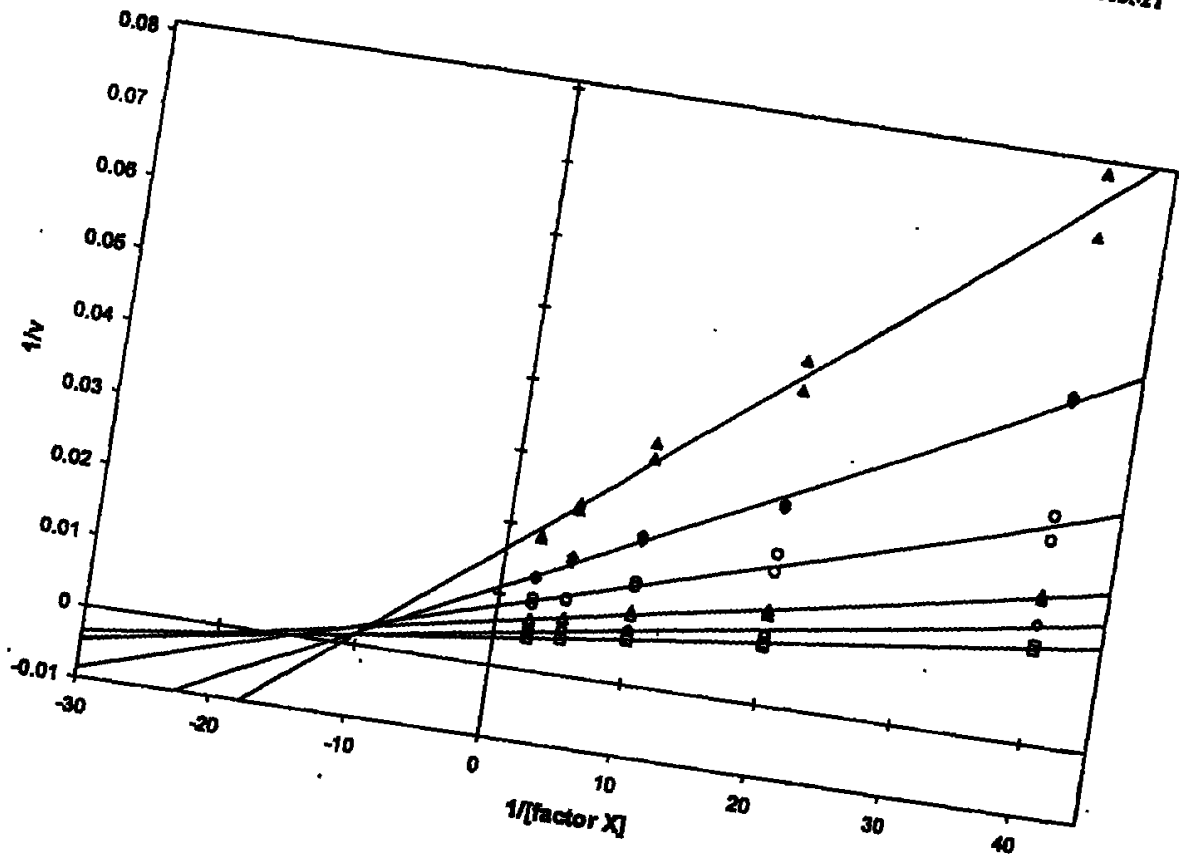


FIGURE 7

71
72



72
73

FIGURE 8

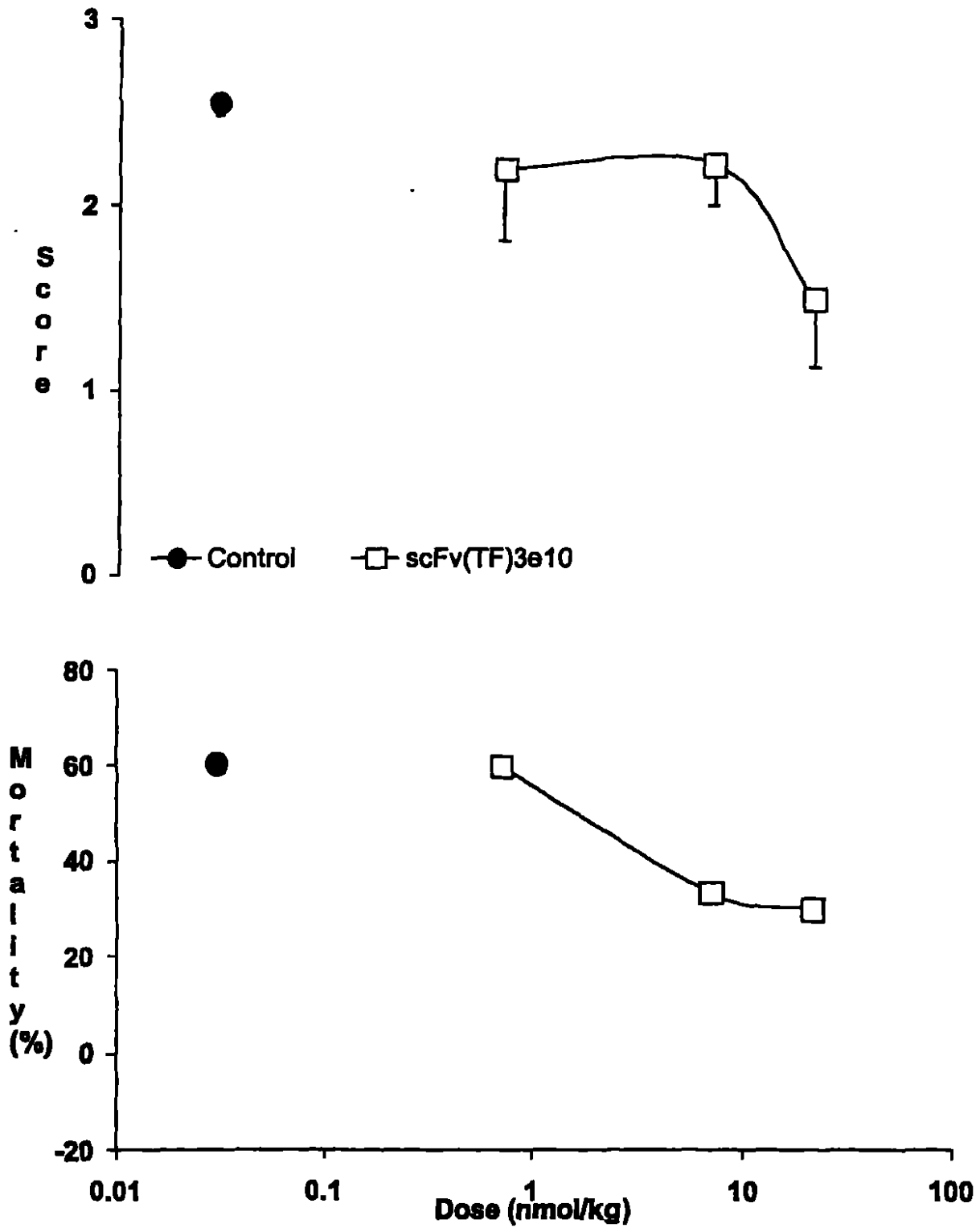
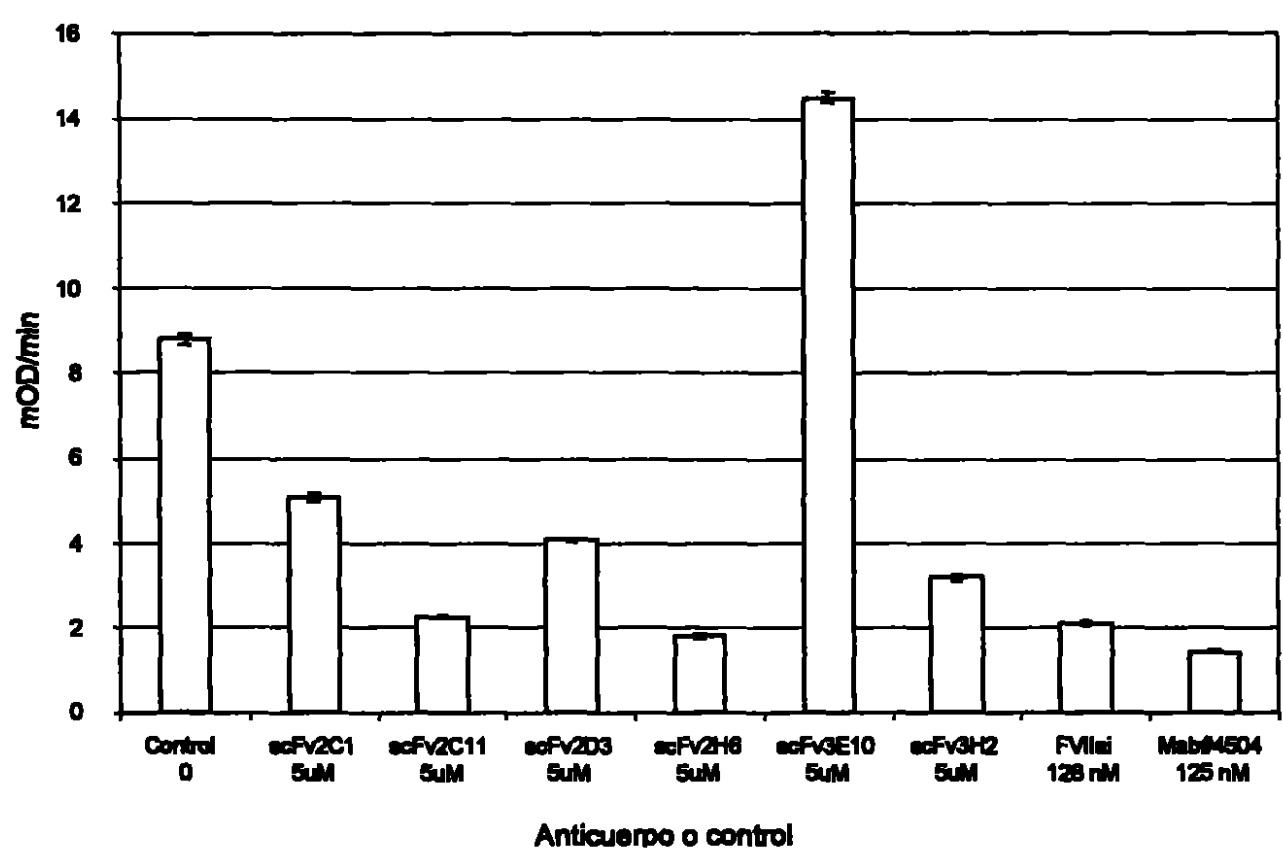


Figura 1.



74
75

Figura 2.

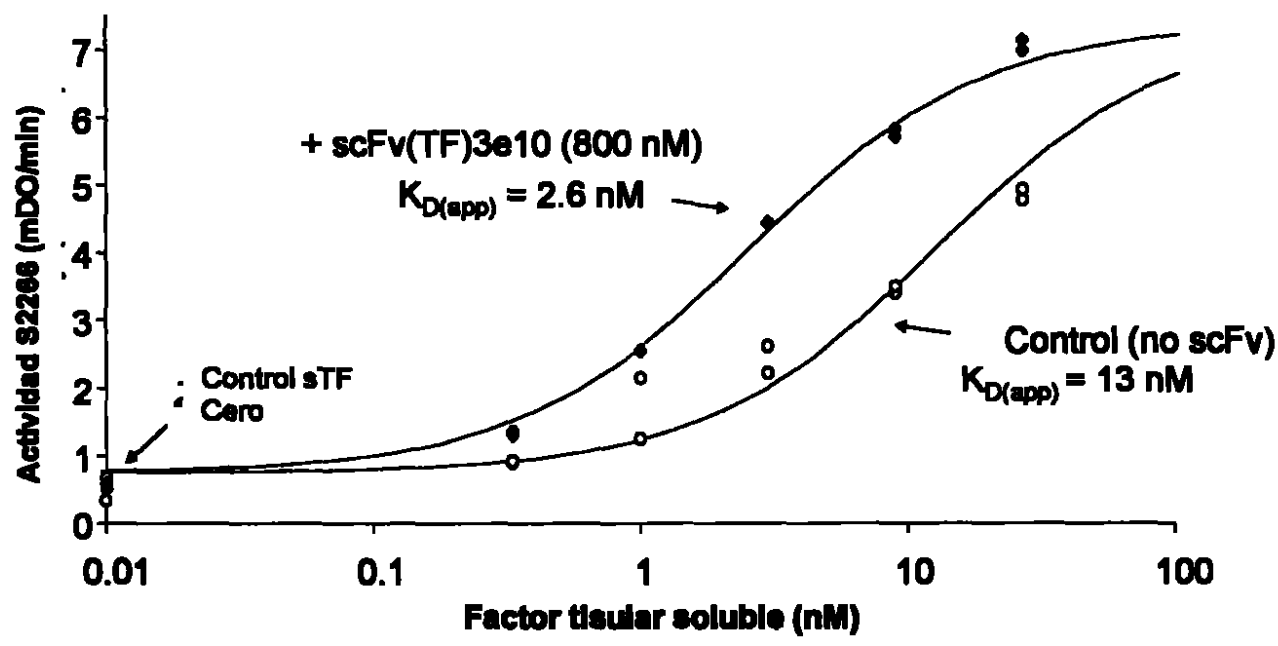
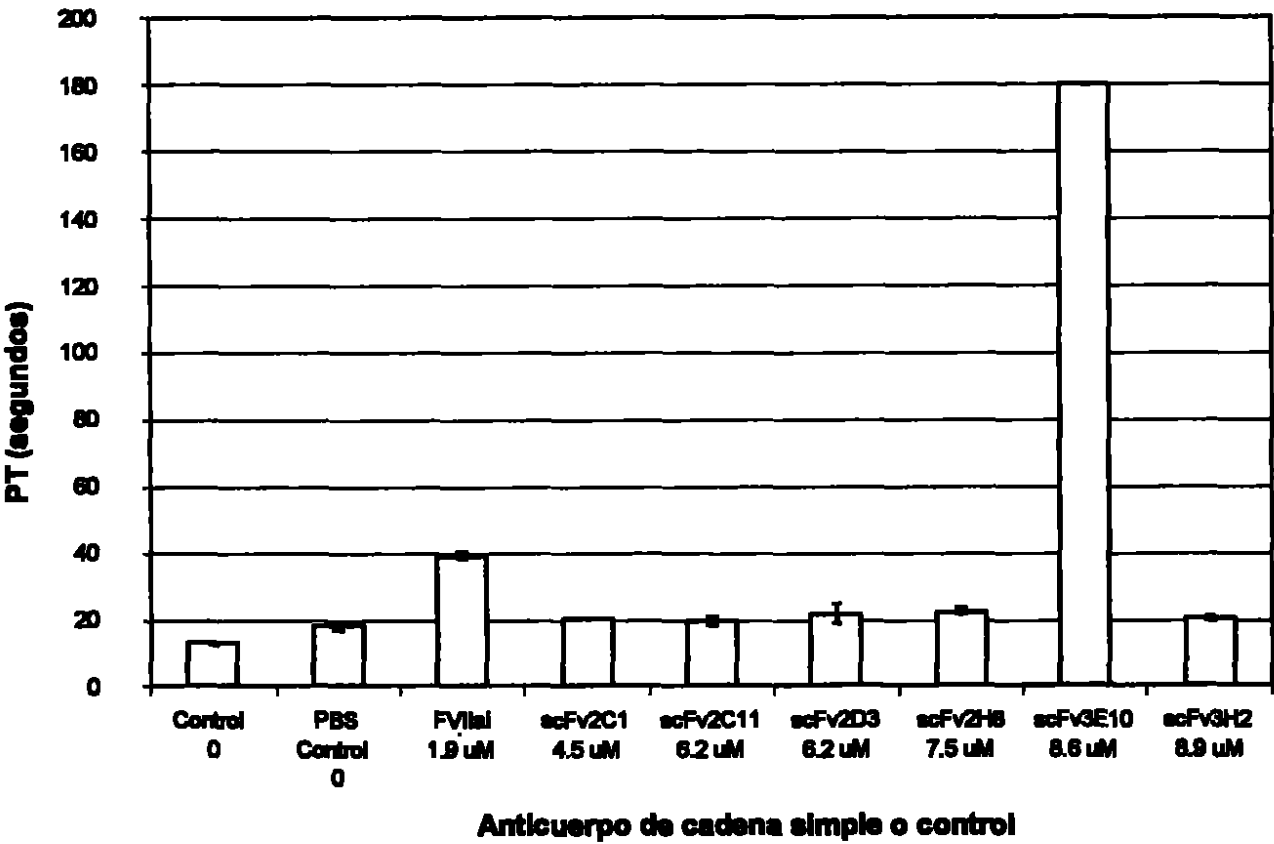


Figura 3.



56
77

Figura 4.

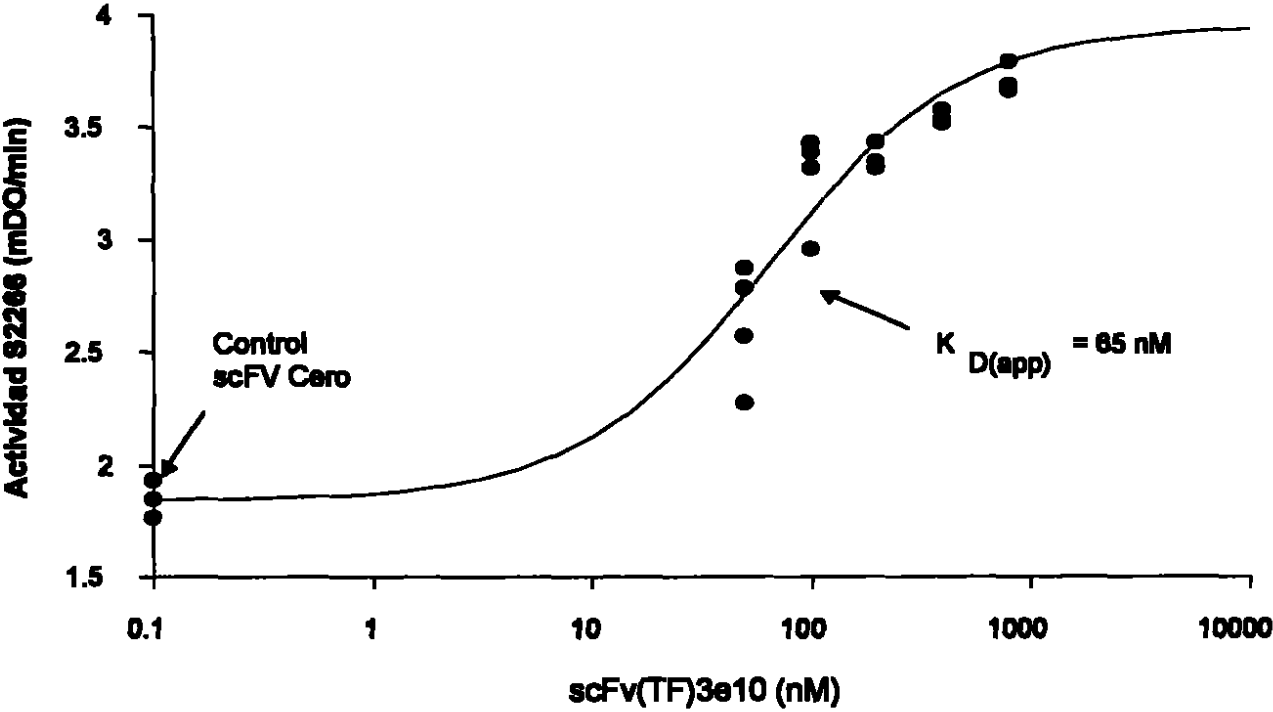


Figura 5.

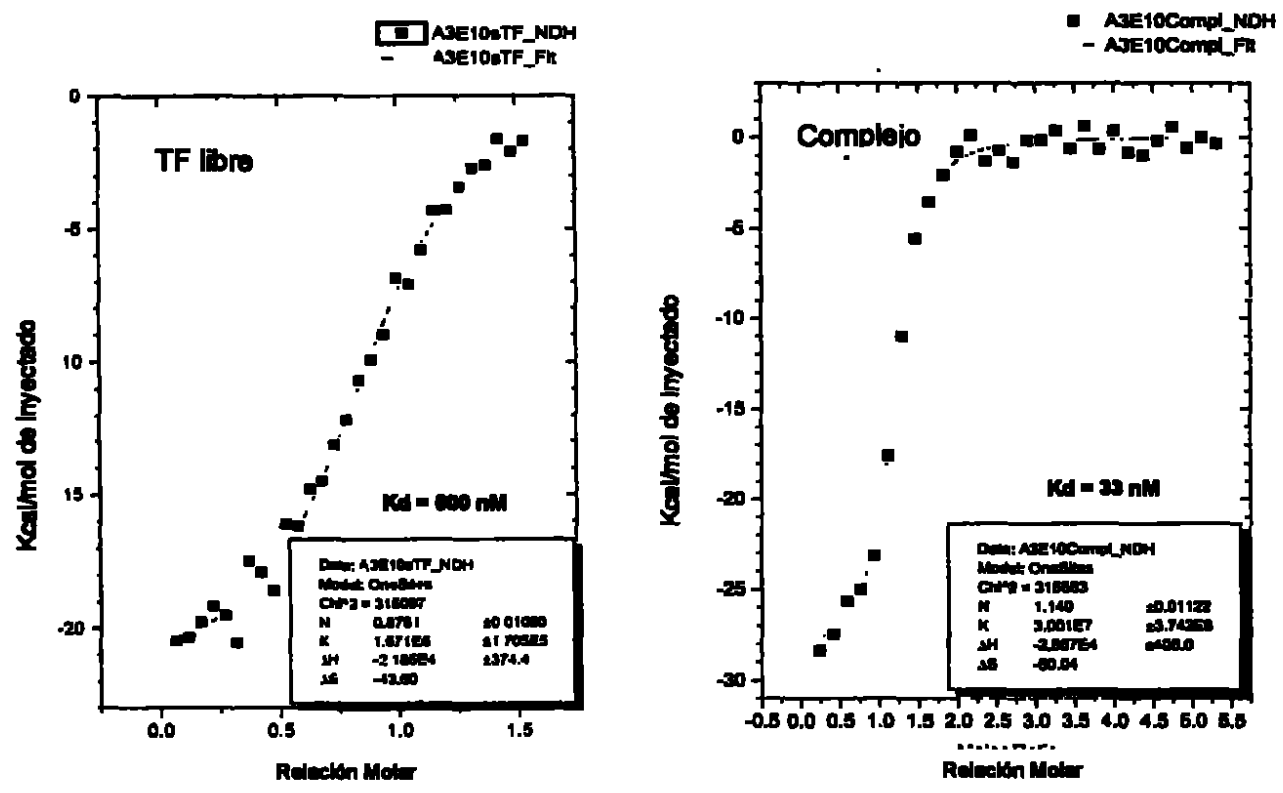


Figura 6.

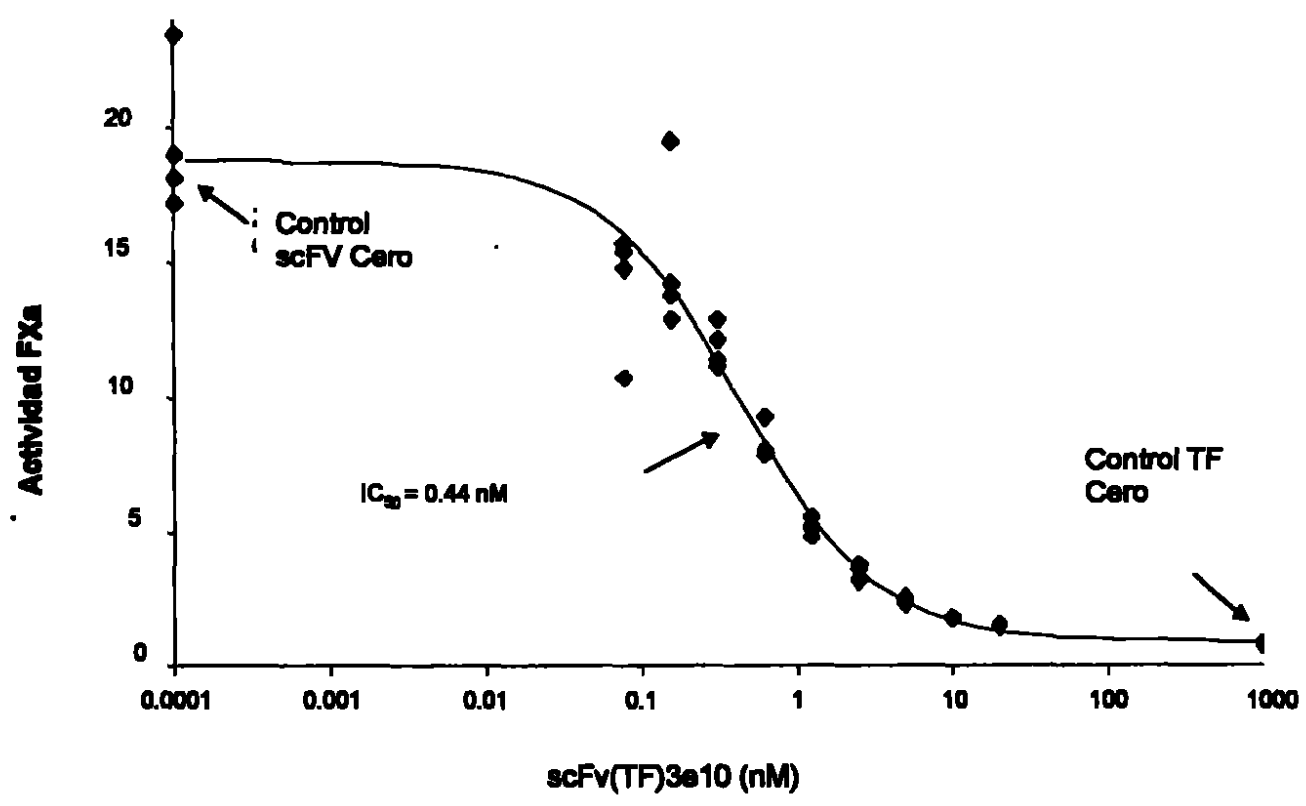


Figura 7.

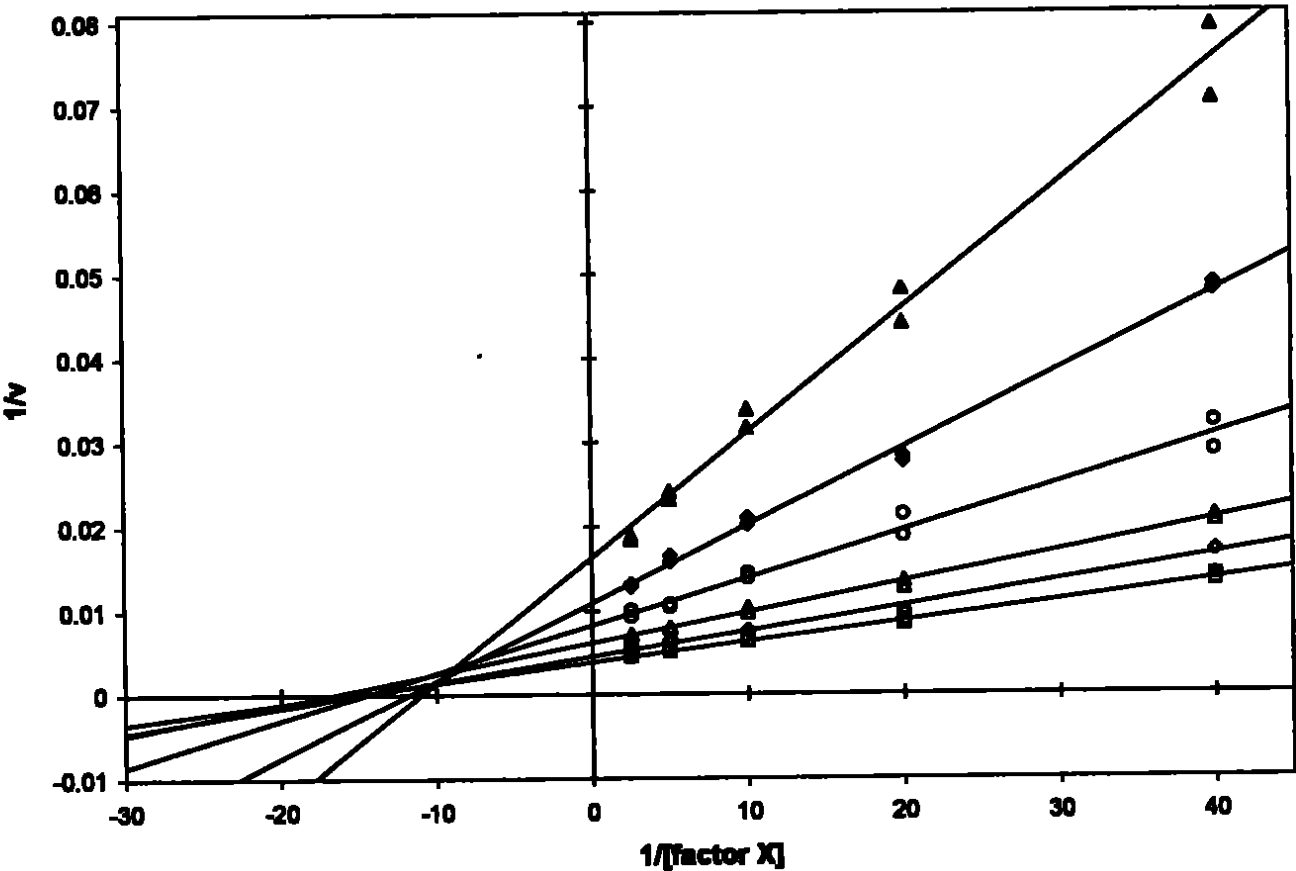
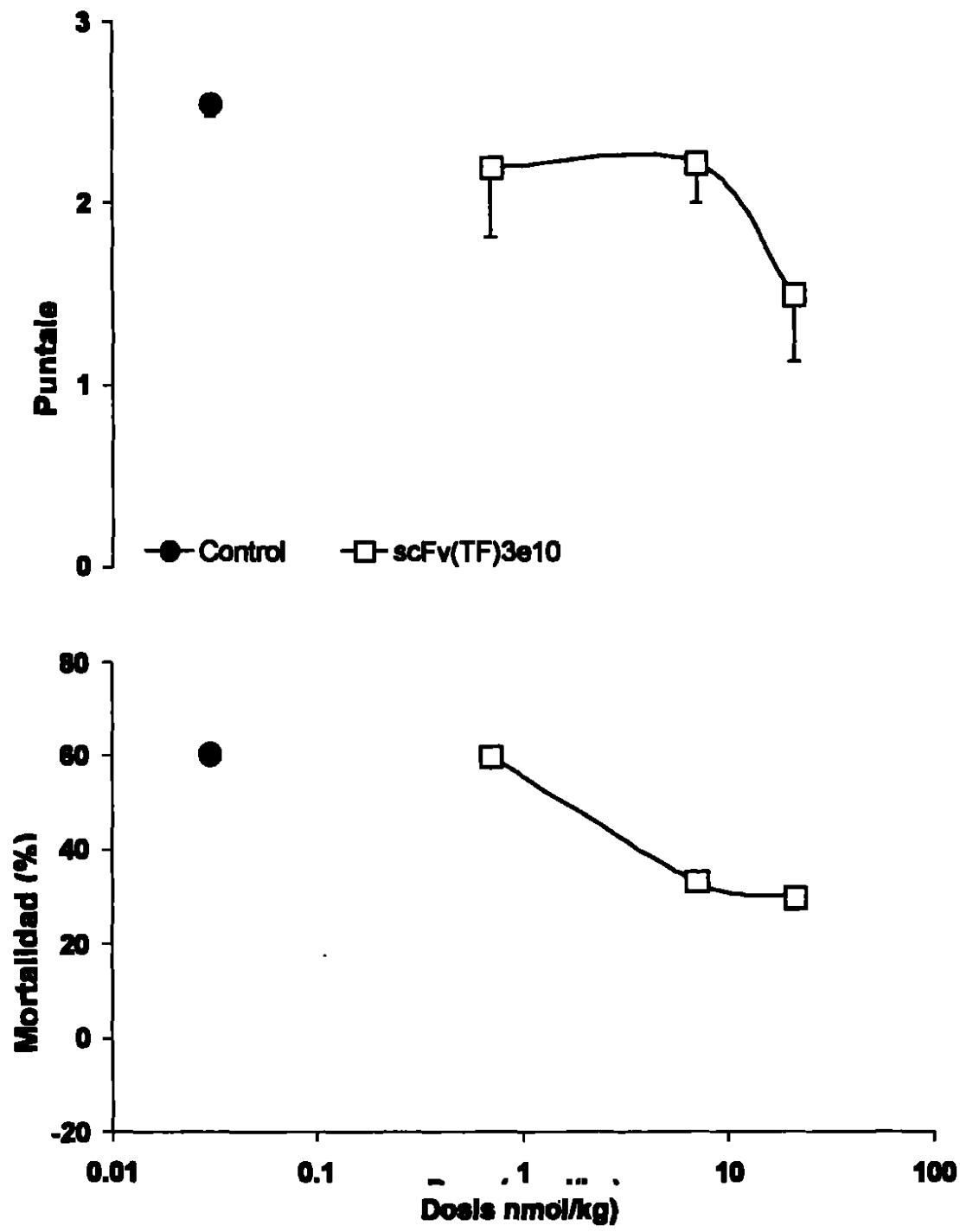


Figure 8.



- (12) Publicación de la solicitud Internacional bajo PCT
 (19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
 Oficina Internacional
 (43) Fecha de publicación internacional : 13 de noviembre de 2003 (13.11.2003)
 (10) Número de publicación internacional: **WO 03/093422 A2**
-

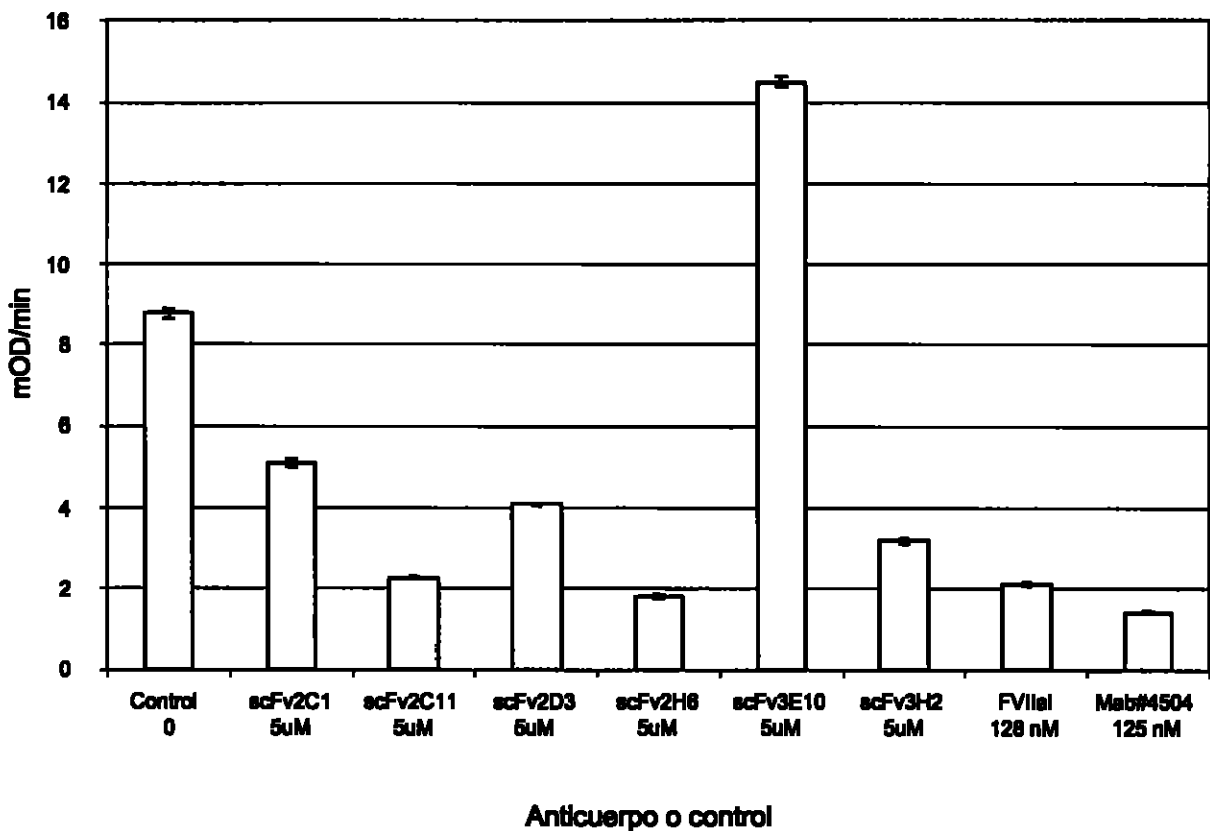
- (51) **Clasificación Internacional de patentes: C12N**
 (21) **Número de solicitud Internacional: PCT/US03/13521**
 (22) **Fecha de presentación internacional: 30 de abril de 2003 (30.04.2003)**
 (25) **Idioma de la presentación: inglés**
 (26) **Idioma de la publicación: inglés**
 (30) **Antecedentes de prioridad: 60/376,566 1 de mayo de 2002 (01.05.2002) US**
 (71) **Solicitante (para todos los estados designados excepto los EE.UU.): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE], 13342 Berlin (DE).**
 (72) **Inventor; y**
 (75) **Inventor/solicitante (solo para los EE.UU.): LIGHT, David [US/US]; 614 South Freemont Street, San Mateo, CA 94402 (US). MCLEAN, Kirk [US/US]; 291 Capricorn Avenue, Oakland, CA 94611 (US)**
 (74) **Agentes: ZELANO, Anthony, J. et al.; Millen, White, Zelano & Branigan, P.C., Suite 1400, Arlington Courthouse Plaza 1, 2200 Clarendon Boulevard, Arlington, VA 22201 (US).**
 (81) **Estados designados(nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**
 (84) **Estados designados(regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Publicado:

- sin el informe de búsqueda internacional y a ser republicada después de recibido dicho reporte.

[Continúa en la siguiente página]

- (54) **Título: Nuevos anticuerpos dirigidos contra factores tisulares como anticoagulantes.**



(57) **Resumen:** Nuevos anticuerpos que se unen con mayor afinidad al complejo del factor VIIa/factor tisular (FVIIa/TF) que al factor tisular (TF) solamente, no compiten por la unión a TF con FVII y FX e inhiben la activación de FX. Los anticuerpos se unen en el sitio de la lesión y previenen el inicio de trombosis. Los anticuerpos se pueden usar para el tratamiento de diversas afecciones trombóticas incluyendo, a modo de ejemplo, trombosis de venas profundas, coagulación intravascular diseminada y síndrome coronario agudo.

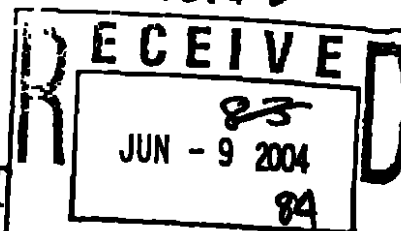
Véanse las explicaciones („Guidance Notes on Codes an Abbreviations“) al comienzo de cada edición regular de la Gaceta-PCT para la explicación del código de dos dígitos y de las otras abreviaturas

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
ANTHONY J. ZELANO
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA 1
2200 CLARENDON BOULEVARD, SUITE 1400
ARLINGTON, VA 22201

PCT



NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of Mailing (day/month/year) 07 JUN 2004	
Applicant's or agent's file reference BERLX 320 WO	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US03/13521	International filing date (day/month/year) 30 April 2003 (30.04.2003)
Applicant SCHERING AKTIENTGESELLSCHAFT	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Automatic in Memorandum

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Philip Gombel <i>Janice Ford</i> Telephone No. 703-308-0196
--	--

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

(See notes on accompanying sheet)

Art 19 Due 08/07/04

06/07/04

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference BERLX 320 WO	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/13521	International filing date (day/month/year) 30 April 2003 (30.04.2003)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 01 May 2002 (01.05.2002)
Applicant SCHERING AKTIENTORSELLSCHAFT		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

DIALOG, BIOSIS, CA, EMBASE, MEDLINE, WEST

search terms: tissue factor, factor VIIA, factor VII, factor IX, factor X, antibod?, 3e10, thrombus, ischemi?, ichnemic?, thrombus, angioplasty, graft, transplant?, light, mclean

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/13521

87

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/28; C12N 15/13

US CL : 424/130.1, 133.1, 141., 145.1, 158.1; 530/387.1, 387.3, 38.1, 388.2, 388.24; 536/23.5, 23.53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/130.1, 133.1, 141., 145.1, 158.1; 530/387.1, 387.3, 38.1, 388.2, 388.24; 536/23.5, 23.53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
noneElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,298,999 A (REZAI ET AL.) 29 May 1994, see entire document.	1-25
Y	US 5,874,407 A (KELLEY ET AL.) 23 February 1999, see entire document.	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

Later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 2003 (19.10.2003)

Date of mailing of the international search report

07 JUN 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Phillip Gambel

Telephone No. 703-308-0196

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article," "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended ?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

Remitente: EL ORGANISMO ENCARGADO DEL INFORME DE BÚSQUEDA
INTERNACIONAL

A
ANTHONY J. ZELANO
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA 1
2200 CLARENDON BOULEVARD, SUITE 1400
ARLINGTON, VA 22201

PCT

NOTIFICACIÓN DE ENVÍO DEL INFORME DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL
O DE LA DECLARACIÓN

(regla PCT Nº 44.1)

Fecha de envío (día/mes/año) 07 de junio de 2004	
Referencia del solicitante o del agente BERLX 320 WO	PROCEDER Ver abajo, puntos 1 y 4
Solicitud Internacional Nº PCT/US 03/13521	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 30 de abril de 2003
Solicitante SHERING AKTIENGESELLSCHAFT	

- ☒ Se notifica al solicitante de la confección del Informe de Búsqueda Internacional y de que se lo envía aquí adjunto.

Presentación de modificaciones y una declaración, según artículo 19:
El solicitante puede modificar por su propia voluntad las reivindicaciones de la solicitud internacional (ver regla 46):
¿Cuándo? El plazo para la presentación de tales modificaciones es usualmente de dos meses a partir del envío del Informe de Búsqueda Internacional; otros detalles se pueden obtener de las observaciones de la hoja adjunta.
¿Dónde? Directamente en la Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin des Colombettes, CH-1211 Ginebra 20. Telefax Nº: (41-22) 740.14.35

Otras indicaciones detalladas se pueden obtener en las observaciones de la hoja adjunta.
- ☐ Se notifica al solicitante que no se confecciona un Informe de Búsqueda Internacional y de que, según el artículo 17(2)a, se envía aquí la declaración.
- ☐ Acerca de la objeción contra el pago de una tasa(s) adicional(es) según la regla 40.2, se informa al solicitante que:
 - ☐ la objeción y la resolución han sido enviadas desde aquí, junto con su solicitud de envío del texto, así como el requerimiento del solicitante de impulsar la objeción y la resolución, a los organismos designados por la Oficina Internacional.
 - ☐ No existe ninguna resolución acerca de la objeción; el solicitante será informado en cuanto se tome una resolución.
- Recordatorio**

Brevemente tras el transcurso de 18 meses a partir de la fecha de prioridad la Oficina Internacional publicará la solicitud internacional. Si el solicitante quiere impedir o postergar la publicación, debe presentar en la Oficina Internacional, según la regla 90^{bis}.1 a 90^{bis}.3, antes de concluir las preparaciones técnicas para la publicación internacional, una declaración acerca del desistimiento de la solicitud internacional o de la reivindicación de prioridad.

Cuando el solicitante desea postergar en hasta 30 meses (en algunos organismos hasta más) a partir de la fecha de prioridad el ingreso en la fase nacional, debe presentar, solo en determinadas oficinas designadas, una solicitud de Examen Preliminar Internacional dentro de los 18 meses a partir de la fecha de prioridad; de otra manera, el solicitante deberá realizar los actos prescritos para entrar en la fase nacional ante tales oficinas designadas dentro del plazo de 20 meses a partir de la fecha de prioridad..

Con respecto a otras oficinas designadas, se aplica el plazo de 30 meses (o más aún) si no se presenta una demanda en 18 meses.

Ver el anexo del formulario PCT/IB/301 y, para los detalles de los plazos aplicables, oficina por oficina, ver el PCT Applicant Guide, Volume II, National Chapter y el sitio de Internet de WIPO.

Nombre y dirección postal de IAS/US Mail Stop PCT, Attn.: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimil Nº (703) 305-3230 Formulario PCT/ISA/220 (abril 2002)	Funcionario autorizado Phillip Gambel Telefono Nº: 703-308-0198 (ver notas en la hoja adjunta)
--	---

Estas instrucciones son indicaciones básicas para la presentación de modificaciones según el artículo 19. Estas observaciones se basan sobre los requisitos del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes (PCT), del reglamento de aplicación y de las normas administrativas del mismo. Ante diferencias entre estas observaciones y los textos mencionados anteriormente son aplicables los últimos. Otros detalles se pueden obtener en el *PCT Applicant's Guide*, una publicación de la WIPO.

Las expresiones "artículo", "regla" y "párrafo" empleados en estas instrucciones se refieren siempre a las disposiciones del Tratado PCT, al reglamento de aplicación PCT o a las normas administrativas PCT.

INSTRUCCIONES CONCERNIENTES A MODIFICACIONES SEGÚN ARTÍCULO 19

Luego de recibir el Informe de Búsqueda Internacional, el solicitante tiene la posibilidad de modificar una vez las reivindicaciones de la solicitud internacional. Sin embargo, se debe hacer notar que, dado que todas las partes de la solicitud internacional (reivindicaciones, descripción y figuras) pueden ser modificados durante el Examen Preliminar Internacional, no existe usualmente la necesidad de presentar modificaciones de las reivindicaciones según el artículo 19, excepto cuando el solicitante desea la publicación de estas reivindicaciones o presenta algún otro motivo para la modificación de las reivindicaciones de su publicación internacional, por ejemplo, a los fines de una protección provisoria. También se debe tomar en consideración que una protección provisoria se puede obtener solo en algunos estados.

¿Que partes de una solicitud internacional pueden ser modificadas?

En el marco del artículo 17 solo pueden ser modificadas las reivindicaciones.

En la fase internacional, según el artículo 34, las reivindicaciones también pueden ser modificadas (o nuevamente modificadas) ante el organismo encargado del examen preliminar internacional. Según el artículo 34, la descripción y las figuras solo pueden ser modificadas ante el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional.

Al ingresar en la fase nacional, según el artículo 28 o, en casos dados, el artículo 41, pueden ser modificadas todas las partes de la solicitud internacional.

¿Hasta cuando se pueden presentar modificaciones?

Dentro de los dos meses a partir del envío del informe de búsqueda internacional o dentro de dieciséis meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde. No obstante, las modificaciones son consideradas como válidas cuando son enviadas a la Oficina Internacional luego del plazo establecido pero antes de la conclusión de las preparaciones técnicas para la publicación internacional (regla 46.1).

¿Dónde no se deben presentar las modificaciones?

Las modificaciones solo pueden ser presentadas ante la Oficina Internacional y no en la Oficina de Presentación o en el Organismo de Búsquedas Internacionales (regla 46.2).

Ver abajo donde se pueden presentar un requerimiento de Examen Preliminar Internacional.

¿En que forma pueden ser llevadas a cabo las modificaciones?

Una modificación puede proceder en la versión presentada mediante la eliminación de una o varias reivindicaciones, mediante el agregado de una o varias reivindicaciones nuevas o mediante modificaciones del texto de una o varias reivindicaciones.

Se debe presentar una hoja de reemplazo por cada hoja de reivindicaciones que, como consecuencia de una o varias modificaciones, se diferencia de la presentada originalmente.

Todas las reivindicaciones que aparecen una hoja de reemplazo deben estar numeradas con cifras arábigas. Así, cuando se elimina una reivindicación, las demás no deben ser numeradas nuevamente. En el caso de una nueva numeración, las reivindicaciones deben ser numeradas en forma consecutiva (normas administrativas, ítem 205b)).

Las modificaciones deben estar redactadas en el idioma en que fue publicada la solicitud internacional.

¿Qué antecedentes deben acompañar a las modificaciones?

Escrito adjunto (ítem 208b)):

Las modificaciones se deben presentar con un escrito adjunto.

El escrito adjunto no se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas. No se debe confundir con "declaración según artículo 19(1)" (Ver abajo, "aclaración según artículo 19(1)").

El escrito adjunto puede estar redactado, a elección del solicitante, en idioma inglés o francés. En solicitudes internacionales vertidas en idioma inglés, el escrito adjunto debe estar redactado asimismo en idioma inglés y en las solicitudes internacionales redactadas en idioma francés en idioma francés.

En el escrito adjunto deben estar indicadas las diferencias existentes entre las reivindicaciones de la versión presentada y las reivindicaciones modificadas. Así, para cada reivindicación de la solicitud internacional deben estar indicadas (indicaciones equivalentes para reivindicaciones distintas pueden estar aunadas), en particular, si:

- i) la reivindicación no está modificada;
- ii) la reivindicación fue eliminada;
- iii) la reivindicación es nueva;
- iv) la reivindicación reemplaza a una o a varias reivindicaciones de la versión presentada;
- v) la reivindicación se origina en la división de una reivindicación de la versión presentada;

A continuación se indican ejemplos de cómo se deben aclarar modificaciones en el escrito adjunto:

- 1- [cuando en lugar de 48 reivindicaciones originales, luego de la modificación de algunas reivindicaciones existen 51 reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones 1 a 29, 31, 32, 34, 35, 37 a 48 son reemplazadas por reivindicaciones modificadas con la misma numeración; las reivindicaciones 30, 33 y 36 quedan sin modificar; las reivindicaciones 49 a 51 están agregadas."
- 2- [cuando en lugar de 15 reivindicaciones originales, luego de la modificación de todas las reivindicaciones existen 11 reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones modificadas 1 a 11 están en lugar de las reivindicaciones 1 a 15"
- 3- [cuando originalmente existen 14 reivindicaciones y las modificaciones consisten en la eliminación de algunas reivindicaciones y el agregado de nuevas reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones 1 a 6 y 14 están sin modificar; las reivindicaciones 7 a 13 son eliminadas; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17. "O": se eliminan las reivindicaciones 7 a 13; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17; todas las demás reivindicaciones quedan sin modificar."
- 4- [cuando se llevan a cabo distintos tipos de modificaciones]:
"Reivindicaciones 1 a 10 sin modificar; reivindicaciones 11 a 13, 16 y 19 eliminadas; reivindicaciones 14, 15 y 18 reemplazadas por la nueva reivindicación 14; reivindicación 17 dividida en las nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17, nuevas reivindicaciones 20 y 21 agregadas."

"Declaración según artículo 19(1)" (Regla 48.4)

A las modificaciones se puede agregar una declaración mediante la cual se explican las modificaciones y se exponen sus consecuencias sobre la descripción y los dibujos (los que, según el artículo 19(1), no pueden ser modificados).

La declaración se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas.

La misma debe estar redactada en el idioma en que se publica la solicitud internacional.

La misma debe ser corta y no debe comprender más de 500 palabras cuando está redactada o traducida al idioma inglés.

La aclaración no se debe confundir con el escrito adjunto que indica las diferencias existentes entre las reivindicaciones de la versión original y las reivindicaciones modificadas, y no reemplaza al último. Se la debe presentar en una hoja separada y caracterizar como tal en el título, con preferencia, mediante las palabras "Declaración según artículo 29(1)".

La aclaración no debe contener manifestaciones de merecedora acerca del informe de búsqueda internacional o del significado de las publicaciones mencionadas en este informe. Solo se puede hacer referencia a publicaciones indicadas en el informe de búsqueda internacional que se relacionan con una reivindicación determinada, en el contexto de una modificación de esta reivindicación.

Consecuencias de una solicitud ya presentada sobre el examen preliminar internacional

Cuando en el momento de la presentación de modificaciones según el artículo 19 ya se requirió un requerimiento de examen preliminar internacional, el solicitante debería presentar al mismo tiempo, en su propio interés, junto con la presentación de las modificaciones (y cualquier declaración) ante la Oficina Internacional, una copia de las modificaciones ante el organismo encargado del examen preliminar internacional y, cuando es requerido, una traducción de tales modificaciones para proceder ante el organismo (ver regla 55.3 y regla 62.2 a), primera frase). Para mayor información, ver las notas al formulario de requerimiento (PCT/IPEA401).

Consecuencias de las modificaciones desde el punto de vista de la traducción de la solicitud internacional al ingresar en la fase nacional

Se hace notar al solicitante que, al ingresar en la fase nacional, en lugar de o adicionalmente a la traducción de las reivindicaciones en la versión original, se debe enviar una traducción de las reivindicaciones modificadas según el artículo 19 a los organismos designados / seleccionados.

Otros detalles acerca de las exigencias de cada organismo designado / seleccionado se obtienen en el PCT Applicant Guide, Volume II..

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

PCT

Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente BERLX 320 WO	PROCEDER Ver notificación del envío del Informe de búsqueda internacional (formulario PCT/ISA/220), así como, en tanto corresponda, el siguiente punto 5.	
Referencia Internacional PCT/US 03/13521	Fecha de presentación Internacional 30 de abril de 2003 30/04/2003	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 01 de mayo de 2002 (01/05/2002)
Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el organismo de búsquedas internacionales y, de acuerdo con el artículo 18, se envía al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional comprende, en total, 3 hojas.

- ☒ Se adjunta también una copia de cada uno de los antecedentes del estado de la técnica mencionado en este informe

1. Fundamentos del Informe

- a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo, en tanto no se indique otra cosa en este punto, en el idioma en que se basa la solicitud internacional presentada.

- ☐ La búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre una traducción de la solicitud internacional suministrada a este organismo (regla 23.1 b)).

- b. Con respecto a los nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional, la búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre el protocolo de secuencias que

- ☐ está contenido en forma escrita en la solicitud internacional.
☐ fue presentado en forma legible por computadora junto con la solicitud internacional.
☐ fue suministrado posteriormente ante el organismo por escrito.
☐ fue suministrado posteriormente ante el organismo en forma legible por computadora.
☐ se presentó la declaración de que el protocolo de secuencia suministrado posteriormente no supera el contenido revelado en la solicitud internacional en el momento de la presentación.
☐ se presentó la declaración de que las informaciones vertidas en forma legible por computadora se corresponden con el protocolo de secuencias suministrado por escrito.

2. ☐ Determinadas reivindicaciones no eran investigables (ver campo I).

3. ☐ Falta de uniformidad de la invención (ver campo II).

4. Con respecto al título de la invención,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al resumen,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo de acuerdo con la regla 38.2 b), tal como aparece en el campo III. El solicitante puede presentar una posición ante este organismo en el transcurso de un mes a partir de la fecha del envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. La figura de las ilustraciones a ser publicada con el resumen es la figura N° _____

- ☐ como es sugerida el solicitante ☒ ninguno de los dibujos
☐ porque el solicitante no sugiere ninguna figura.
☐ porque esta figura caracteriza mejor la invención.

93
94

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Referencia Internacional PCT/US 03/13521
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
IPC 7 : A61K 39/395; C07K 16/28; C12N 15/13 US CL: : 424/130.1, 133.1, 141., 145.1, 158.1, 530/387.1, 387.3, 38.1, 388.2, 388.24, 538/23.5, 23.53 Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o la clasificación internacional la IPC		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS		
Material mínimo investigado (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación) U.S.: 424/130.1, 133.1, 141., 145.1, 158.1, 530/387.1, 387.3, 38.1, 388.2, 388.24, 538/23.5, 23.53		
Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado		
Banco electrónico de datos consultado durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas) Ver hoja de continuación		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Denominación del documento, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación N°
Y	US 6,288,589 (REZAJE ET AL.) 29 de marzo de 1994 Ver documento completo	1 - 25
Y	US 5,874,407 A (KELLEY ET AL.), 23 de febrero de 1999 Ver documento completo	1 - 25
☐ Se pueden escoger otras publicaciones en la continuación del campo C		☐ Ver familia de patentes en el anexo
"A" Categorías particulares indicadas en publicaciones que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante "B" documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional "L" publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada) "O" publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones "P" publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada	"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa "X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva "Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista "Z" publicación que es miembro de la misma familia	
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 19 de octubre de 2003 (19.10.2003)		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 07 de junio de 2004)
Nombre y Código Postal del ISA/US Mail Stop PC, Attn.: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Fax: N° (703) 305-3230		Funcionario Apoderado Phillip Gambel Teléfono N° 703-308-0198

74
95

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/US 03/13521

Continuación de B. **ÁMBITOS INVESTIGADOS, ítem 3**

DIALOG, BIOSIS, CA, EMBASE, MEDLINE, WEST

Expresiones buscadas: tissue factor, factor VIIA, factor VII, factor IX, factor X, antibody?, 3e10, thrombus, ischemi?,
ichaemic?, thrombus, angioplasty, graft, transplant?, light, mclean

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

9596

Remitente: EL ORGANISMO ENCARGADO DEL INFORME DE BÚSQUEDA
INTERNACIONAL

A

ANTHONY J. ZELANO
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA 1
2200 CLARENDON BOULEVARD, SUITE 1400
ARLINGTON, VA 22201

PCT

NOTIFICACIÓN DE ENVÍO DEL INFORME DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL
O DE LA DECLARACIÓN

(regla PCT N° 44.1)

Referencia del solicitante o del agente	Fecha de envío (día/mes/año)
BERLX 320 WO	07 de junio de 2004
Solicitud Internacional N°	PROCEDER
PCT/US 03/13521	Ver abajo, puntos 1 y 4
Solicitante	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año)
SHERING AKTIENGESELLSCHAFT	30 de abril de 2003

1. ☒ Se notifica al solicitante de la confección del Informe de Búsqueda Internacional y de que se lo envía aquí adjunto.

Presentación de modificaciones y una declaración, según artículo 19:
El solicitante puede modificar por su propia voluntad las reivindicaciones de la solicitud internacional (ver regla 46):
¿Cuándo? El plazo para la presentación de tales modificaciones es usualmente de dos meses a partir del envío del Informe de Búsqueda Internacional; otros detalles se pueden obtener de las observaciones de la hoja adjunta.
¿Dónde? Directamente en la Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin des Colombettes, CH-1211 Ginebra 20. Telefax N°: (41-22) 740.14.35

Otras indicaciones detalladas se pueden obtener en las observaciones de la hoja adjunta.

2. ☐ Se notifica al solicitante que no se confecciona un Informe de Búsqueda Internacional y de que, según el artículo 17(2)a, se envía aquí la declaración.

3. ☐ Acerca de la objeción contra el pago de una tasa(es) adicional(es) según la regla 40.2, se informa al solicitante que:

☐ la objeción y la resolución han sido enviadas desde aquí, junto con su solicitud de envío del texto, así como el requerimiento del solicitante de impulsar la objeción y la resolución, a los organismos designados por la Oficina Internacional.

☐ No existe ninguna resolución acerca de la objeción; el solicitante será informado en cuanto se tome una resolución.

4. Recordatorio

Brevemente tras el transcurso de 18 meses a partir de la fecha de prioridad la Oficina Internacional publicará la solicitud internacional. Si el solicitante quiere impedir o postergar la publicación, debe presentar en la Oficina Internacional, según la regla 90^{ter}.1 a 90^{ter}.3, antes de concluir las preparaciones técnicas para la publicación internacional, una declaración acerca del desistimiento de la solicitud internacional o de la reivindicación de prioridad.

Cuando el solicitante desea postergar en hasta 30 meses (en algunos organismos hasta más) a partir de la fecha de prioridad el ingreso en la fase nacional, debe presentar, solo en determinadas oficinas designadas, una solicitud de Examen Preliminar Internacional dentro de los 18 meses a partir de la fecha de prioridad; de otra manera, el solicitante deberá realizar los actos prescritos para entrar en la fase nacional ante tales oficinas designadas dentro del plazo de 20 meses a partir de la fecha de prioridad..

Con respecto a otras oficinas designadas, se aplica el plazo de 30 meses (o más aún) si no se presenta una demanda en 18 meses.

Ver el anexo del formulario PCT/IB/301 y, para los detalles de los plazos aplicables, oficina por oficina, ver el PCT Applicant Guide, Volume II, National Chapter y el sitio de Internet de WIPO.

Nombre y dirección postal de ISA/US Mail Stop PCT, Attn.: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimil N° (703) 305-3230	Funcionario autorizado Philip Gambel Telefono N°: 703-308-0198
---	--

Formulario PCT/ISA/220 (abril 2002)

(ver notas en la hoja adjunta)

Estas instrucciones son indicaciones básicas para la presentación de modificaciones según el artículo 19. Estas observaciones se basan sobre los requisitos del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes (PCT), del reglamento de aplicación y de las normas administrativas del mismo. Ante diferencias entre estas observaciones y los textos mencionados anteriormente son aplicables los últimos. Otros detalles se pueden obtener en el *PCT Applicant's Guide*, una publicación de la WIPO.

Las expresiones "artículo", "regla" y "párrafo" empleados en estas instrucciones se refieren siempre a las disposiciones del Tratado PCT, al reglamento de aplicación PCT o a las normas administrativas PCT.

INSTRUCCIONES CONCERNIENTES A MODIFICACIONES SEGÚN ARTÍCULO 19

Luego de recibir el Informe de Búsqueda Internacional, el solicitante tiene la posibilidad de modificar una vez las reivindicaciones de la solicitud internacional. Sin embargo, se debe hacer notar que, dado que todas las partes de la solicitud internacional (reivindicaciones, descripción y figuras) pueden ser modificadas durante el Examen Preliminar Internacional, no existe usualmente la necesidad de presentar modificaciones de las reivindicaciones según el artículo 19, excepto cuando el solicitante desea la publicación de estas reivindicaciones o presenta algún otro motivo para la modificación de las reivindicaciones de su publicación internacional, por ejemplo, a los fines de una protección provisoria. También se debe tomar en consideración que una protección provisoria se puede obtener solo en algunos estados.

¿Que partes de una solicitud internacional pueden ser modificadas?

En el marco del artículo 17 solo pueden ser modificadas las reivindicaciones.

En la fase internacional, según el artículo 34, las reivindicaciones también pueden ser modificadas (o nuevamente modificadas) ante el organismo encargado del examen preliminar internacional. Según el artículo 34, la descripción y las figuras solo pueden ser modificadas ante el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional.

Al ingresar en la fase nacional, según el artículo 28 o, en casos dados, el artículo 41, pueden ser modificadas todas las partes de la solicitud internacional.

¿Hasta cuando se pueden presentar modificaciones?

Dentro de los dos meses a partir del envío del Informe de búsqueda internacional o dentro de dieciséis meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde. No obstante, las modificaciones son consideradas como válidas cuando son enviadas a la Oficina Internacional luego del plazo establecido pero antes de la conclusión de las preparaciones técnicas para la publicación internacional (regla 48.1).

¿Dónde no se deben presentar las modificaciones?

Las modificaciones solo pueden ser presentadas ante la Oficina Internacional y no en la Oficina de Presentación o en el Organismo de Búsquedas Internacionales (regla 48.2).

Ver abajo donde se pueden presentar un requerimiento de Examen Preliminar Internacional.

¿En que forma pueden ser llevadas a cabo las modificaciones?

Una modificación puede proceder en la versión presentada mediante la eliminación de una o varias reivindicaciones, mediante el agregado de una o varias reivindicaciones nuevas o mediante modificaciones del texto de una o varias reivindicaciones.

Se debe presentar una hoja de reemplazo por cada hoja de reivindicaciones que, como consecuencia de una o varias modificaciones, se diferencia de la presentada originalmente.

Todas las reivindicaciones que aparecen una hoja de reemplazo deben estar numeradas con cifras arábigas. Así, cuando se elimina una reivindicación, las demás no deben ser numeradas nuevamente. En el caso de una nueva numeración, las reivindicaciones deben ser numeradas en forma consecutiva (normas administrativas, ítem 205b)).

Las modificaciones deben estar redactadas en el idioma en que fue publicada la solicitud internacional.

¿Qué antecedentes deben acompañar a las modificaciones?

Escrito adjunto (ítem 205b)):

Las modificaciones se deben presentar con un escrito adjunto.

El escrito adjunto no se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas. No se debe confundir con "declaración según artículo 19(1)" (Ver abajo, "aclaración según artículo 19(1)").

El escrito adjunto puede estar redactado, a elección del solicitante, en idioma inglés o francés. En solicitudes internacionales vertidas en idioma inglés, el escrito adjunto debe estar redactado asimismo en idioma inglés y en las solicitudes internacionales redactadas en idioma francés en idioma francés.

En el escrito adjunto deben estar indicadas las diferencias existentes entre las reivindicaciones de la versión presentada y las reivindicaciones modificadas. Así, para cada reivindicación de la solicitud internacional deben estar indicadas (indicaciones equivalentes para reivindicaciones distintas pueden estar aunadas), en particular, al:

- i) la reivindicación no está modificada;
- ii) la reivindicación fue eliminada;
- iii) la reivindicación es nueva;
- iv) la reivindicación reemplaza a una o a varias reivindicaciones de la versión presentada;
- v) la reivindicación se origina en la división de una reivindicación de la versión presentada;

A continuación se indican ejemplos de cómo se deben aclarar modificaciones en el escrito adjunto:

- 1- [cuando en lugar de 48 reivindicaciones originales, luego de la modificación de algunas reivindicaciones existen 51 reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones 1 a 29, 31, 32, 34, 35, 37 a 48 son reemplazadas por reivindicaciones modificadas con la misma numeración; las reivindicaciones 30, 33 y 36 quedan sin modificar; las reivindicaciones 49 a 51 están agregadas."
- 2- [cuando en lugar de 15 reivindicaciones originales, luego de la modificación de todas las reivindicaciones existen 11 reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones modificadas 1 a 11 están en lugar de las reivindicaciones 1 a 15"
- 3- [cuando originalmente existen 14 reivindicaciones y las modificaciones consisten en la eliminación de algunas reivindicaciones y el agregado de nuevas reivindicaciones]:
"Las reivindicaciones 1 a 6 y 14 están sin modificar; las reivindicaciones 7 a 13 son eliminadas; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17. "O": se eliminan las reivindicaciones 7 a 13; se agregan nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17; todas las demás reivindicaciones quedan sin modificar."
- 4- [cuando se llevan a cabo distintos tipos de modificaciones]:
"Reivindicaciones 1 a 10 sin modificar; reivindicaciones 11 a 13, 16 y 19 eliminadas; reivindicaciones 14, 15 y 18 reemplazadas por la nueva reivindicación 14; reivindicación 17 dividida en las nuevas reivindicaciones 15, 16 y 17, nuevas reivindicaciones 20 y 21 agregadas."

"Declaración según artículo 19(1)" (Regla 46.4)

A las modificaciones se puede agregar una declaración mediante la cual se explican las modificaciones y se exponen sus consecuencias sobre la descripción y los dibujos (los que, según el artículo 19(1), no pueden ser modificados).

La declaración se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas.

La misma debe estar redactada en el idioma en que se publica la solicitud internacional.

La misma debe ser corta y no debe comprender más de 500 palabras cuando está redactada o traducida al idioma inglés.

La aclaración no se debe confundir con el escrito adjunto que indica las diferencias existentes entre las reivindicaciones de la versión original y las reivindicaciones modificadas, y no reemplaza al último. Se la debe presentar en una hoja separada y caracterizar como tal en el título, con preferencia, mediante las palabras "Declaración según artículo 29(1)".

La aclaración no debe contener manifestaciones desmerecedoras acerca del informe de búsqueda internacional o del significado de las publicaciones mencionadas en este informe. Solo se puede hacer referencia a publicaciones indicadas en el informe de búsqueda internacional que se relacionan con una reivindicación determinada, en el contexto de una modificación de esta reivindicación.

Consecuencias de una solicitud ya presentada sobre el examen preliminar internacional

Cuando en el momento de la presentación de modificaciones según el artículo 18 ya se requirió un requerimiento de examen preliminar internacional, el solicitante debería presentar al mismo tiempo, en su propio interés, junto con la presentación de las modificaciones (y cualquier declaración) ante la Oficina Internacional, una copia de las modificaciones ante el organismo encargado del examen preliminar internacional y, cuando es requerido, una traducción de tales modificaciones para proceder ante el organismo (ver regla 55.3 y regla 62.2 a), primera frase). Para mayor información, ver las notas al formulario de requerimiento (PCT/IPEA/401).

Consecuencias de las modificaciones desde el punto de vista de la traducción de la solicitud internacional al ingresar en la fase nacional

Se hace notar al solicitante que, al ingresar en la fase nacional, en lugar de o adicionalmente a la traducción de las reivindicaciones en la versión original, se debe enviar una traducción de las reivindicaciones modificadas según el artículo 19 a los organismos designados / seleccionados.

Otros detalles acerca de las exigencias de cada organismo designado / seleccionado se obtienen en el *PCT Applicant Guide, Volume II*.

2
98
99

NUEVOS ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisoria de los Estados Unidos Nro: 60/376.566, presentada el 1 de mayo, 2002, cuyo contenido se incorpora por completo en este documento a modo de referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El mantenimiento de un equilibrio apropiado entre la actividad procoagulante y anticoagulante dentro de los vasos sanguíneos es esencial para lograr una hemostasia normal (Davie, E.W. et al. (1991) *Biochemistry*, 30(43): 30(43):10363-10370). Una perturbación de dicho equilibrio hacia la coagulación conduce a trombosis, que puede producir un ataque cardíaco, apoplejía, embolia pulmonar y trombosis venosa. Persiste la necesidad de anticoagulantes más eficaces y seguros para el tratamiento de trastornos trombóticos específicos.

El factor tisular ("TF") es una glucoproteína transmembrana que es el iniciador principal de la cascada de la coagulación (Nemerson, Y. (1995) *Thromb. Haemost.* 74(1): 180-184. Bajo condiciones fisiológicas normales el TF activo no está en contacto con la sangre. Durante una lesión vascular, la exposición del TF a la sangre y el colágeno subendotelial conducen a la activación de las plaquetas y de los factores de coagulación y posteriormente a la formación

de un coágulo hemostático. El TF expuesto actúa como un cofactor para la activación del factor IX ("FIX") y del factor X ("FX") catalizada por el factor VIIa ("FVIIa"), que son componentes críticos de los complejos intrínsecos de tenasa y protrombinasa, respectivamente. Esto conduce a la formación rápida de FXa y trombina. A continuación la trombina cliva el fibrinógeno en fibrina, que posteriormente se polimeriza para formar el coágulo de fibrina. Una inducción inapropiada de la expresión del TF en diversos estados clínicos puede conducir a una trombosis potencialmente mortal y/o puede contribuir en complicaciones patológicas. Se cree que la exposición al TF después de la ruptura de la placa es el hecho responsable de la oclusión trombótica que conduce a infarto de miocardio agudo y apoplejía. En estos estados, las vías de señalamiento proinflamatorias activadas por los factores de coagulación también contribuyen en la formación de edemas y en un mayor tamaño de infarto. Las lesiones vasculares asociadas con una angioplastia conducen a la sensibilización del TF sobre las SMC que se cree que inducen las vías de señalamiento celulares asociadas con la restenosis. La sobreexpresión del TF en distintos tipos de cáncer y en las sepsis Gram.-negativas conduce a una trombosis potencialmente mortal y a la activación de las vías inflamatorias.

El complejo FVIIa/TF está comprometido en el mecanismo patogénico de diversas enfermedades trombóticas y el nivel en circulación de TF constituye un factor de riesgo para determinados pacientes. Los factores FVIIa y TF cumplen funciones únicas en las lesiones vasculares, particularmente en el mantenimiento de la hemostasia y el inicio de las trombosis. El TF se expresa habitualmente en la capa adventicia, pero en las enfermedades vasculares está sensibilizado y se expresa de forma inapropiada en las capas media y neointima. En las placas ateroscleróticas está incrementada la expresión del TF y están separadas de la sangre por una delgada capa fibrosa que se puede romper por exposición al TF. Las intervenciones quirúrgicas, tal como una angioplastia con balón, implantación de Stents o endarterectomía lesionan la pared de los vasos y exponen el TF subyacente. En la placa aterosclerótica, de paredes delgadas, rica en lípidos, la ruptura espontánea o erosión endotelial conducen a la exposición del TF y a la trombosis, dando como resultado una angina inestable e infarto de miocardio. El TF puede circular en micropartículas derivadas de células y los niveles circulantes de TF son elevados en la angina inestable, lo cual sugiere que este TF en circulación puede contribuir en la formación de trombos (Soejima, H. et al. (1999) *Circulation* 99(22): 2908-2913). A menudo se ha asociado al cáncer con un estado

hipercoagulable atribuido a una sobreexpresión del TF sobre las células tumorales. Esto predispone al paciente a trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y un bajo grado de coagulación intravascular diseminada ("DIC"). La DIC da como resultado la deposición de fibrina microvascular que contribuye a una insuficiencia de múltiples órganos.

Los anticoagulantes basados en proteínas contra el TF incluyen anticuerpos que neutralizan el TF, el factor VIIa ("FVIIa") de sitio activo inhibido, el inhibidor de la vía del factor tisular ("TFPI") y la proteína anticoagulante de Nematodes ("NAPC2"). Los modelos de trombosis con lesiones arteriales agudas indican que los inhibidores basados en proteínas de FVIIa/TF constituyen antitrombóticos eficaces, con menos hemorragia en comparación con la heparina, inhibidores directos de trombina, inhibidores de plaquetas e inhibidores de FXa (Himber, J. et al. (2001) *Thromb. Haemost.* 85:475-481; Harker, L.A. et al. (1995) *Thromb. Haemost.* 74(1):464-472. Además, la inhibición de FVIIa/TF es superior a otros anticoagulantes (por ejemplo, heparina, inhibidores de FXa) en la prevención del espesamiento de la neointima y la estenosis vascular después de una lesión por balón (Jang, Y. et al. (1995) *Circulation* 92(10): 3041-3050).

La inhibición de TF, FVIIa o del complejo FVIIa/TF es un enfoque antitrombótico eficaz para la prevención de DIC y para reducir la mortalidad en los modelos experimentales de

sepsis. Los análogos de TFPI impiden la DIC inducida por tromboplastina y endotoxinas en conejos (Day, K.C. et al. (1990) *Blood* 76:1538-1545; Bregengard, C. et al. (1993) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 4:699-706).o Los anticuerpos monoclonales contra FVIIa (Biemond, B.J. et al. (1995) *Thromb. Haemost.* 73:223-230) o (Levi, M. et al. (1994) *J. Clin. Invest.* 93:114-120) impiden la DIC inducida por endotoxina en monos. Los anticuerpos neutralizantes de TF, FVIIa_i y TFPI, inhiben la DIC y reducen la mortalidad en un modelo en babuinos de sepsis inducida por *E. coli* (Creasey, A.A. et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 91:2850-2860; Taylor, F.B. et al. (1991a) *Blood* 78:364-368; Taylor, F.B. et al. (1991b) *Circ. Shock* 33:127-134; Taylor, F.B. (1996) *Haemostasis Supl.* 1 26:83-91). Se sabe que tanto el FXa libre como el complejo FVIIa/TF/FXa inducen la producción de las citoquinas proinflamatorias asociadas con un mayor riesgo de muerte en pacientes con sepsis (Riewald, M. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98:7742-7747). Un hecho interesante fue la comprobación de que el FVIIa_i disminuía los niveles plasmáticos de IL-6 y IL-8 en el modelo de babuinos (Taylor, F.B. et al. (1998) *Blood* 91:1609-1615), lo cual sugiere que la inhibición de FVIIa/TF puede tener efectos antiinflamatorios adicionales que no se observan con los otros mecanismos anticoagulantes.

Se han descrito varios anticuerpos que son anticoagulantes eficaces, que se unen y neutralizan ya sea el TF o el complejo FVIIa/TF o ambos (véase, por ejemplo, Carson, S.D. et al. (1985) *Blood* 66(1):152-156; Tanaka, H. et al. (1985) *Thromb. Res.* 40(6):745-756; Kirchhofer, D. et al. (2000) *Thromb. Haemost.* 84(6):1072-1081; Kirchhofer, D. et al. (2001) *Biochemistry* 40(3):675-682; Faelber, K. et al. (2001) *J. Mol. Biol.* 313:83-97; y Patentes de los Estados Unidos N°: 5.506.134, 5.986.065 y 6.274.142). Los anticuerpos dirigidos con el TF de la presente invención son anticoagulantes eficaces que presentan características mejoradas con respecto a los anticuerpos contra TF descritos previamente. En particular, los anticuerpos de la invención se unen con mayor afinidad al complejo FVIIa/TF que al TF solo y no compiten con FVII o FX por la unión a TF.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee anticuerpos, que actúan como anticoagulantes, que se unen con mayor afinidad al complejo del factor VIIa/factor tisular ("FVIIa/TF") que al factor tisular ("TF") solo. En una realización, los anticuerpos de la invención se unen con una afinidad al menos 2 veces mayor al complejo FVIIa/TF que al TF solamente, evaluado en un ensayo de microcalorimetría. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención se unen con una afinidad al menos 5 veces mayor al complejo

FVIIa/TF que al TF solamente. En una realización más preferida, los anticuerpos de la invención se unen con una afinidad al menos 10 veces mayor al complejo FVIIa/TF que al TF solamente. En otra realización, los anticuerpos de la invención no compiten por la unión al TF con uno o más factores de coagulación seleccionados del grupo formado por los factores VII ("FVII"), IX ("FIX") y X ("FX"). En una realización preferida, los anticuerpos de la invención no compiten por la unión al TF con FVII y con FX. En una realización más preferida, los anticuerpos de la invención se unen con mayor afinidad al complejo FVIIa/TF que al TF solamente y no compiten por la unión al TF con FVII y con FX.

El anticuerpo anticoagulante de esta invención está dirigido a y se une al complejo FVIIa/TF en el sitio de la lesión e inhibe la activación del factor X ("FX"), impidiendo de esa manera la formación del trombo y comportándose así como un anticoagulante eficaz en el tratamiento de determinadas enfermedades incluyendo, a modo de ejemplo, sepsis, coagulación intravascular diseminada, accidente cerebrovascular isquémico, trombosis de venas profundas, síndromes coronarios agudos, complicaciones trombóticas después de una angioplastia y coagulopatía en el cáncer avanzado. Además, el anticuerpo es de utilidad en la

10 196
205

cirugía microvascular, los injertos de piel y venas y en los trasplantes de órganos.

En otro aspecto, la invención provee composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención.

En otro aspecto, la invención provee un método para proteger a un paciente contra la formación de trombos que comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos del anticuerpo de esta invención a dicho paciente, y de esa manera inhibir la generación de trombina sin afectar directamente otros parámetros de la coagulación, tal como la activación y agregación de plaquetas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para reducir y tratar la trombosis de venas profundas ("DVT") o la coagulación intravascular diseminada ("DIC") o un síndrome coronario agudo o cáncer con evidencia de coagulopatía en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos del anticuerpo de la invención a dicho paciente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para regular la respuesta inflamatoria en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos del anticuerpo de la invención a dicho paciente.

11/07
106

En aún otro aspecto, el anticuerpo de la invención se puede usar para formar un recubrimiento no trombogénico sobre la superficie de dispositivos médicos que toman contacto con la sangre.

En aún otro aspecto, la invención se relaciona con un conjunto de elementos [kit] que comprende el anticuerpo de la invención que se une al complejo FVIIa/TF. Como alternativa, dicho conjunto de elementos puede comprender secuencias de ADN que codifican componentes del anticuerpo.

También se describen métodos para elaborar los anticuerpos de la invención, tanto recombinantes como de síntesis.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Actividad de anticuerpos de cadena simple contra TF en el ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa. El ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa se efectuó como se describe en el Ejemplo 4 usando una mezcla equilibrada de FVIIa (5 nM) y sTF (10 nM), basada en la afinidad de FVIIa por sTF ($K_{D(app)} = \sim 10$ nM). La hidrólisis del sustrato de péptidos cromogénicos S2266 fue monitoreada tal como se describe. Se indican las concentraciones finales de los anticuerpos de cadena simple expresados en bacterias y las proteínas control FVIIa1 (FVIIa inactivado por el péptido

clorometilcetona, PPACK) y Mab N° 4504 (American Diagnostica).

Figura 2. La unión de scFv(TF)3e10 a sTF incrementa la afinidad aparente de sTF por el FVIIa. El ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa se efectuó como se describirá en el Ejemplo 4 usando FVIIa 2 nM en presencia y ausencia de scFv(TF)3e10 expresado en bacterias 800 nM. El sTF se tituló en el ensayo y se determinó la velocidad de clivaje del sustrato de péptido cromogénico S2266. Se calculó el valor de K_D aparente para sTF usando un ajuste de 4 parámetros estándar.

Figura 3. Actividad de anticuerpos de cadena simple contra TF en el ensayo de tiempo de protrombina (PT). El ensayo PT se llevó a cabo como se describirá en el Ejemplo 4 usando una tromboplastina humana recombinante (Dade, Inc.) que contiene el TF humano de longitud completa en vesículas de fosfolípidos. Se indican las concentraciones finales de los anticuerpos de cadena simple de expresión bacteriana y la proteína control FVIIai.

Figura 4. Medición de la afinidad de unión aparente de scFv(TF)3e10 por sTF. El ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa se llevó a cabo como se describirá en el Ejemplo 4 usando sTF 3 nM y FVIIa 2 nM. La concentración de sTF utilizada se encontraba por debajo del valor de la K_D para la unión a FVIIa. Se agregaron concentraciones crecientes

de scFv(TF)3e10 de expresión bacteriana y la mayor velocidad de reacción se usó para determinar la K_D aparente de este anticuerpo por sTF usando un ajuste estándar de 4 parámetros. La afinidad de scFv(TF)3e10 por el complejo sTF / FVIIa ($K_{D(app)} = 65$ nM) es mayor que la afinidad de scFv(TF)3e10 por sTF medido con BIAcore ($K_{D(app)} = 470$ nM).

Figura 5. Medición de la afinidad de unión de scFv(TF)3e10 por TF y el complejo FVIIa/TF. El ensayo de microcalorimetría se llevó a cabo como se describirá en el Ejemplo 4 usando scFv(TF)3e10 expresado en células CHO. Este ensayo muestra que scFv(TF)3e10 tiene una afinidad ~20 veces mayor para el complejo sTF/FVIIa ("Complejo") que por sTF ("TF libre").

Figura 6. scFv(TF)3e10 inhibe de forma dosis-dependiente la activación de FX. El ensayo de activación de FX se llevó a cabo como se describirá en el Ejemplo 4 usando concentraciones crecientes de scFv(TF)3e10 expresado en bacterias, FX y el complejo FVIIa/TF 250 nM sobre una superficie de fosfolípidos (FVIIa 10 pM). La IC_{50} representa la dosis necesaria para lograr un 50% de inhibición máxima.

Figura 7. scFv(TF)3e10 inhibe de forma no competitiva la activación de FX por el complejo FVIIa/TF. El ensayo de activación de FX se llevó a cabo como se describirá en el Ejemplo 4 usando scFv(TF)3e10 expresado en bacterias, FX y el complejo FVIIa/TF 25 nM a 400 nM sobre una superficie de

fosfolípidos (FVIIa 10 pM). Se titularon concentraciones crecientes de scFv(TF)3e10 en el ensayo (0 nM, cuadrados abiertos; 0,25 nM, rombos abiertos; 0,74 nM, triángulos abiertos, 2,2 nM, círculos abiertos; 6,7 nM, rombos rellenos, 20 nM, triángulos rellenos). Este gráfico de Lineweaver-Burk de $(1/[S])$, donde S (sustrato) = factor X (μM); versus $1/v$, donde v (velocidad) = mDO/min de la hidrólisis de S2222 por el FXa producido durante un intervalo de 5 min) indica que scFv(TF)3e10 es un inhibidor no competitivo con respecto al sustrato, FX. Todas las líneas se cortan en (o cerca) del eje de las x como se anticipa para un inhibidor no competitivo (para un inhibidor competitivo todas las líneas se cortan sobre el eje y).

Figura 8. scFv(TF)3e10 es eficaz en un modelo de coagulación intravascular diseminada ("DIC") *in vivo*. El anticuerpo contra TF, scFv(TF)3e10, expresado en células CHO fue evaluado en el modelo de tromboembolia en rata que se describe en el Ejemplo 6 para (A) porcentaje de mortalidad y (B) calificación de morbilidad-mortalidad. (A) En el grupo tratado con vehículo, la dosis de TF usada dio como resultado un 60% de letalidad (LD_{50}). El compuesto scFv(TF)3e10 a 0,7 nmol/kg no afectó las muertes, pero a 7,0 nmol/kg redujo la letalidad a <40%. (B) En el grupo tratado con vehículo, la dosis *in vivo* de TF dio como resultado una

calificación promedio de morbilidad-mortalidad de 2,6. El compuesto scFv(TF)3e10 a 0,7 nmol/kg no tuvo efecto sobre las muertes y poco o ningún efecto sobre la dificultad respiratoria, pero a 14 nmol/kg, la calificación promedio de morbilidad-mortalidad era reducida a ~1,5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

El anticuerpo anticoagulante de la presente invención es un anticuerpo que se une con mayor afinidad al complejo de factor VIIa/factor tisular ("FVIIa/TF") que al factor tisular ("TF") solo. El anticuerpo de la invención se une con una afinidad al menos 2 veces mayor, preferentemente con una afinidad al menos 5 veces mayor y más preferentemente con una afinidad al menos 10 veces mayor, al complejo FVIIa/TF que al TF solo. El anticuerpo de la invención tampoco compite por la unión a TF con uno o más factores de coagulación seleccionados del grupo formado por el factor VII ("FVII"), el factor IX ("FIX") y el factor X ("FX"). Preferentemente, el anticuerpo de la invención no compite por la unión a TF con FVII y con FX.

Definiciones:

En la descripción de la presente invención, se utilizarán los siguientes términos como se definen a continuación.

Las "proteínas o los polipéptidos recombinantes" se refieren a proteínas o polipéptidos producidos mediante

técnicas de ADN recombinante, es decir, producidos a partir de células, microbianas o de mamífero, transformadas con una construcción de ADN exógeno que codifica el polipéptido deseado. Las proteínas o los polipéptidos expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos estarán libres de glucano. Las proteínas o los polipéptidos expresados en levadura pueden contener un patrón de glicosilación diferente del expresado en células de mamífero.

Las proteínas o los polipéptidos "nativos" se refieren a proteínas o polipéptidos recuperados a partir de una fuente natural. El término "anticuerpo nativo" incluye anticuerpos naturales y fragmentos de los mismos.

Una "secuencia de codificación" de ADN es una secuencia de ADN que se transcribe en ARNm y que se traduce en un polipéptido en una célula huésped cuando se encuentra bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de inicio en el extremo N-terminal 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo C-terminal 3'. La secuencia de codificación puede incluir secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariote, secuencias de ADN genómico de ADN eucariote y secuencias de ADN sintético. La secuencia de terminación de la transcripción se ubica habitualmente 3' con respecto a la secuencia de codificación.

Una "secuencia de nucleótidos" es un heteropolímero de desoxirribonucleótidos (bases de adenina, guanina, timina o citosina). Las secuencias de ADN que codifican los anticuerpos de esta invención se pueden ensamblar a partir de fragmentos sintéticos de ADN derivados de ADNc y ligadores de oligonucleótidos cortos para obtener un gen sintético que tiene capacidad de expresarse en un vector de expresión recombinante. Al describir la estructura de moléculas particulares de ADN de cadena doble, las secuencias se describirán de acuerdo con la convención normal de solamente mencionar la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcripta de ADNc.

Un "vector de expresión recombinante" es una construcción de ADN replicable usado ya sea para amplificar o para expresar el ADN que codifica los anticuerpos de la presente invención. Un vector de expresión contiene secuencias de ADN control y una secuencia de codificación. Las secuencias de ADN control incluyen secuencias promotoras, sitios de unión a ribosomas, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, potenciadores y dominios reguladores 5'. Los sistemas de expresión recombinantes definidos aquí expresarán los anticuerpos por inducción de los elementos reguladores.

Las "células huésped transformadas" se refieren a células que han sido transformadas y transfectadas con ADN exógeno. El ADN exógeno puede estar integrado, o no, (ligado covalentemente) al ADN cromosómico que conforma el genoma de la célula. En procariotas y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno se puede mantener sobre un elemento episómico, tal como un plásmido, o se puede integrar de forma estable en el ADN cromosómico. Con respecto a las células eucariontes, una célula transformada de manera estable es aquella en la cual el ADN exógeno está integrado en la replicación del cromosoma. Esta estabilidad queda demostrada por la capacidad de las líneas o clones de células eucariontes para producir una población de células hija que contienen al ADN exógeno

Los términos "análogo", "fragmento", "derivado" y "variante", con referencia a los anticuerpos de esta invención, significan análogos, fragmentos, derivados y variantes de los anticuerpos que retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica, como se describirá más adelante.

Un "análogo" incluye un pro-polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de esta invención. El anticuerpo activo de esta invención puede ser clivado de los aminoácidos adicionales que completan la molécula de pro-anticuerpo mediante procesos naturales, in vivo o

mediante procedimientos bien conocidos en el arte, tal como por clivaje enzimático o químico. Por ejemplo, el polipéptido recombinante scFV(TF)3e10 (SEQ ID N°:1) se expresa como un pro-polipéptido de 282 aminoácidos que luego es proceado *in vivo* para liberar el polipéptido maduro activo de 264 aminoácidos.

Un "fragmento" es una porción del anticuerpo de la invención que retiene sustancialmente una actividad funcional similar, tal como se muestra en los ensayos *in vitro* descritos más adelante en la presente.

Un "derivado" incluye todas las modificaciones de los anticuerpos de esta invención que permiten preservar sustancialmente las funciones que aquí se describen e incluyen una función de estructura y ayudante adicional, por ejemplo, anticuerpos tratados con PEG, que poseen una mayor vida media, y anticuerpos biotinilados, como se describirá más adelante. Un derivado también incluye anticuerpos N- u O-ligados glicosilados que se pueden generar por inserción de sitios de N- u O- glicosilación en las secuencias del anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante estándar.

Los términos, "actividad funcional sustancialmente similar" y "sustancialmente la misma función biológica o actividad" significan cada uno que un polipéptido posee un grado de actividad biológica que comprende entre aproximadamente un 30% y 100% o más de la actividad

biológica demostrada por el polipéptido con el cual está siendo comparado cuando la actividad biológica de cada polipéptido se determina con el mismo procedimiento o ensayo. Por ejemplo, un anticuerpo que posee una actividad funcional sustancialmente similar al anticuerpo del Ejemplo 1 (SEQ ID N°:1) es aquella que, cuando se evalúa en el ensayo de hidrólisis del péptido sTF/FVIIa y los ensayos de activación de FX descritos en el Ejemplo 4, demuestra capacidad para unirse o para neutralizar el complejo de FVIIa/TF.

La "similitud" entre dos polipéptidos se determina por comparación de la secuencia de aminoácidos y los sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Dichas sustituciones conservadoras incluyen las que se describieron previamente en *The Atlas of Protein Sequence and Structure 5* de Dayhoff (1978) y de Argos (1989) *EMBO J.* 8: Por ejemplo, los aminoácidos que pertenecen a uno de los siguientes grupos representan cambios conservadores:

- Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr;
- Cys, Ser, Tyr, Thr;
- Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;
- Lys, Arg, His;
- Phe, Tyr, Trp, His; y
- Asp, Glu.

Un "anticuerpo", tal como se utiliza aquí, incluye moléculas intactas de inmunoglobulina ("Ig"), así como fragmentos de los mismos, tal como Fab, F(ab')₂ y Fv, que tienen la capacidad de unirse a un epítopo de la proteína blanco seleccionada, por ejemplo, TF soluble ("sTF"). Típicamente, se requieren al menos 6, 8, 10 ó 12 aminoácidos contiguos para formar un epítopo. Sin embargo, los epítopos que comprenden aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo al menos 15, 25 ó 50 aminoácidos.

Todos los demás términos técnicos usados aquí tienen el mismo significado que el uso común entre los especialistas en el arte al cual pertenece la presente invención.

Anticuerpos de la invención y generación de los mismos:

Los anticuerpos anticoagulantes de esta invención se unen con mayor afinidad al complejo del factor VIIa/factor tisular ("FVIIa/TF") que al factor tisular ("TF") solo. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención se unen con una afinidad al menos 2 veces mayor al complejo FVIIa/TF que al TF solo, más preferentemente con una afinidad al menos 5 veces mayor y más preferentemente aún con una afinidad al menos 10 veces mayor, medido en un ensayo de microcalorimetría. En otra realización preferida de esta invención, los anticuerpos tampoco compiten con uno o más factores de coagulación seleccionados del grupo formado por los factores VII ("FVII"), IX ("FIX") y X ("FX")

por su unión al TF. En una realización más preferida, los anticuerpos de la invención no compiten con FVII y con FX por la unión al TF. En la realización más preferida, los anticuerpos de la invención se unen con mayor afinidad al complejo FVIIa/TF que al TF solo y no compiten por la unión a TF con FVII y con FX.

En términos generales, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína blanco seleccionada (por ejemplo, el complejo FVIIa/TF o TF) provee una señal de detección al menos 5, 10 ó 20 veces mayor que la señal de detección provista por otras proteínas en un ensayo inmunoquímico. Preferentemente, los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína blanco seleccionada no detectan otras proteínas en ensayos inmunoquímicos y pueden inmunoprecipitar la proteína de interés de la solución.

La proteína blanco seleccionada se puede usar para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobayos, monos o seres humanos para producir anticuerpos policlonales. Si se deseara, la proteína blanco se puede conjugar con una proteína vehículo, tal como albúmina de suero bovino, tiroglobulina y hemocianina de lapa. Dependiendo de la especie del huésped, se pueden usar diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, por ejemplo, adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido

de aluminio) y sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleaginosas, hemocianina de lapa y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, son de especial utilidad: BCG (bacilos Calmette-Guerin) y *Cornybacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la proteína blanco seleccionada se pueden preparar usando cualquier técnica que provee la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo.. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridomas, la técnica de hibridomas de células B humanas y la técnica de hibridomas del EBV (Kohler et al. (1985) *Nature* 256: 495-497; Kozbor et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 81: 31-42; Cote et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80: 2026-2030; y Cote et al. (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120).

Además de las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", se puede usar el procesamiento de genes de anticuerpos de ratón para genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con una especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81: 6851-6855; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312: 604-608; Takeda et al. (1985) *Nature* 314: 452-454). Los anticuerpos monoclonales y

otros anticuerpos también pueden ser "humanizados" para impedir que un paciente genere una respuesta inmune contra el anticuerpo cuando se usa en aplicaciones terapéuticas. Dichos anticuerpos pueden ser suficientemente similares en cuanto a secuencia a los anticuerpos humanos como para utilizarlos directamente o bien, puede ser necesario efectuar una alteración de unos pocos residuos clave. Las diferencias en cuanto a secuencia entre los anticuerpos de roedores y las secuencias humanas pueden ser minimizadas por sustitución de los residuos que difieren de los de las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida al sitio de residuos individuales o por injerto de regiones enteras determinantes de la complementariedad. Como alternativa, es posible producir anticuerpos humanizados usando métodos recombinantes, como se describe en GB2188638B. Los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína blanco seleccionada pueden contener sitios de unión a antígenos que están parcial o completamente humanizados, como se describe en la Patente de los Estados Unidos N°: 5.565.332.

Como alternativa, es posible adaptar las técnicas descriptas para la producción de anticuerpos de cadena simple usando métodos conocidos en el arte para producir los anticuerpos de cadena simple ("scFv") que se unen específicamente a la proteína blanco seleccionada. Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta

composición idiotípica, pueden ser generados por combinación o entremezclado de cadenas a partir de bibliotecas de Ig combinatorias y aleatorias (Burton (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88:11120-11123).

Los anticuerpos de cadena simple también se pueden construir usando un método de amplificación de ADN, tal como PCR, usando ADNc de hibridomas como templado (Thirion et al. (1996) *Eur. J. Cancer Prev.* 5:507-511). Los anticuerpos de cadena simple pueden ser mono o bi-específicas y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos de cadena simple tetravalentes, bi-específicas se describe, por ejemplo, en Coloma y Morrison (1997) *Natl. Biotechnol.* 15: 159-163). La construcción de anticuerpos de cadena simple bivalentes, bi-específicos se describe en Mallendar y Voss (1994) *J. Biol. Chem.* 269:199-216).

La secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de cadena simple se puede construir usando síntesis de nucleótidos manual o automática, luego se puede clonar en una construcción de expresión usando métodos de ADN recombinante estándar e introducir en una célula para expresar la secuencia de codificación. Como alternativa, los anticuerpos de cadena simple se pueden producir directamente usando, por ejemplo, la tecnología de expresión en fagos filamentosos (Verhaar et al. (1995) *Int. J. Cancer* 61: 497-501; y Nicholls et al. (1993) *J. Immunol. Meth.* 165:81-91).

Los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína blanco seleccionada también se pueden producir por inducción *in vivo* de la producción en una población de linfocitos o mediante el rastreo y examen de bibliotecas de Ig o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describe en la literatura. (Orlandi et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 3833-3837; Winter et al. (1991) *Nature* 349:293-299).

El ADN que codifica el anticuerpo de la invención se puede clonar en la forma de ADNc o ADN genómico mediante cualquier procedimiento de clonación conocido por los especialistas en el arte. Véase por ejemplo, Sambrook, J.F. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), cuyo contenido se incorpora en este documento a modo de referencia).

En el caso donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, una vez identificada una secuencia de ADN que codifica una región Fv que, cuando se expresa, presenta una actividad de unión específica, los anticuerpos que comprenden dicha región Fv se pueden preparar mediante métodos conocidos por los especialistas en el arte. Así, por ejemplo, Chaudhary, V.K. et al. (1989) *Nature* 339(6223): 394-397; Batra, J.K. et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265(25): 15198-15202; Batra, J.K. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86(21): 8545-8549; Chaudhary, V.K. et al. (1990)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(3):1066-1070, todas incorporadas a modo de referencia, describen la preparación de diversas proteínas de anticuerpos de cadena simple.

En un enfoque preferido, los anticuerpos contra TF de la invención son anticuerpos de cadena simple, que se preparan usando una biblioteca de expresión en fagos. La región de unión al epítopo del anticuerpo de cadena simple está compuesto de dos dominios de regiones variables: uno de la cadena pesada y el otro de la cadena liviana. En el primer paso de la construcción de la biblioteca de expresión en fagos, los genes variables (V_H (de la IgM) V_K y V_L) fueron clonados por PCR a partir de ARNm agrupado de médula ósea, nódulo linfático y bazo humanos usando un conjunto de cebadores específicos de la familia. Las bibliotecas resultantes pCITE- V_H ($3,8 \times 10^8$ miembros), pZ604- V_K ($1,6 \times 10^7$) y pZ604- V_L ($3,2 \times 10^7$) representan la diversidad permanente y alta de genes V. Los genes V_H fueron amplificados a partir de la biblioteca pCITE- V_H . Los genes V_D y V_L fueron amplificados por PCR a partir de las bibliotecas pZ604- V_K y pZ604- V_L con una J_H inversa y una secuencia ligadora en el extremo 5'. A continuación, los genes V_H , V_K y V_L purificados sobre gel que contienen los productos de la PCR fueron procesados juntos para obtener el repertorio de genes scFv. El repertorio de genes scFV se

clonó en el vector Phagemid pZ603 y el producto de la ligación fue sometido a electroporación en células TG1 competentes de *E. coli* para generar la biblioteca scFv de expresión en fagos, HuPhabL3, con $5,2 \times 10^9$ transformantes individuales (Kay, B.K. et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego CA; Marks, J.D. et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222(3): 581-597; Sheets, M.D. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95(11):6157-6162).

Se seleccionó y amplificó el fago que se une al TF de la biblioteca de expresión fagos scFv y posteriormente se identificó usando las técnicas de paneo que son bien conocidas en el arte. El TF soluble es inmovilizado en tubos de plástico, y se puede usar leche descremada para reducir la unión no específica al plástico. La población de fago scFv fue expuesto al sTF inmovilizado en los tubos de plástico, y luego se eliminó el fago no unido por lavado exhaustivo. El fago scFv que se une a TF es eluido de los tubos y luego es amplificado por infección de células TG1 de *E. coli* en solución. Este procedimiento de paneo se repitió tres veces y el fago scFv que se une a TF resultante se aisló por transformación de células TG1. Los transformantes que expresan los anticuerpos que se unen a TF se identificaron usando un ELISA estándar con sTF inmovilizado sobre plástico en placas de 96 cavidades. Se secuenciaron

los insertos de ADN del anticuerpo de cadena simple de los transformantes positivos del ELISA. Basado en la secuenciación del ADN, se identificaron seis anticuerpos de cadena simple únicos, scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6, scFv(TF)3e10 y scFv(TF)3h2, y se expresaron y purificaron a partir de *E. coli* y luego se caracterizaron como se describirá más adelante en el Ejemplo 5.

Expresión y purificación de los anticuerpos de la invención:

Existen numerosas formas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención *in vitro*, incluyendo en *E. coli*, baculovirus, levadura, células de mamífero u otros sistemas de expresión. Los métodos de expresión de los genes clonados en bacterias son bien conocidos. A fin de obtener un alto nivel de expresión de un gen clonado en un sistema procariota, resulta esencial construir vectores de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la terminación de la transcripción del ARNm. Los ejemplos de regiones reguladoras adecuadas para tal fin son la región promotora y operadora del gen de beta-glucosidasa de *E. coli*, la vía de biosíntesis de triptofano de *E. coli* o el promotor izquierdo del Fago Lambda. Es de utilidad la inclusión de marcadores de selección en los vectores de ADN transformados en *E. coli*. Los ejemplos de dichos marcadores

incluyen los genes que especifican resistencia a ampicilina, tetraciclina o cloranfenicol.

Entre los sistemas de células eucariotas superiores que son de utilidad para la expresión de los anticuerpos de la invención, y análogos, fragmentos, derivados o variantes de los mismos, existen numerosos sistemas de células para elegir. Los ejemplos ilustrativos de líneas celulares de mamífero incluyen, por ejemplo, las células RPMI 7932, VERO y HeLa, las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), las líneas celulares WI38, BHK, COS-7, C127 o MDCK. La línea celular de mamífero preferida es CHL-1. Cuando se usa CHL-1 se incluye higromicina como marcador de selección eucarionte. Las células CHL-1 derivan de las células de melanoma RPMI 7032, una línea de células humanas fácilmente disponible. La línea de células CHL-1 está depositada con ATCC de acuerdo con las condiciones del Tratado de Budapest y recibió el número CRL 9446, depositada el 18 de junio, 1987. Las células adecuadas para su uso en esta invención se encuentran disponibles comercialmente de ATCC. Las líneas celulares ilustrativas incluyen las de *Spodoptera frugiperda* y *Bombyx mori*.

Con el sistema procariota, *E. coli*, no es posible efectuar una modificación de post-traduccion, tal como glicosilación. Además, las proteínas con patrones disulfuro complejos a menudo sufren plegamientos erróneos cuando se

expresan en *E. coli*. Con el sistema procariota, la proteína expresada está presente en el citoplasma celular en una forma insoluble denominada cuerpo de inclusión, presente en la fracción soluble después de lisar las células o bien, es dirigida hacia el periplasma por adición de secuencias de señal de secreción apropiadas. Si la proteína expresada se encuentra en cuerpos de inclusión insolubles, habitualmente se requiere de la solubilización y subsiguiente replegamiento de los cuerpos de inclusión.

Existen muchos vectores de expresión procariotas que son conocidos por los especialistas en el arte, tal como pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.) y pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, EE.UU.), todos disponibles comercialmente.

Los promotores utilizados comúnmente en los sistemas de expresión recombinantes microbianos incluyen el sistema de la beta-lactamasa (penicilinasa) y el sistema promotor de lactosa (Chang, A.C. et al. (1978) *Nature* 275(5681): 617-624; Goeddel, D.V. et al. (1979) *Nature* 281(5732): 544-548), el sistema promotor de triptofano (*trp*) (Goeddel, D.V. et al. (1980) *Nucl. Acids Res.* 4057-4074) y el promotor *tac* (Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Otro sistema de expresión bacteriano que es de utilidad emplea el

promotor pL del fago lambda y el represor termoinducible cIts857 (Bernard, H.U. et al. (1979) *Gene* 5(1): 59-76; Love, C.A. et al. (1996) *Gene* 176(1-2): 49-53). Los anticuerpos recombinantes también se pueden expresar en huéspedes de levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. Habitualmente permite efectuar diversas modificaciones de post-traducción. El anticuerpo expresado puede ser secretado hacia el sobrenadante del cultivo donde no hay muchas otras proteínas, lo cual facilita la purificación. Los vectores para la expresión en levadura de los anticuerpos en esta invención presentan determinadas características necesarias. Los elementos del vector derivan generalmente de levaduras y bacterias a fin de permitir la propagación del plásmido en ambos. Los elementos bacterianos incluyen un origen de replicación y un marcador seleccionable. Los elementos de levadura incluyen una secuencia de origen de replicación (ARS), un marcador seleccionable, un promotor y un terminador de la transcripción.

Los promotores adecuados en los vectores para expresión en levadura incluyen los promotores del gen TRP1, del gen ADH1 o ADHII, del gen de la fosfatasa ácida (PH03 o PH05), el gen del isocitocromo o los promotores comprometidos con la vía glucolítica, tal como el promotor de enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), hexoquinasa, piruvato quinasa,

triosafosfato isomerasa y fosfoglucosa isomerasa (Hitzeman, R.A. et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255(24): 12073-12080; Hess, B. et al. (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 149-167; y Holland, M.J. y Holland, J.P. (1978) *Biochemistry* 17(23):4900-4907).

Los vectores para levadura disponibles comercialmente incluyen pYES2, pPIC9 (Invitrogen, San Diego, CA), Yepc-pADH2a, pYcDE-1 (Washington Research, Seattle, WA), pBC102-K22 (ATCC N° 67255) e YpGX265GAL4 (ATCC N° 67233). Las líneas de células de mamíferos que se pueden emplear para expresar los anticuerpos recombinantes en esta invención incluyen, a modo de ejemplo, células COS-7, L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, BHK, CHL-1, NSO y HEK293. Las proteínas recombinantes producidas en células de mamífero habitualmente son solubles y glicosiladas y poseen extremos N-terminales auténticos. Los vectores de expresión de mamífero pueden contener elementos no transcriptos, tal como un origen de replicación, un promotor y un potenciador y secuencias no traducidas 5' o 3', tal como sitios de unión a ribosomas, sitios de poliadenilación, sitios aceptores y un donante de procesamiento y secuencias de terminación de la transcripción. Los promotores que se pueden utilizar en los vectores de expresión de mamífero son habitualmente, por ejemplo, promotores virales, tal como de polioma,

adenovirus, HTLV, virus 40 simio (SV 40) y citomegalovirus humano (CMV).

Según el sistema de expresión y el huésped seleccionados, se puede obtener un anticuerpo recombinante homogéneo utilizando diversas combinaciones de técnicas de cromatografía convencionales usados para la purificación de proteínas. Estas incluyen: cromatografía de inmutaoafinidad, cromatografía de fase reversa, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía con interacción hidrofóbica, cromatografía con filtración sobre gel y HPLC. Si el sistema de expresión secreta el anticuerpo hacia el medio de crecimiento, la proteína puede ser purificada directamente a partir del medio. Si el anticuerpo no es secretado, se lo puede aislar a partir de lisados celulares. La ruptura celular se puede efectuar utilizando cualquier método convencional, incluyendo ciclos de congelamiento-descongelamiento, sonicación, ruptura mecánica o uso de agentes de lisis de células.

Se utilizó una construcción de plásmido basado en pCANTAB5 (Pharmacia) se para la expresión en bacterias de los anticuerpos de cadena simple de esta invención. Por ejemplo, un plásmido que contiene al anticuerpo de cadena simple scFv(TF)3e10 es el pZ612/3e10 y codifica la secuencia del anticuerpo de cadena simple seguido de una secuencia de

marca del epítope, que se puede usar para purificar la proteína. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo scFv(TF)3e10 corresponde a la SEQ ID N°:1 (Ejemplo 1) y la secuencia de ADN que codifica scFv(TF)3e10 corresponde a la SEQ ID N°:2.

Se usó la construcción de plásmido basado en pTHR525 (véase la Patente de los Estados Unidos N°: 5.827.824) para la expresión en mamíferos de los anticuerpos de cadena simple de esta invención. Por ejemplo, se diseñaron cebadores para generar un fragmento de ADN que abarcara la secuencia de aminoácidos pro-scFv(TF)3e10, incluyendo la secuencia señal N-terminal y la secuencia de la marca de epítope C-terminal, en el plásmido de expresión en bacterias. Se efectuó una PCR para generar un fragmento de ADN que se insertó en el plásmido de expresión en mamíferos, que contiene al gen de resistencia a ampicilina y de los marcadores de selección con higromicina y DHFR. La expresión de los anticuerpos de cadena simple de la invención era dirigida por el promotor MPSV LTR.

En una realización preferida de esta invención, las construcciones de expresión de mamífero fueron transfectadas en células CHO DXB11. Se seleccionaron poblaciones estables usando higromicina B 400 µg/ml en el medio HAMS/F12. Los niveles de expresión fueron de aproximadamente 500 µg/l. Para incrementar los niveles de expresión se seleccionó una

población usando metotrexato 100 nM en medio alfa MEM. El nivel de expresión aproximado de esta población era de 5 mg/l.

Los anticuerpos de esta invención se pueden purificar mediante métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar por afinidad mediante pasaje a través de una columna a la cual se ha unido TF. Los anticuerpos contra TF unidos pueden ser eluidos luego de la columna usando una solución amortiguadora con una gran concentración de sales.

Los anticuerpos de cadena simple descritos en la presente contienen la secuencia de la marca del epítopo por el extremo C-terminal de la proteína. Las columnas de afinidad anti-marca del epítopo se adquirieron de American/Pharmacia Biotech. El medio de cultivo celular se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m y se cargaron 5 ml en una columna con la marca del epítopo a razón de 2 ml/min. La columna se lavó con solución amortiguadora de fosfato 0,2 M NaN_3 , 0,05%, pH 7,0, y luego se recolectó en tubos que contenían 0,1 volúmenes de solución amortiguadora Tris 1M, pH 8,2 para neutralizar la solución amortiguadora de elución. La columna se lavó con solución amortiguadora de fosfato 0,2 M NaN_3 , 0,05%, pH 7,0, y luego se recolectó en tubos que contenían 0,1 volúmenes de solución amortiguadora Tris 1M, pH 8,2 para neutralizar la solución amortiguadora

de elución. En este caso, la columna se lavó con ácido cítrico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 6,5 y se eluyó con la misma solución amortiguadora a pH 3,0. En ambos casos, las muestras purificadas se cargaron después en una columna Sephadex 200 para separar las formas monoméricas de las diméricas del anticuerpo.

Selección de los anticuerpos de la invención:

Una vez generados, expresados y purificados los anticuerpos, pueden ser caracterizado usando BIAcore, un ensayo con el factor VIIa dependiente del sTF (ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa), un ensayo de activación del FX y el ensayo de PT descrito en el Ejemplo 4 con el fin de identificar los anticuerpos de esta invención.

En una realización preferida de esta invención, se seleccionan los anticuerpos scFv contra TF que se unen con mayor afinidad al complejo FVIIa/TF que al TF solo usando el ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa. En este ensayo, se espera que los anticuerpos contra TF que se unen con mayor afinidad al complejo FVIIa/TF que al TF incrementen la $K_{D(app)}$. En la figura 2 se muestra que el anticuerpo de cadena simple scFv(TF)3e10 incrementó la $K_{D(app)}$ ~5 veces. Se emplea un ensayo de microcalorimetría para medir la afinidad de los anticuerpos contra TF por el complejo FVIIa/TF en comparación con el TF solo. En la figura 5 se muestra que el anticuerpo de cadena simple scFv(TF)3e10 tiene una K_D de

unión al complejo FVIIa/TF y al TF libre de 600 nM y 33 nM, respectivamente, lo cual corresponde a una afinidad ~20 veces mayor por el complejo FVIIa/TF en comparación con el TF solo. Los anticuerpos de esta invención tienen una afinidad al menos 2 veces, preferentemente al menos 5 veces y más preferentemente al menos 10 veces mayor por el complejo FVIIa/TF que por TF.

Los anticuerpos scFv que se unen al TF que no compiten con FVII por la unión al TF se seleccionan usando el ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa. En este ensayo, se espera que los anticuerpos contra TF que compiten con el FVIIa por la unión al TF inhiban la hidrólisis del sustrato cromogénico S2266. En la figura 1 se muestra que el anticuerpo de cadena simple scFv(TF)3e10 no inhibe, y en realidad aumenta, la actividad del FVIIa.

Los anticuerpos scFv que se unen al TF que inhiben la activación del FX se seleccionan usando el ensayo PT y el ensayo de activación de FX. En el ensayo PT, se espera que los anticuerpos contra TF que prolongan el PT inhiban la activación del FX. En la figura 3 se muestra que el anticuerpo de cadena simple scFv(TF)3e10 prolongaba la PT, lo cual indica que este anticuerpo inhibe la activación del FX. En el ensayo de activación de FX, se espera que los anticuerpos contra TF que inhiben la actividad FXa inhiban

la hidrólisis del sustrato cromogénico S2222. En la figura 6 se muestra que el anticuerpo de cadena simple scFv(TF)3e10 inhibía la actividad del FXa.

Los anticuerpos scFv contra TF que no compiten con el FX por la unión al TF se seleccionan usando el ensayo de activación del FX. En este ensayo, se espera que los anticuerpos contra TF que no compiten con el FX inhiban la activación del FX independientemente de la concentración de FX usada. En la figura 7 se muestra que el anticuerpo de cadena simple scFv(TF)3e10 inhibe la actividad FXa de una manera independiente de la concentración de FX.

En una realización preferida de la presente invención, se identificó un anticuerpo de cadena simple (scFv(TF)3e10) que tenía un solo sitio de unión V_H/V_L para TF. La secuencia de aminoácidos de scFv(TF)3e10 se muestra en el Ejemplo 1 y corresponde a la SEQ ID N°: 1. La secuencia de ADN que codifica scFv(TF)3e10 corresponde a la SEQ ID N°: 2.

Análogos, fragmentos, derivados y variantes de los anticuerpos de la invención:

Un análogo, fragmento, derivado o variante de los anticuerpos de la presente invención puede ser: (i) uno en el cual uno o varios de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede

estar codificado, o no, por el código genético; o (ii) uno en el cual uno o varios de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (iii) uno en el cual el anticuerpo maduro está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la vida media del anticuerpo (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el cual hay aminoácidos adicionales fusionados a la proteína de fusión madura, tal como una secuencia directriz o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del anticuerpo maduro. Dichos análogos, fragmentos, derivados y variantes se consideran dentro del alcance para los especialistas en el arte a partir de la presente descripción.

Preferentemente, los derivados de la presente invención van a contener sustituciones de aminoácidos conservadores (definidos más adelante) efectuadas en uno o varios residuos de aminoácidos predichos, preferentemente no esenciales. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado en la secuencia de tipo salvaje de una proteína sin alterar la actividad biológica, en tanto se requiere de un residuo de aminoácido "esencial" para la actividad biológica. Una "sustitución de aminoácidos conservadores" es aquella en la cual el residuo de aminoácido es reemplazado por un residuo de aminoácido que posee una cadena lateral similar. En el arte se han definido familias de residuos de

aminoácidos que poseen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acídicas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales ramificadas en posición beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Las sustituciones no conservadoras no se harán para residuos de aminoácidos conservados o para residuos de aminoácidos ubicados dentro de un dominio conservado de una proteína, a menos que las sustituciones se efectúen para seleccionar variantes de los anticuerpos como se describirá más adelante. Los fragmentos o porciones biológicamente activas incluyen fragmentos de polipéptidos adecuados para su uso como medicamentos, como un reactivo de investigación y semejantes. Los fragmentos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares o derivados de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de esta invención y que presentan al menos una actividad de dicho polipéptido, pero que incluyen menos aminoácidos que

los polipéptidos de longitud completa descriptos en la presente.

Más aún, los derivados preferidos de la presente invención incluyen anticuerpos maduros que se han fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la vida media del polipéptido y/o para reducir la inmunogenicidad potencial del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol, "PEG"). El PEG se puede usar para impartir solubilidad en agua, mayor tamaño, disminuir la velocidad de depuración en riñones y reducir la inmunogenicidad al anticuerpo. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N°: 6.214.966. En el caso de tratamientos con PEG, la fusión del anticuerpo a PEG se puede llevar a cabo utilizando cualquier medio conocido por el especialista en el arte. Por ejemplo, el tratamiento con PEG se puede llevar a cabo introduciendo primero una mutación de cisteína en el anticuerpo, seguido de una derivatización específica del sitio con PEG-maleimida. La cisteína se puede agregar al extremo C-terminal de los péptidos. Véase, por ejemplo, Tsutsumi et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97(15):8548-8553. Otra modificación que se puede efectuar en el anticuerpo comprende biotinilación. En algunas instancias, puede ser de utilidad un anticuerpo biotinilado para que pueda reaccionar rápidamente con estreptavidina. Los métodos de biotinilación de proteínas son bien conocidos

en el arte. Además, se pueden introducir sitios de N- u O-glicosilación en las secuencias del anticuerpo de modo que pueda tener lugar una glicosilación N- u O-ligado de los anticuerpos después de la traducción *in vivo*.

Las variantes de los anticuerpos de esta invención incluyen polipéptidos que poseen una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos originales. El término "suficientemente similar" significa que hay una primera secuencia de aminoácidos que contiene una cantidad suficiente o mínima de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes con relación a una segunda secuencia de aminoácidos de modo que dichas primera y segunda secuencias de aminoácidos poseen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que es al menos un 45% aproximadamente, preferentemente un 75% a 98% aproximadamente, idéntico se define aquí como suficientemente similar. Preferentemente, las variantes serán suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos preferidos de esta invención. Las variantes incluyen variantes de anticuerpos codificados por un polinucleótido que se hibridiza con un polinucleótido de esta invención o un complemento del mismo bajo condiciones severas. Dichas variantes retienen en general la

actividad funcional de los anticuerpos de esta invención. Se pueden usar bibliotecas de fragmentos de los polinucleótidos para generar una población variegada de fragmentos para el rastreo y subsiguiente selección. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de fragmentos mediante tratamiento de un fragmento de PCR de cadena doble de un polinucleótido con una nucleasa bajo condiciones donde el corte "nicking" solamente se produce una vez por molécula, desnaturalización del ADN de cadena doble, renaturalización del ADN para formar ADN de cadena doble que puede incluir pares orientados en el sentido del marco de lectura/antisentido de diferentes productos recortados, eliminación de porciones de cadena simple a partir de duplas reformadas mediante tratamiento con la nucleasa S1 y ligación la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Utilizando este método, es posible derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de distintos tamaños de los anticuerpos de esta invención.

Las variantes incluyen anticuerpos que difieren en cuanto a secuencia de aminoácidos debido a una mutagénesis. Por ejemplo, la mutagénesis se puede efectuar de acuerdo con las técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el arte para modificar los dominios V_L y V_H de las cadenas livianas y pesadas de Ig para crear variantes con una mayor afinidad de unión con el complejo FVIIa/TF en comparación con el TF

libre. Las variantes particularmente referidas incluyen anticuerpos con modificaciones en las regiones determinantes de la complementariedad de los dominios V_L y V_H .

Las variantes también incluyen anticuerpos que difieren en cuanto a secuencia de aminoácidos debido a la inserción o supresión de residuos de aminoácidos por mutagénesis. Por ejemplo, la mutagénesis se puede efectuar de acuerdo con técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el arte para insertar o suprimir aminoácidos en las porciones N-terminales o C-terminales de los dominios V_H o V_L de las cadenas liviana y pesada de Ig para crear variantes que retienen una actividad funcional sustancialmente similar. Las variantes particularmente referidas incluyen anticuerpos de cadena simple con inserciones o supresiones de residuos de aminoácidos en el ligador V_H-V_L entre los dominios V_H y V_L . La secuencia del ligador V_H-V_L en el anticuerpo de cadena simple de los en el ejemplo 1 es de 5 residuos de aminoácidos de longitud. Se pueden emplear, evidentemente, otras secuencias cortas de ligadores, entre 0 a 20 aminoácidos, donde el anticuerpo retiene una actividad funcional sustancialmente similar. Las modificaciones del ligador V_H-V_L existente pueden apuntar a incrementar la estabilidad de la forma dimérica del anticuerpo de cadena simple.

En una realización, se genera una biblioteca variegada de variantes por mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y está codificada por una biblioteca de genes variegados. La biblioteca variegada de variantes se puede producir, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en las secuencias de genes de modo tal que se obtiene un conjunto degenerado de variantes potenciales de secuencias de aminoácidos que se puedan expresar como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para expresión en fagos) que contienen el conjunto de secuencias. Existen numerosos métodos que se pueden utilizar para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de secuencias de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia genética degenerada se puede llevar a cabo con un sintetizador automático de ADN y el gen sintético se puede ligar luego en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto de genes degenerados permite proveer, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de variantes potenciales de las secuencias. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Narang (1983) *Tetrahedron* 39: 3; Itakura et al. (1984a) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura et al. (1984b) *Science* 198: 1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

En el arte se conocen numerosas técnicas para examinar productos de genes de bibliotecas combinatorias obtenidas mediante mutaciones puntuales o truncamientos y para rastrear y examinar bibliotecas de ADNc por productos genéticos que poseen una propiedad seleccionada. Dichas técnicas pueden ser adaptadas para efectuar un examen rápido de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de anticuerpos contra la actividad de unión del TF o del complejo FVIIa/TF o la actividad inhibidora de la activación del FX. Las técnicas de mayor uso, que son propicias para un análisis de alto rendimiento para examinar grandes bibliotecas de genes incluyen típicamente la clonación de la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformación de las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresión de los genes combinatorios bajo condiciones en las cuales la detección de la actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. La mutagénesis de ensamblaje recursiva (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, se puede usar en combinación con los ensayos de rastreo y examen para identificar las variantes deseadas.

En el ejemplo 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de cadena simple contra TF, scFv(TF)3e10 (SEQ ID N°:1), y se delinea el ligador V_H-V_L y los dominios

V_H y V_L. Las variantes que tienen actividad de unión al TF o al complejo FVIIa/TF o que inhiben la activación de FX se pueden identificar por examen bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes de inserción, truncamiento o puntuales, de los anticuerpos de esta invención usando los ensayos de hidrólisis de péptidos de sTF/FVIIa o de activación del FX que se describen en el ejemplo 4. Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos de los ejemplos 1 y 3 (SEQ ID N°: 1 y 3), así como aquellos anticuerpos que contienen variaciones no significativas en la secuencia de los mismos. Una "variación no significativa" incluiría cualquier variante de la secuencia de sustitución o supresión que permita conservar sustancialmente al menos una función biológica de los anticuerpos de esta invención, por ejemplo, la capacidad para inhibir la activación del FX. Estos equivalentes funcionales pueden incluir preferentemente anticuerpos que presentan al menos un 90% de identidad aproximadamente con los dominios de la región V_L o V_H del anticuerpo de cadena simple de la SEQ ID N°:1 o de la SEQ ID N°:3, y más preferentemente al menos un 95% de identidad con los dominios de la región V_L o V_H del anticuerpo de cadena simple de la SEQ ID N°:1 o de la SEQ ID N°:3 y más preferentemente aún al menos un 97% de identidad con los dominios V_L o V_H de la región del anticuerpo de cadena

simple de la SEQ ID N°:1 o de la SEQ ID N°:3 y también incluyen porciones de dicho anticuerpo que poseen sustancialmente la misma actividad biológica. Sin embargo, cualquier anticuerpo que presenta una variación no significativa en cuanto a secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la SEQ ID N°: 1 o de la SEQ ID N°:3 que demuestra una equivalencia funcional, como se describirá más adelante con mayor detalle, está incluida en la descripción de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas:

La invención también provee composiciones farmacéuticas que pueden ser administradas a un paciente con el fin de lograr un efecto terapéutico. Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden preparar para la administración combinando el anticuerpo de esta invención que posee el grado de pureza deseado con una cantidad eficaz para uso farmacéutico de vehículos aceptables para uso fisiológico.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear en composiciones farmacéuticas, para una administración intravenosa o una administración subcutánea o una administración intratecal. Así, los anticuerpos descritos precedentemente se combinarán preferentemente con un vehículo estéril aceptable para uso farmacéutico, tal como dextrosa al cinco por ciento, solución de Ringer con

lactato, salina normal, agua estéril o cualquier otra solución amortiguadora fisiológica preparada comercialmente diseñado para una infusión intravenosa. Se debe tener en cuenta que la selección de la solución del vehículo y la dosificación y administración de la composición varía con el sujeto y el estado clínico particular y está sujeta a los procedimientos médicos estándar.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, estas composiciones farmacéuticas pueden ser administradas en cantidades eficaces para inhibir las consecuencias patológicas asociadas con una generación excesiva de trombina en el sujeto.

La administración del anticuerpo puede ser por inyección intravenosa de un bolo, por infusión intravenosa constante o por una combinación de ambas rutas. Como alternativa, o además, el anticuerpo se mezcla con los excipientes apropiados para su incorporación en la circulación desde un sitio intramuscular. El tratamiento sistémico con la proteína de fusión puede ser monitoreada con la determinación del tiempo de tromboplastina activada parcial (PT) en una serie de muestras de sangre extraídas del paciente. El tiempo de coagulación observado en este ensayo está prolongado cuando se logra un nivel suficiente del anticuerpo en la circulación general.

Los anticuerpos recombinantes y las composiciones farmacéuticas de esta invención son de utilidad para la administración por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral o local. Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas en diversas formas de dosificación unitaria según el método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria pueden ser administradas en formas que incluyen, por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvo, soluciones y emulsiones.

Los anticuerpos recombinantes y las composiciones farmacéuticas de esta invención son de particular utilidad para una administración por vía intravenosa. Las composiciones que serán administradas comprenden habitualmente una solución del anticuerpo de cadena simple disuelto en un vehículo aceptable para uso farmacéutico, preferentemente en un vehículo acuoso. Se pueden emplear diversos vehículos acuosos, por ejemplo, solución amortiguadora salina y semejantes. Estas soluciones son estériles y en general están libres de materiales no deseados. Las composiciones pueden ser esterilizadas utilizando las técnicas de esterilización convencionales que son bien conocidas.

La composición farmacéutica típica para una administración intravenosa puede ser determinada fácilmente por el especialista en el arte. Las cantidades administradas

son claramente específicas de la proteína y dependen de su potencia y perfil farmacocinético. Los métodos actuales para preparar composiciones de administración parenteral son conocidos o habituales para el especialista en el arte y se describen con mayor detalle en publicaciones tales como *Remington's Pharmaceutical Science*, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa (1980).

Las composiciones que contienen los anticuerpos de la invención o un cóctel de los mismos (es decir, con otras proteínas) se pueden administrar como tratamientos terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que sufre de una enfermedad o trastorno hemorrágico en una cantidad suficiente como para curar o al menos detener parcialmente la hemorragia. La cantidad adecuada para lograrlo se define como una "cantidad eficaz para uso terapéutico". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad de la enfermedad y el estado general de salud del paciente.

La administración simple o múltiple de las composiciones dependerá de la dosificación y frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición deberá proveer una cantidad suficiente de las proteínas de esta invención con el fin de tratar eficazmente al paciente.

Los anticuerpos de la invención, o las composiciones aceptables para uso farmacéutico de los mismos, se administrarán en una cantidad eficaz para uso terapéutico, que varía según numerosos factores incluyendo la actividad del anticuerpo específico empleado; la estabilidad metabólica y extensión de la acción del anticuerpo; la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del paciente; el modo y tiempo de administración; la velocidad de excreción; la combinación de drogas; la severidad del estado de enfermedad particular; y del huésped bajo terapia. En general, una cantidad eficaz para uso terapéutico diaria comprende entre aproximadamente 0,14 mg y 14,3 mg/kg de peso corporal por día de un anticuerpo de la invención, o una composición aceptable para uso farmacéutico del mismo; preferentemente, entre aproximadamente 0,7 mg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; y más preferentemente, entre aproximadamente 1,4 mg y aproximadamente 7,2 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, para la administración a una persona de 70 kg, el rango de dosificación comprendería entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 1,0 gramo por día de una proteína de fusión de la invención, o una composición aceptable para uso farmacéutico de la misma, preferentemente entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 700 mg por día y más

preferentemente entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg por día.

Terapia genética y celular:

Un anticuerpo de la invención también se puede emplear de acuerdo con la invención por expresión de dicho anticuerpo *in vivo*, mediante un método a menudo denominado "terapia celular". Así, por ejemplo, se pueden manipular células con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica el anticuerpo *ex vivo* y las células manipuladas son provistas luego a un paciente para su tratamiento con dicho anticuerpo. Dichos métodos son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden manipular células mediante procedimientos conocidos en el arte que comprenden el uso una partícula retroviral que contiene un ARN que codifica el anticuerpo de la presente invención.

Un anticuerpo de la invención también se puede emplear de acuerdo con la presente invención por expresión de dicha proteína de fusión *in vivo*, mediante un método a menudo denominado "terapia genética". Así, por ejemplo, se puede manipular un virus con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica el anticuerpo y a continuación se provee el virus manipulado al paciente a tratar con el anticuerpo. Dichos métodos son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden manipular adenovirus recombinantes mediante

procedimientos conocidos en el arte que contienen un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención.

La distribución local de los anticuerpos anticoagulantes de la presente invención mediante terapia genética o celular permite administrar el agente terapéutico en el área de interés, es decir las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos.

Se contemplan metodologías de terapia genética y celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Se conocen diversos métodos para transferir genes potencialmente terapéuticos a poblaciones de células definidas. Véase, por ejemplo, Mulligan (1993) *Science* 260:926-931) Estos métodos incluyen:

- 1) 1) Transferencia directa de genes. Véase, por ejemplo, Wolff et al. (1990) *Science* 247: 1465-1468;
- 2) 2) Transferencia de ADN mediada por liposomas. Véase, por ejemplo, Caplen et al. (1995) *Nature Med.* 39-46; Crystal (1995) *Nature Med.* 15-17; Gao y Huang (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:280-285).
- 3) 3) Transferencia de ADN mediada por retrovirus. Véase, por ejemplo, Kay et al. (1993) *Science* 262: 117-119; Anderson (1992) *Science* 256:808-813).
- 4) 4) Transferencia de ADN mediada por virus. Dichos virus a ADN incluyen adenovirus (preferentemente vectores basados en Ad2 o Ad5), virus *Herpes* (preferentemente vectores basados en el virus *Herpes*

simplex) y parvovirus (preferentemente vectores basados en parvovirus "defectuosos" o no autónomos, más preferentemente vectores basados en virus adeno-asociados, más preferentemente aún vectores basados en AAV-2). Véase, por ejemplo, Ali et al. (1994) *Gene Therapy* 1: 367-384; Patente de los Estados Unidos N°: 4.797.368, cuyo contenido se incorpora en este documento a modo de referencia, y Patente de los Estados Unidos N°: 5.139.941, cuyo contenido se incorpora en este documento a modo de referencia.

La elección de un sistema de vectores particular para transferir el gen de interés dependerá de diversos factores. Un factor importante es la naturaleza de la población de células de interés. Aunque se han estudiado y utilizado extensamente los vectores retrovirales en numerosas aplicaciones de terapia genética, en general, estos vectores no son adecuados para infectar células que no están en división. Además, los retrovirus adolecen de una potencial oncogenicidad. Sin embargo, desarrollos recientes en el campo de los vectores lentivirales permiten evitar algunas de estas limitaciones. Véase Naldini et al. (1996) *Science* 272:263-267).

Los retrovirus a partir de los cuales pueden derivar los vectores de plásmidos retrovirales mencionados previamente incluyen, por ejemplo, el virus de leucemia de

murinos de Moloney, el virus de necrosis del bazo, retrovirus tales como el virus del sarcoma de Rous, el virus del sarcoma de Harvey, el virus de leucosis de aves, el virus de leucemia de monos gibones, el virus de inmunodeficiencia humana, adenovirus, el virus del sarcoma mieloproliferativo y virus de tumor de mamíferos. En una realización, el vector de un plásmido retroviral deriva del virus de leucemia de murinos de Moloney.

Los adenovirus tienen la ventaja que presentan un amplio rango de huéspedes, pueden infectar células quiescentes o diferenciadas terminalmente, tal como neuronas o hepatocitos, y son esencialmente no oncogénicas. Véase, por ejemplo, Ali et al. (1994), *supra*, pág. Los adenovirus no parecen integrarse en el genoma huésped. Dado que se ubican fuera de los cromosomas, se reduce mucho el riesgo de mutagénesis por inserción. Ali et al. (1994), *supra*, pág.373

Los virus adeno-asociados presentan ventajas similares a los vectores basados en adenovirus. Sin embargo, los AAV presentan una integración específica del sitio en el cromosoma humano 19 (Ali et al. (1994), *supra*, pág.377)

En una realización preferida, el ADN que codifica los anticuerpos de esta invención se usa en una terapia celular o genética para trastornos que incluyen, a modo de ejemplo, trombosis de venas profundas, coagulación intravascular

diseminada, síndrome coronario agudo o cáncer con evidencia de coagulopatía.

De acuerdo con esta realización, se proporciona una terapia celular o genética con el ADN que codifica los anticuerpos de esta invención a un paciente que lo necesita, de forma concurrente o inmediatamente después del diagnóstico.

El especialista comprenderá que de acuerdo con esta realización se puede utilizar cualquier vector de terapia genética adecuado que contenga el ADN que codifica el anticuerpo de la invención o un ADN que codifica análogos, fragmentos, derivados o variantes del anticuerpo de la invención. Las técnicas para construir dicho vector son conocidas. Véase, por ejemplo, Anderson, W.F. (1998) *Nature* 392: Véase, por ejemplo, Anderson, W.F. (1998) *Nature* 392:25-30; Verma I.M. y Somia, N. (1998) *Nature* 389:239-242. La introducción del vector que contiene el ADN del anticuerpo en el sitio de interés se puede llevar a cabo utilizando técnicas conocidas.

El vector de la terapia genética incluye uno o varios promotores. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, el promotor retroviral LTR; el promotor SV40; y el promotor del citomegalovirus humano (CVM) descrito en Miller et al. (1989) *Biotechniques* 7(9):980-990, o cualquier otro promotor (por ejemplo,

promotores celulares tal como promotores de células eucariontes incluyendo, por ejemplo, los promotores de histona, pol III y β -actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, promotores de adenovirus, promotores de la timidina quinasa (TK) y promotores del parvovirus B19. La selección del promotor adecuado será evidente para el especialista en el arte a partir de las descripciones contenidas en este documento.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la presente invención se encuentra bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, promotores adenovirales, tal como el promotor tardío mayor adenoviral; o promotores heterólogos, tal como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor del virus sincicial respiratorio (RSV); promotores inducibles, tal como el promotor MMT, el promotor de metalotioneína; los promotores de shock de calor; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1; los promotores de globina humana; promotores de timidina quinasa virales, tal como el promotor de la timidina quinasa de *Herpes simplex*; los LTR retroviral (incluyendo los LTR retrovirales modificados descritos previamente); el promotor de β -actina; y el promotor de la hormona de crecimiento humana.

El vector plásmido retroviral se emplea para transducir líneas celulares empaquetadores con el fin de formar líneas celulares productores. Los ejemplos de células empaquetadoras que pueden ser transfectadas incluyen, por ejemplo, las líneas celulares PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X; VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+N⁻-86, GP+envAm12 y DAN descritas en Miller (1990) *Human Gene Therapy* 1: 5-14, cuyo contenido se incorpora por completo en este documento a modo de referencia. El vector puede transducir las células empaquetadoras mediante cualquier medio conocido en el arte. Dichos medios incluyen, por ejemplo, electroporación, el uso de liposomas y precipitación por CaPO_4 . Como alternativa, el vector plásmido retroviral se puede encapsular en una liposoma, o se puede acoplar a un lípido, y luego puede ser administrado al huésped. La línea de células productoras genera partículas infecciosas del vector retroviral que incluyen la o las secuencias de ácido nucleico codificadoras de los polipéptidos. Dichas partículas del vector retroviral se pueden emplear entonces para transducir células eucariontes, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las células eucariontes transducidas expresarán la o las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido. Las células eucariontes que pueden ser transducidas incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias, células de carcinoma

embrionarias, así como células madre hematopoyéticas, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células epiteliales bronquiales.

Un enfoque diferente de la terapia genética es la "terapia transcariótica", en la cual las células del paciente son tratadas ex vivo para inducir los genes cromosómicos latentes a fin de producir la proteína de interés después de introducirlas nuevamente en el paciente. La terapia transcariótica supone que el individuo posee un complemento normal de los genes necesarios para la activación. La terapia transcariótica comprende la introducción de un promotor, u otra secuencia reguladora exógena capaz de activar los genes nacentes, en el ADN cromosómico de las células del paciente ex vivo, el cultivo y la selección de células activas productoras de proteínas y la reintroducción de las células activadas en el paciente con el propósito de establecerlos por completo. Las células "activadas por genes" fabrican entonces la proteína de interés por algún tiempo significativo, tal vez durante toda la vida del paciente. En las Patentes de los Estados Unidos N°: 5.641.670 y 5.733.761 se describe detalladamente este concepto, y los contenidos de las mismas se incorporan por completo en este documento a modo de referencia.

Conjuntos de elementos:

Esta invención se relaciona además con conjuntos de elementos para fines de diagnóstico o de investigación. Los conjuntos de elementos incluyen típicamente uno o varios contenedores que contienen los anticuerpos de la presente invención. En una realización preferida, los conjuntos de elementos comprenden contenedores que contienen anticuerpos de cadena simple en una forma adecuada para una derivatización con una segunda molécula. En una realización más preferida, los conjuntos de elementos comprenden contenedores que contienen al anticuerpo de la SEQ ID N°: 1 o de la SEQ ID N°: 3.

En otra realización, los conjuntos de elementos pueden contener secuencias de ADN que codifican los anticuerpos de la invención. Preferentemente, las secuencias de ADN que codifican estos anticuerpos se proveen en un plásmido adecuado para su transfección y expresión en una célula huésped. El plásmido puede contener un promotor (a menudo un promotor inducible) para regular la expresión del ADN en la célula huésped. El plásmido también puede contener sitios de restricción apropiados para facilitar la inserción de otras secuencias de ADN en el plásmido con el fin de producir diversos. Los plásmidos también pueden contener numerosos elementos adicionales para facilitar la clonación y expresión de las proteínas codificadas. Dichos elementos son bien conocidos por los especialistas en el arte e incluyen,

por ejemplo, marcadores seleccionables, codones de inicio, codones de terminación y semejantes. En una realización más preferida, los conjuntos de elementos comprenden contenedores que contienen las secuencias de ADN de la SEQ ID N°: 2 o de la SEQ ID N°: 4.

Indicaciones terapéuticas:

Las enfermedades en las cuales la formación de trombos cumplen una función etiológica significativa incluyen infarto de miocardio, coagulación intravascular diseminada, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, apoplejía isquémica, shock séptico, síndrome de dificultad respiratoria aguda, angina inestable y otras afecciones oclusivas arteriales y venosas. Los anticuerpos de esta invención son de utilidad en todos estos casos, así como en otras enfermedades en las cuales la formación de trombos es patológica. Otras afecciones patológicas donde el anticuerpo de esta invención puede ser de utilidad incluyen cáncer con coagulopatías e inflamación. Los compuestos también pueden ser útiles en los injertos de piel y venas y en los trasplantes de órganos. El término "de utilidad" significa que los compuestos son de utilidad en el tratamiento, ya sea para prevenir una enfermedad o para impedir el avance de la misma a un estado más severo. Los anticuerpos de esta invención también proveen un anticoagulante seguro y eficaz, por ejemplo, en pacientes que reciben bioprótesis, tal como

válvulas cardíacas. Estos anticuerpos pueden reemplazar la heparina y warfarina en el tratamiento de, por ejemplo, embolia pulmonar o infarto de miocardio agudo. Los anticuerpos de esta invención también son útiles en el recubrimiento de los dispositivos médicos donde la coagulación constituye un factor de cuidado.

Ensayos:

Existen numerosos de ensayos de laboratorio para medir la actividad anticoagulante *in vitro* de un anticuerpo de esta invención. El efecto anticoagulante de un anticuerpo se puede medir usando ensayos de tiempo de coagulación plasmática tal como el tiempo de tromboplastina parcial activada ("APTT"), el tiempo de coagulación de trombina ("TCT") y/o el tiempo de protrombina ("PT"). Estos ensayos permiten distinguir los diferentes mecanismos de inhibición de la coagulación y comprenden la activación de la proteína C. La prolongación del tiempo de coagulación en cualquiera de estos ensayos demuestra que la molécula puede inhibir la coagulación en plasma.

Los ensayos anteriores se usan para identificar anticuerpos con actividad anticoagulante capaces de unirse al TF, tanto en sistemas purificados como en el ámbito plasmático. Luego se usarán otros ensayos para evaluar otras actividades de los anticuerpos de la invención, tal como inhibición de la formación de fibrina a partir del

fibrinógeno catalizada por trombina (Jakubowski, H.V. et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261(8): 3876-3882), la inhibición de la activación por trombina del factor V (Esmon, C.T. et al. *J. Biol. Chem.* 257(14): (1982). 7944-7947), la inhibición acelerada de la trombina por la antitrombina III y el cofactor de heparina II (Esmon, N.L. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258(20): 12238-12242), inhibición de activación por trombina del factor XIII (Polgar, J. et al. (1987) *Thromb. Haemost.* 58(1): 140), la inhibición de la inactivación mediada por trombina de la proteína S (Thompson, E.A. y Salem, H.H. (1986) *J. Clin. Inv.* 78(1): 13-17) y la inhibición de la activación y agregación de plaquetas mediada por trombina (Esmon, N.L. et al. (1983), *supra*).

Los siguientes ensayos, descritos con detalle en el Ejemplo 4, se usan para medir la potencia *in vitro* o la *in vitro* afinidad de unión *in vitro* de los anticuerpos de la invención: 1) Ensayo de hidrólisis de péptidos STF/FVIIa; 2) Ensayo de activación del factor X; 3) Ensayo PT; y 4) Ensayo de microcalorimetría.

Al llevar a cabo los procedimientos de la presente invención por supuesto se considera que la referencia a soluciones amortiguadoras, medios, reactivos, células, condiciones de cultivo particulares y semejantes no pretenden ser limitantes, sino que se debe considerar que incluyen todos los materiales relacionados que el

especialista en el arte tendría en cuenta como de interés o valor en el contexto particular en el cual dicha descripción se presenta. Por ejemplo, a menudo es posible sustituir un sistema de soluciones amortiguadoras o medios de cultivo por otro y aún obtener resultados similares, cuando no idénticas. Los especialistas en el arte tienen un conocimiento suficiente de dichos sistemas y metodologías como para poder, sin experimentos innecesarios, efectuar dichas sustituciones que servirán a su propósito de manera óptima con los métodos y procedimientos que se describen aquí.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes como una guía para asistir en la práctica de la invención. Al aplicar la descripción del ejemplo, se debe tener en cuenta que sin lugar a dudas habrá otras realizaciones diferentes de los métodos descriptos acordes con la presente invención que serán evidentes para el especialista en el arte relevante.

En la descripción anterior y en los siguientes ejemplos, todas las temperaturas están expresadas en grados Celsius sin corregir y todas las partes y porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Todas las descripciones de las solicitudes, patentes y publicaciones citadas previamente se incorporan en este documento a modo de referencia.

* * * * *

EJEMPLO 1

Construcción del anticuerpo de cadena simple anti-TF

scFv(TF)3e10

(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M A Q V N L R E
S G G T L V Q P G G S L R L S C A A S G F S F T D A W M S W
V R Q A P G K E L E W V S S I S G S G G S T Y Y A G S V K G
R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A R V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V S A G G G
G S G A P N F M L T Q P H S V S A S P G K T V T I S C T R S
S G S V A S Y Y V Q W Y Q Q R P G S S P T T V I Y E D N H R
P S G V P D R F S G S I D T S S N S A S L T I S G L K T E D
E A D Y Y C Q S Y D S N N L V V F G G G T K L T V L G A A A
G A P V P Y P D P L E P R A A (264)

El anticuerpo de cadena simple anti-TF, scFv(TF)3e10 (SEQ ID N°: 1), consiste de un péptido señal (-18 a -1), un dominio V_H (1 a 126), un ligador de V_H-V_L (127 a 131), un dominio V_L (132 a 246) y una secuencia de la marca del epítopo (247 a 264). La secuencia de ADN de scFv(TF)3e10 (SEQ ID N°:2) codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:1.

EJEMPLO 2

Construcción del anticuerpo de cadena simple anti-TF

scFv(TF)3e10A

(-18) M L G V L V L G A L A L A G L V F P E M A Q V N L R E
S G G T L V Q P G G S L R L S C A A S G F S F T D A W M S W
V R Q A P G K E L E W V S S I S G S G G S T Y Y A G S V K G
R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
A R V L S L T D Y Y W Y G M D V W G Q G T L V T V S A G G G
G S N F M L T Q P H S V S A S P G K T V T I S C T R S S G S
V A S Y Y V Q W Y Q Q R P G S S P T T V I Y E D N H R P S G
V P D R F S G S I D T S S N S A S L T I S G L K T E D E A D
Y Y C Q S Y D S N N L V V F G G G T K L T V L G A A A G A P
V P Y P D P L E P R A A (243)

El anticuerpo de cadena simple anti-TF, scFv(TF)3e10Δ (SEQ ID N°:3), consiste de un péptido señal (-18 a -1), un dominio V_H (1 a 126), un ligador V_H-V_L (127 a 131) y un dominio V_L (132 a 243). El scFv(TF)3e10Δ difiere del scFv(TF)3e10 por supresión de 3 aminoácidos (GAP) en el extremo N-terminal del dominio V_L y por supresión de la secuencia de la marca de epítopo C-terminal. La secuencia de ADN de scFv(TF)3e10Δ (SEQ ID N°:4) codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3.

EJEMPLO 3

Expresión de los anticuerpos anti-TF en células bacterianas y de mamífero

Se identificaron seis anticuerpos de cadena simple diferentes, scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6, scFv(TF)3e10 y scFv(TF)3h2, a partir del fago

que se une a TF, se sobreexpresaron en *E. coli* y fueron sometidos a purificación por afinidad usando una columna de afinidad para la marca de epítopo como se describió previamente. Las afinidades de los seis anticuerpos purificados para sTF se midieron usando BIAcore, y luego se caracterizaron estos anticuerpos con los ensayos de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa, de activación del FX, PT y microcalorimetría descritos en el Ejemplo 4, cuyos resultados se describen en el Ejemplo 5.

El anticuerpo scFv(TF)3e10 (SEQ ID N°: 1) también se expresó en células CHO. El plásmido de expresión contenía la secuencia de ADN que codifica scFv(TF)3e10 (SEQ ID N°:2) y ambos marcadores de selección de higromicina B y DHFR. La selección original se llevó a cabo en higromicina 400 µg/ml para seleccionar una población. La población resultante fue sometida luego a selección con metotrexato 100 nM. Durante este procedimiento, se seleccionaron las células que contenían copias amplificadas de la región del ADN que contenía el marcador de selección, y un gen de interés, de dicha población. Los niveles de expresión habían aumentado desde aproximadamente 0,3 mg/l hasta aproximadamente 6 mg/l como resultado de esta selección.

EJEMPLO 4

Ensayos *in vitro* de potencia y de afinidad de unión

1. Ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa

A continuación se describe el principio de este ensayo. El enlace p-nitroanilida amida del tripéptido del sustrato es hidrolizado por el complejo sTF/FVIIa. El producto cromóforo liberado, la p-nitroanilida, es monitoreada a 405 nm y la concentración de producto formado por unidad de tiempo se calcula usando un coeficiente de extinción molar de $9920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los valores de IC_{50} (C) se determinan ajustando las velocidades iniciales en la siguiente ecuación de 4 parámetros: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$



Sustrato S2266	Tripéptido	Cromóforo
----------------	------------	-----------

Reactivos y soluciones:

1. Solución amortiguadora de ensayo: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 5 mM, BSA 0,1%, pH 7,5
2. FVIIa humano (HCVIIA-0060, Haematologic Technologies Inc.): solución de trabajo 10 x: preparar una solución 20 nM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
3. TF soluble (Berlex): solución de trabajo 10 x: preparar una solución 30 nM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
4. Sustrato cromogénico S2266 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.): solución madre: 10 mM en H_2O , guardar a 4 °C. Solución de trabajo 2,5 x: preparar una solución 2,5 mM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.

5. Anticuerpo: Preparar diluciones 2,5x en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.

Condiciones de ensayo:

Los ensayos se llevan a cabo en una placa para microtitulación de 96 cavidades a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los componentes son:

STF 3 nM

Anticuerpo varía entre 1000 y 0,625 nM

FVIIa 2 nM

S2266 1 mM

Procedimiento de ensayo:

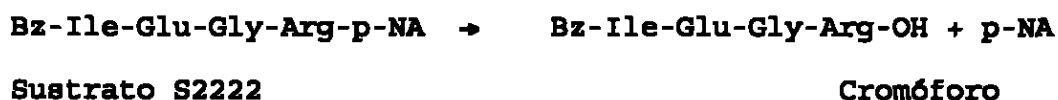
1. Pipetear 0,1 ml de AB 2,5x (o solución amortiguadora control) en cada cavidad.
2. Agregar 0,025 ml de STF 10x e incubar durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.
3. Agregar 0,025 ml de FVIIa 10x, incubar durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.
4. Agregar 0,1 ml de sustrato S2266 2,5x, transferir inmediatamente la placa a un lector de placas y medir las cinéticas enzimáticas a 405 nm con intervalos de 10 segundos durante 15 min.

Este ensayo se puede utilizar para medir la K_D de unión aparente de los anticuerpos de la invención con STF o con el

complejo FVIIa/TF, y para determinar si los anticuerpos de la invención compiten con FVII por la unión al TF.

2. Ensayo de activación del factor X

A continuación se describe el principio de este ensayo. El FVIIa se incuba con vesículas de TF recombinantes humanas para formar un complejo de proteasas capaz de activar el sustrato, FX. Este complejo se forma en presencia (o ausencia) de diferentes concentraciones de anticuerpo, luego se introduce el sustrato FX y se permite que la reacción avance para formar el producto, la proteasa FXa activa, capaz de hidrolizar el enlace p-nitroanilida amida del sustrato cromogénico S2222. El producto cromóforo liberado, p-nitroanilida, se monitorea a 405 nm y luego se calcula la concentración de producto formado por unidad de tiempo usando un coeficiente de extinción molar de $9920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los valores de IC_{50} (C) se determinan ajustando las velocidades iniciales en la siguiente ecuación de 4 parámetros: $Y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$



Reactivos y soluciones:

1. Solución amortiguadora de ensayo: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 5 mM, BSA 0,1%, pH 7,5

2. FVIIa humano (HCVIIA-0031, Haematologic Technologies Inc.): solución de trabajo 4 x: preparar una solución 100 pM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
 3. TF recombinante humano (reconstituido en los laboratorios de los autores a partir de Innovin, Dade): solución de trabajo: preparar una dilución 1: 480 en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
 4. Factor X humano (HCX-0060, Haematologic Technologies Inc.): solución de trabajo 4 x: preparar una solución 1000 nM en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
 5. Sustrato cromogénico S2222 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.):
solución madre: 6 mM en H₂O, guardar a 4 °C.
Solución de trabajo: preparar una solución 0,78 mM en EDTA 3,57 mM (para detener la reacción), NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, antes del uso.
 6. Anticuerpo:
Preparar diluciones 4x en solución amortiguadora de ensayo antes del uso.
- Condiciones de ensayo:
- Los ensayos se llevan a cabo en una placa para microtitulación de 96 cavidades a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los componentes son:
- Vesículas de rTF ¼ de una dilución 1:
- Anticuerpo varía entre 1000 y 0,625 nM

FVIIa	25 pM
FX	250 nM
S2222	0,546 mM

Procedimiento de ensayo:

1. Pipetear 0,015 ml de AB 4x (o solución amortiguadora control) en cada cavidad.
2. Agregar 0,015 ml de vesículas de rTF 4x.
3. Agregar 0,015 ml de FVIIa 4x, incubar durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.
4. Agregar 0,015 ml de FX 4x, incubar durante 5 min a temperatura ambiente con agitación suave.
5. Agregar 0,14 ml de sustrato S2222, transferir la placa inmediatamente a un lector de placas y medir las cinéticas enzimáticas a 405 nm con intervalos de 10 segundos durante 15 minutos.

Este ensayo se puede utilizar para determinar si los anticuerpos de la invención inhiben la activación del FX por el complejo FVIIa/TF y para determinar si los anticuerpos de la invención compiten con FX por la unión al complejo FVIIa/TF.

3. Ensayo de tiempo de protrombina (PT)

Para la reacción PT estándar, se agregan 90 µl de una concentración apropiada del anticuerpo o PBS a 20 µl de

Tromboplastina IS (Dade) y 90 μ l de CaCl_2 25 mM en una cubeta. La mezcla se incuba durante 1 min a 37 °C, luego se agregan 100 μ l de plasma con citrato (Helena Laboratories). Como alternativa, se agrega un volumen apropiado de anticuerpo concentrado a 100 μ l de tromboplastina humana recombinante (Ortho Recombiplastin) y aproximadamente 2 min después, 100 μ l de plasma humana reconstituida. Se mide el tiempo de coagulación de cada ensayo de coagulación individual tomando el promedio de dos mediciones usando un coagulómetro Electra 900C (Hemoliance) y los valores promedio determinados de las réplicas de ensayos ($n = 3$ ó 4). Se generaron curvas de dosis-respuesta para cada inhibidor y luego se utilizó análisis de regresión para calcular la concentración (en nM) necesaria para una extensión al doble del tiempo de coagulación.

Este ensayo se puede utilizar para evaluar el efecto de los anticuerpos de la invención sobre la vía extrínseca de coagulación sanguínea. Se determina la cantidad de anticuerpo necesaria para duplicar el PT y se puede comparar con otros anticoagulantes para evaluar la potencia relativa de los anticuerpos de la invención.

4. Ensayo de microcalorimetría

El ensayo de microcalorimetría (calorimetría de titulación isotérmica) se usa para medir la afinidad de unión (K_D) de los anticuerpos de la invención al TF ya sea



solo o en el complejo FVIIa/TF. Este ensayo se lleva a cabo usando un instrumento MicroCal VP-ITC. El complejo FVIIa/TF se obtiene por adición de un exceso 2,3 veces molar de FVIIa al sTF. Se utiliza cromatografía de exclusión por tamaño para verificar que todo el sTF en el ensayo se haya incorporado en complejos. Para la determinación de la afinidad del anticuerpo por el complejo, se agrega complejo VIIa/TF 1,2 μM a la celda del microcalorímetro y anticuerpo 65 μM a la jeringa. Para la determinación de la afinidad del anticuerpo por el sTF solo, se agrega sTF 10 μM a la celda y anticuerpo 141 μM a la jeringa. El análisis de los datos se efectúa usando el software MicroCal Origin. Los datos se ajustan a un solo sitio de unión.

EJEMPLO 5

Características in vitro de los anticuerpos anti-TF de esta invención

Se aislaron seis anticuerpos de unión al TF diferentes a partir de una biblioteca de expresión en fagos de anticuerpos de cadena simple completamente humanos: scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6, scFv(TF)3e10 y scFv(TF)3h2. Las afinidades de estos anticuerpos de unión a sTF, expresados en *E. coli*, medidas usando BIAcore, eran de un valor entre 35 y 470 nM. Se usó el ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/VIIa descrito en el Ejemplo 4 para determinar si estos anticuerpos bloqueaban la

formación de un complejo VIIa/TF activo. En este ensayo, la unión de VIIa a sTF acelera la velocidad de clivaje contra el sustrato de péptidos cromogénico S2266 en >20 veces. Los anticuerpos que inhiben la unión de FVIIa al TF bloquean esta aceleración. Cinco de los anticuerpos de cadena simple, scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6 y scFv(TF)3h2, inhibieron la hidrólisis de S2266, lo cual sugería que inhibían la unión del FVIIa al sTF (Figura 1). Por el contrario, el anticuerpo de cadena simple scFv(TF)3e10 no inhibió el ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/VIIa y, de hecho, este anticuerpo incrementó la velocidad de hidrólisis de S2266, lo cual sugería que el scFv(TF)3e10 incrementa la afinidad del sTF por el FVIIa. Con este ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/VIIa, el anticuerpo scFv(TF)3e10 incrementó la afinidad del FVIIa por el sTF, disminuyendo la K_D aparente 5 veces (Figura 2). El scFv(TF)3e10 no afectó la velocidad de hidrólisis del FVIIa en ausencia de sTF, lo cual indica que este anticuerpo no interactúa con el FVIIa solo. La K_D del anticuerpo scFv(TF)3e10 para sTF, medida con el ensayo de hidrólisis de péptidos sTF/FVIIa, era de 65,4 nM (Figura 4). Se usó un ensayo de microcalorimetría para comparar la afinidad del scFv(TF)3e10 por el TF en comparación con el complejo FVIIa/TF. Estos experimentos revelaron que el scFv(TF)3e10 expresado en células de mamífero tiene una afinidad ~20

veces mayor por el complejo TF/FVIIa en comparación con el sTF libre (33 nM vs. 600 nM, Figura 5).

Se compararon los seis anticuerpos de cadena simple de unión a TF, expresados en bacterias, usando el ensayo de activación del FX y el ensayo PT. Ninguno de los cinco anticuerpos que inhibían la velocidad de hidrólisis de S2266 por el complejo sTF/FVIIa, scFv(TF)2c1, scFv(TF)2c11, scFv(TF)2d3, scFv(TF)2h6 y scFv(TF)3h2, extendieron el PT más que la solución amortiguadora control PBS (Figura 3). Por el contrario, aunque el anticuerpo scFv(TF)3e10 no presentaba la mayor afinidad según se midió con BIAcore, e incrementó la afinidad del FVIIa por el sTF, el scFv(TF)3e10 era el único anticuerpo en el grupo que inhibía la activación del FX (Figura 6 y datos que no se muestran) y prolongaba el tiempo de coagulación en el ensayo PT (Figura 3). La IC_{50} del anticuerpo scFv(TF)3e10 (dímero) para la inhibición en el ensayo de activación del FX era de 0,44 nM (Figura 6). Finalmente, se usó el ensayo de activación del FX para determinar si el anticuerpo scFv(TF)3e10 compite con el FX por la unión al complejo FVIIa/TF. El scFv(TF)3e10 inhibió de una forma dependiente de la dosis la activación del FX con la misma $K_{D(app)}$ a todas las concentraciones de sustrato FX, lo cual indica que el scFv(TF)3e10 no compite con el FX y no se une al TF o al complejo FVIIa/TF en el mismo sitio que FX (Figura 7).

El anticuerpo scFv(TF)3e10 se identificó sobre la base de la unión al TF recombinante humano soluble. La homología de secuencia del TF entre humanos y murinos o humanos y conejos es del 58% y 71%, respectivamente. El anticuerpo parece unirse a un único epítopo en el TF humano que interfiere con la activación del FX por el complejo FVIIa/TF. Fisiológicamente, este anticuerpo tiene una ventaja con respecto a los anticuerpos que compiten con la unión del FVII o del FVIIa al TF. La K_D del FVIIa para el TF soluble es de ~10 nM (Figura 2), un valor que es coherente con los valores publicados para la unión del FVIIa al sTF (4,8 nM, Neuenschwander, P. F. y Morrissey, J. H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(11):8007-8013) o para la unión del FVII, del FVIIa y del FVIIai inactivado por DIP del TF de longitud completa reconstituido en vesículas neutras de fosfatidilcolina (Bach R. et al. (1986) *Biochemistry* 25:4007-4020). La afinidad de unión del FVII o del FVIIa al TF de longitud completa aumenta mucho cuando se incluye fosfatidilserina cargada en las vesículas de fosfolípidos (Bach R. et al. (1986) *supra*), debido a la interacción del dominio GLA del FVII o del FVIIa con la superficie de membrana cargada (Neuenschwander, P. F. y Morrissey, J. H. (1994) *supra*). Bajo estas condiciones óptimas, el FVIIa se une al TF de longitud completa con una afinidad muy alta (41 pM). Un anticuerpo TF que compita con la unión a FVII o a

FVIIa tendrá dificultades en competir con este complejo FVIIa/TF de gran afinidad. Por el contrario, el anticuerpo scFv(TF)3e10 no sólo tiene una mayor afinidad por el complejo FVIIa/TF que por TF, sino que no compite con FVIIa por la unión al TF. Un anticuerpo, tal como scFv(TF)3e10, que no compite con el FVIIa, inhibirá la activación del FX independientemente de la concentración plasmática del FVII, que es de ~10 nM.

El anticuerpo scFv(TF)3e10 también tiene una ventaja con respecto a los anticuerpos que compiten con FX por la unión al TF. La K_m del FX por el complejo VIIa/TF comprende un valor entre 0,061 y 0,099 μ M basado en los datos que se muestran en la Figura 7, lo cual es coherente con los valores publicados (0,1 μ M, Baugh, R. J. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275(37): 28826-28833). La concentración de FX en el plasma humano es de 140 nM (1,4 s 2 veces la K_m). Un anticuerpo, tal como scFv(TF)3e10, que no compite con FX como se muestra en la Figura 7, inhibirá la activación de FX independientemente de la concentración plasmática del FX.

EJEMPLO 6

Modelo de tromboembolia in vivo en rata

El anticuerpo de unión a TF de cadena simple, scFv(TF)3e10, es específico para el Tf de primates. Se desarrolló un modelo de tromboembolia desencadenado por el TF humano (reactivo de tromboplastina que contiene el TF

recombinante humano, Orto) en ratas Sprague-Dawley macho concientes (350 - 400 g, $n > 7$ /grupo). En este modelo de coagulación intravascular diseminada (DIC), el TF, por medio de una inyección de tromboplastina, induce deposición de fibrina pulmonar, insuficiencia respiratoria y muerte. Se inyectaron dosis de scFv(TF)3e10 expresado en células de mamífero o vehículo en la vena de la cola seguido, después de 15 min, de la inyección en bolo de tromboplastina (0.5 ml/kg). En el grupo tratado con vehículo, esta dosis de TF da como resultado un 60% de letalidad (LD_{60}), habitualmente dentro de los 5 min después de la inyección de tromboplastina. Las ratas fueron calificadas de acuerdo con el siguiente sistema de puntaje de morbilidad-mortalidad: 0 = no afectado; 1 = dificultad respiratoria leve (recuperación dentro de los 30 min); 2 = dificultad respiratoria severa (moribunda, la recuperación requirió más de 60 min); y 3 = muerte. Se usó el puntaje promedio para comparar la eficacia de los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados de este ensayo vivo *in vivo* se muestran en la Figura 8. El anticuerpo de la invención redujo la mortalidad y redujo la dificultad respiratoria en este ensayo.

Los ejemplos anteriores se pueden repetir con éxito similar sustituyendo los reactivos y/o condiciones de

operación de esta invención descriptos genérica o específicamente utilizados en los ejemplos precedentes.

En tanto la invención se ha ilustrado con respecto a la producción de determinadas construcciones de anticuerpo, resultará evidente que es posible efectuar variaciones y modificaciones de la invención sin apartarse del espíritu o alcance de la misma.

REIVINDICACIONES:

1. Un anticuerpo anticoagulante que se une con mayor afinidad al complejo de factor VIIa/factor tisular (FVIIa/TF) que al factor tisular (TF) solo.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo se une con una afinidad al menos 2 veces mayor al complejo FVIIa/TF que al TF solo, medida en un ensayo de microcalorimetría.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo se une con una afinidad al menos 5 veces mayor al complejo FVIIa/TF que al TF solo.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo se une con una afinidad al menos 10 veces mayor al complejo FVIIa/TF que al TF solo.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo dimérico Fab o un anticuerpo IgG.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo no compite por la unión al TF con uno o más de los factores de coagulación seleccionados del grupo

formado por el factor VII (FVII), el factor IX (FIX) y el factor X (FX).

9. El anticuerpo de la reivindicación 8, donde dichos factores de coagulación son FVII y FX.

10. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo está glicosilado.

11. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo ha sido modificado por la adición de polietilenglicol.

12. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo ha sido biotinilado para la unión de estreptavidina.

13. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicha composición comprende un excipiente aceptable para uso farmacéutico y una cantidad eficaz en términos terapéuticos de dicho anticuerpo.

14. Un método de protección contra la formación de trombos, que comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos del anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo inhibe la generación de trombina sin afectar directamente otros parámetros de coagulación, tal como la activación y agregación de plaquetas.

15. El método de la reivindicación 14, donde dicho método consiste en ofrecer protección contra la formación de trombos en la apoplejía isquémica, las complicaciones trombóticas después de una angioplastia o una cirugía microvascular.

16. Un método para reducir y tratar trombosis de venas profundas (DVT), coagulación intravascular diseminada (DIC), síndrome coronario agudo o cáncer con evidencia de coagulopatía en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos del anticuerpo de la reivindicación 1 a dicho paciente.

17. Un método para regular la respuesta inflamatoria en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos del anticuerpo de la reivindicación 1 a dicho paciente.

18. El método de la reivindicación 17, donde dicha respuesta inflamatoria se selecciona del grupo formado por sepsis, injertos de piel y venas y transplantes de órganos.

19. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo se puede usar para formar un recubrimiento no trombogénico sobre la superficie de un dispositivo médico, donde dicho dispositivo médico tomará contacto con la sangre.

20. Un conjunto de elementos, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1.
21. Un conjunto de elementos, que comprende las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo de la reivindicación 1.
22. Una composición para una terapia genética, que comprende la secuencia de polinucleótidos de la SEQ ID N°: 2 o de la SEQ ID N°: 4, que codifica el anticuerpo que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o de la SEQ ID N°: 3, en combinación con una cantidad eficaz en términos terapéuticos de un vector de terapia genética.
23. Un anticuerpo anticoagulante, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple que se une con mayor afinidad al complejo FVIIa/TF que al TF solo y donde dicho anticuerpo no compite por la unión al TF con FVII y FX.
24. El anticuerpo de la reivindicación 23, donde dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o de la SEQ ID N°: 3.
25. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo de la reivindicación 23, donde dicha secuencia de polinucleótidos comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID N°: 2 o de la SEQ ID N°: 4.

183
182

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Light, David
McLean, Kirk

<120> Nuevos anticuerpos dirigidos contra factores tisulares como
anticoagulantes

<130> 52295AWOM2

<150> US 60/376.566

<151> 2002-05-01

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del anticuerpo scFv(TF)3e10

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
145 150 155 160

Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
165 170 175

Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
180 185 190

Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
195 200 205

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
210 215 220

Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro
260 265 270

Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala
275 280

<210> 2
<211> 849
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de ADN codificante del anticuerpo scFv(TF) 3e10

<400> 2
atgcttgagg tcctggctct tggcgcgctg gccctggcag gcctggctct ccccgagatg 60
gccaggtca acttaagga gtctggggga accttgggtcc agcctggggg gtccctgaga 120
ctctcctgtg cagcctctgg attcagtttc actgacgcct ggatgagctg ggtccgccag 180
gctccagga aggagctgga gtgggtctca agtattagtg gtagtgggtg aagcacatac 240
tacgcaggct ccgtgaagg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 300
tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggcgg tatattactg tgcgagagta 360
ttatcgctga ccgattacta ctggtacggc atggacgtct ggggccaagg caccctggtc 420
accgtctcgg ccggtggcgg cggatctggc gcgccaatt ttatgctgac tcagccccac 480
tctgtgtcgg cgtctccggg gaagacggta accatctcct gcacccgcag cagtggcagc 540
gttgccagct actatgtgca gtggtaccag cagcgcccgg gcagttcccc caccactgtg 600
atctatgagg ataaccacag accctctggg gtccctgac gggtctctgg ctccatcgac 660
acctctcca actctgcctc cctcaccatc tctggactga agactgagga cgaggctgac 720
tactactgtc agtcttatga tagcaacaac cttgtgggtt tcggcggagg gaccaagctg 780
accgtcctag gtgcggccgc aggagctccg gtgccggatc cggatccgct ggaaccgcgt 840
gccgcatga 849

<210> 3
<211> 261
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

89-185
294

<223> Secuencia de aminoácidos del anticuerpo scFv(TF)3e10delta

<400> 3

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser
145 150 155 160

Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly
165 170 175

Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser
180 185 190

Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro Ser Gly Val
195 200 205

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser
210 215 220

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
225 230 235 240

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly
260

<210> 4

<211> 783

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN codificante del anticuerpo scFv(TF)3e10delta

<400> 4

atgcttgggg	tectggtcct	tggcgcgctg	gccctggcag	gcctggtctt	ccccgagatg	60
gcccaggtca	acttaaggga	gtctggggga	accttggtcc	agcctggggg	gtccctgaga	120
ctctcctgtg	cagcctctgg	attcagtttc	actgacgcct	ggatgagctg	ggtccgccag	180
gctccagggg	aggagctgga	gtgggtctca	agtattagtg	gtagtgggtg	aagcacatac	240
tacgcaggct	ccgtgaaggg	ccggttcacc	atctccagag	acaattccaa	gaacacgctg	300
tatctgcaaa	tgaacagcct	gagagccgag	gacacggccg	tatattactg	tgcgagagta	360
ttatcgctga	ccgattacta	ctggtacggc	atggacgtct	ggggccaagg	caccctggtc	420
accgtctcgg	ccggtggcgg	cggatcta	tttatgctga	ctcagcccc	ctctgtgtcg	480
gcgtctccgg	ggaagacggg	aaccatctcc	tgcacccgca	gcagtggcag	cgttgccagc	540
tactatgtgc	agtgtacca	gcagcgcccc	ggcagttccc	ccaccactgt	gatctatgag	600
gataaccaca	gacctctcgg	ggtccctgat	cggttctctg	gtcccatcga	cacctcctcc	660
aactctgcct	ccctcaccat	ctctggactg	aagactgagg	acgaggctga	ctactactgt	720
cagtcttatg	atagcaacaa	ccttgtgggt	ttcggcgagg	ggaccaagct	gaccgtccta	780
ggt						783

TRANSMITTAL LETTER TO THE
UNITED STATES RECEIVING OFFICE

Date	30 APRIL 2003 187
International Application No.	To Be Assigned
Attorney Docket No.	BERLX 320 110

I. Certification under 37 CFR 1.10 (if applicable)

Express Mail mailing number

Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to the Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231

Signature of person mailing correspondence
--

Typed or printed name of person mailing correspondence
--

II. ☒ New International Application

TITLE	NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED ANTIBODIES AS ANTICOAGULANTS
-------	---

Earliest priority date (Day/Month/Year)
01 MAY 2002

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied. (Note: check as many boxes as apply):

- A. ☐ The invention disclosed was not made in the United States.
 B. ☐ There is no prior U.S. application relating to this invention.
 C. ☒ The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application. (NOTE: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority)

application no.	60/376,566	filed on	01 MAY 2002 (01.05.02)
application no.		filed on	

- D. ☐ The present international application ☐ is identical to ☐ contains less subject matter than that found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C above.
 E. ☒ The present international application ☒ contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C above. The additional subject matter ☒ DOES NOT ALTER ☐ MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15.

☐ A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is(are) enclosed:

- A. ☐ A Request for An Extension of Time to File a Response
 B. ☐ A Power of Attorney (General or Regular)
 C. ☐ Replacement pages:

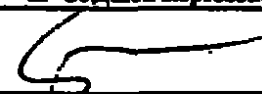
pages		of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figures
pages		of the description	pages		of the abstract
pages		of the claims			

- D. ☐ Submission of Priority Documents
 E. ☐ Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex

IV. ☐ A Request for Rectification under PCT Rule 91 ☐ A Petition ☐ A Sequence Listing Diskette

V. ☐ Other (please identify):

The person signing this form is the: ☐ Applicant ☒ Attorney/Agent (Reg. No. 27,969) ☐ Common Representative

Typed name of signer	Anthony J. Zelano	Signature	
----------------------	-------------------	-----------	---

COPY

**PCT
REQUEST**

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

188

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) : BERLX 320 WO

Box No. I TITLE OF INVENTION

NOVEL TISSUE FACTOR TARGETED ANTIBODIES AS ANTICOAGULANTS

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
D-13342 Berlin
DE

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No. N/A

State (that is, country) of nationality: DE

State (that is, country) of residence: DE

This person is applicant ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America
for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)

LIGHT, David
614 South Fremont Street
San Mateo, CA 94402
US

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: US

State (that is, country) of residence: US

This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America
for the purposes of: ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf ☒ agent ☐ common representative
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ZELANO, Anthony J.
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza I
2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400
Arlington, Virginia 22201

Telephone No.

(703) 243-6333

Facsimile No.

(703) 243-6410

Teleprinter No.

N/A

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where an agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

McLEAN, KIRK
291 Capricorn Avenue
Oakland, CA 94611
US

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: US

State (that is, country) of residence: US

This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America
for the purposes of: ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America
for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America
for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America
for the purposes of: ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a)(mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

- Regional Patent**
- (X) AP **ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- (X) EA **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- (X) EP **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- (X) OA **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (If other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (If other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| (X) AE United Arab Emirates | (X) LK Sri Lanka |
| (X) AG Antigua and Barbuda | (X) LR Liberia |
| (X) AL Albania | (X) LS Lesotho |
| (X) AM Armenia | (X) LT Lithuania |
| (X) AT Austria | (X) LU Luxembourg |
| (X) AU Australia | (X) LV Latvia |
| (X) AZ Azerbaijan | (X) MA Morocco |
| (X) BA Bosnia and Herzegovina | (X) MD Republic of Moldova |
| (X) BB Barbados | (X) MG Madagascar |
| (X) BG Bulgaria | (X) MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| (X) BR Brazil | (X) MN Mongolia |
| (X) BY Belarus | (X) MW Malawi |
| (X) BZ Belize | (X) MX Mexico |
| (X) CA Canada | (X) MZ Mozambique |
| (X) CH and LI Switzerland and Liechtenstein | (X) NO Norway |
| (X) CN China | (X) NZ New Zealand |
| (X) CO Colombia | (X) OM Oman |
| (X) CR Costa Rica | (X) PH Philippines |
| (X) CU Cuba | (X) PL Poland |
| (X) CZ Czech Republic | (X) PT Portugal |
| (X) DE Germany | (X) RO Romania |
| (X) DK Denmark | (X) RU Russian Federation |
| (X) DM Dominica | (X) SC Seychelles |
| (X) DZ Algeria | (X) SD Sudan |
| (X) EC Ecuador | (X) SE Sweden |
| (X) EE Estonia | (X) SG Singapore |
| (X) ES Spain | (X) SI Slovenia |
| (X) FI Finland | (X) SK Slovakia |
| (X) GB United Kingdom | (X) SL Sierra Leone |
| (X) GD Grenada | (X) TJ Tajikistan |
| (X) GE Georgia | (X) TM Turkmenistan |
| (X) GH Ghana | (X) TN Tunisia |
| (X) GM Gambia | (X) TR Turkey |
| (X) HR Croatia | (X) TT Trinidad and Tobago |
| (X) HU Hungary | (X) TZ United Republic of Tanzania |
| (X) ID Indonesia | (X) UA Ukraine |
| (X) IL Israel | (X) UG Uganda |
| (X) IN India | (X) US United States of America |
| (X) IS Iceland | (X) UZ Uzbekistan |
| (X) JP Japan | (X) VC Saint Vincent and the Grenadines |
| (X) KE Kenya | (X) VN Viet Nam |
| (X) KG Kyrgyzstan | (X) YU Yugoslavia |
| (X) KP Democratic People's Republic of Korea | (X) ZA South Africa |
| (X) KR Republic of Korea | (X) ZM Zambia |
| (X) KZ Kazakhstan | (X) ZW Zimbabwe |
| (X) LC Saint Lucia | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purpose of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet
(X) Any countries available at time of filing but not included on this form

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that these additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. If, on any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:

(i) If more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;

(ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be). Indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;

(iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be). Indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;

(iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;

(v) If, in Box No. V, the name of one State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;

(vi) If, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI;

(vii) If, in Box No. VI, the earlier application is an ARIPO application: in such case, write "Continuation of Box No. VI", specify the number of the item corresponding to that earlier application and indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed.

2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

3. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: in such case write "Statement concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" and furnish that statement below.

Continuation of Box No. IV:

BRANIGAN, Alan E. J.
BRANIGAN, Jennifer J.
HEANEY, Brian P.
MILLEN, I. William
MOSES, John R.
RULAND, James E.
SHUBIN, Harry B.
SOPE, John A.
TRAVERSO, Richard J.
WHITE, John L.
ZELANO, Anthony J.
MCCARTHY, Robert E.
HENTOR, Csaba
KINSEY, Nicola

All members of the firm of MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C. at the address, telephone and facsimile numbers as indicated in Box No. IV.

Box No. VI PRIORITY CLAIM

[] Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

		Where earlier application is:		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office
item (1) 01 MAY 2002	60/376,366	US		
item (2)				
item (3)				

[X] The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.1(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):
ISA/EP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):
Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request	:	5 sheets
description (excluding sequence listing part)	:	40 sheets
claims	:	3 sheets
abstract	:	1 sheet
drawings	:	8 sheets
sequence listing part of description	:	5 sheets
Total number of sheets	:	62 sheets

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. [X] fee calculation sheet (duplicate)
2. [] separate signed power of attorney
3. [] copy of general power of attorney; reference number, if any.
4. [] statement explaining lack of signature
5. [] priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. [] translation of international application into (language):
7. [] separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. [] nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. [X] other (specify): Transmittal

Figure of the drawings which should accompany the abstract: Fig. 1

Language of filing of the international application: ENGLISH

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Anthony J. Asano
Agent for the Applicant(s)

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: [] received: [] not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

**CARTA DE ENVÍO A LA OFICINA
RECEPTORA DE LOS ESTADOS UNIDOS**

Fecha	30 de abril de 2003
Solicitud Internacional N°	A assigner
Referencia del Agente N°	BERLX 320 WO

I. Certificación CFR 37 1.10 (si corresponde)

Número de envío expreso

Fecha de depósito

Certifico que la solicitud/correspondencia adjunta a la presente ha sido depositada mediante el Servicio Postal de los E.E.U.U. con la prestación "Express Mail Post Office to Addressee" bajo CFR 37 1.10 en la fecha indicada arriba y está remitida al comisionado de Patentes y Marcas, Washington, D.C. 20231

Firma del remitente

Nombre del remitente en letras de imprenta
--

II. [X] Nueva solicitud internacional

TÍTULO	NUEVOS ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES
--------	--

Fecha de prioridad más temprana (día/mes/año)
01 de mayo de 2002

INFORMACIÓN PARA EL EXAMEN DE REVELACIONES: se suministra la siguiente información a los fines de apoyar el examen de la presente Solicitud Internacional y con el propósito de determinar si puede o no ser otorgada una licencia de transmisión extranjera. (NOTA: comentar todos los campos posibles)

- A. ☐ La invención revelada no fue producida en los E.E.U.U.
 B. ☐ En los E.E.U.U. no existe una solicitud anterior con relación a esta invención.
 C. ☒ La siguiente(s) solicitud(es) de E.E.U.U. anterior(es) contienen objetos que se relacionan con la invención revelada en la Solicitud Internacional adjunta. (NOTA: la prioridad de estas solicitudes pueden o no ser reivindicadas con el formulario PCT/RO/101 (Request), y esta lista no constituye una reivindicación de prioridad)

Solicitud N°	60/370,588	Presentada el	01 de mayo de 2002
Solicitud N°		Presentada el	

- D. ☐ La presente Solicitud Internacional [] es idéntica a [] contiene menos objetos que los encontrados en las solicitud(es) de E.E.U.U. anterior(es) identificadas en el ítem C de arriba.
 E. ☒ La presente Solicitud Internacional [x] contiene objetos adicionales no encontrados en las solicitud(es) de E.E.U.U. anterior(es) identificadas en el ítem C de arriba. El objeto adicional [x] NO ALTERA [] PUEDE CONSIDERARSE QUE ALTERA la naturaleza general de la invención de manera de requerir que la Solicitud de E.E.U.U. esté disponible para ser inspeccionada por la agencia defensora apropiada bajo la U.S.C. 181 y 37 CFR 5.1. Ver 37 CFR 5.15.

III. [] Respuesta a una invitación de RO/US. Se adjuntan el(los) siguiente(s) documento(s):

- A. ☐ Requerimiento de una extensión de plazo para presentar una respuesta.
 B. ☐ Poder de un abogado (general o normal)
 C. ☐ Páginas de reemplazo

Páginas		del requerimiento (PCT/RO/101)	Páginas		De las figuras
Páginas		de la descripción	Páginas		
Páginas		de las reivindicaciones			

- D. ☐ Envío de documentos de prioridad.
 E. ☐ Tasas como las especificadas en el formulario Cálculo de Tasas PCT/RO/101 adjunto

IV. [] Respuesta para una rectificación bajo regla PCT 91

- [] Petición
 [] Disquete con lista de secuencias

V. [] Otros (se ruega identificarlos)

La persona que firma este formulario es el: ☐ Solicitante ☒ Abogado/Agente ☐ Representante común

Nombre del Firmante (en letras de imprenta)	Anthony J. Zelano	Firma	Firmado
--	-------------------	-------	---------

PCT
SOLICITUD

El abajo firmante solicita que la presente
Solicitud Internacional
sea procesada de acuerdo con el
Tratado de Cooperación Internacional
en Materia de Patentes

Solicitud Internacional N°	194
Fecha de presentación internacional	
Nombre de la oficina receptora y "Solicitud PCT Internacional"	
Referencia del solicitante o del agente	BERLX 320 WO

TITULO DE LA INVENCIÓN	
Campo N° I	NUEVOS ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA FACTORES TISULARES COMO ANTICOAGULANTES
Campo N° II SOLICITANTE	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	☐ Esta persona es también inventor
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT D - 13353 Berlin DE	Teléfono N°: Facsimil N°: Teleprinter N°: N/A
Estado (esto es, país) de nacionalidad: US	Estado (esto es, país) de residencia: US
Esta persona es solicitante ☐ Todos los estados designados	☒ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
a los propósitos de: ☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Campo N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es:
LIGHT, David 614 South Fremont Street San Mateo, CA 94402 E.E.U.U.	☐ solo solicitante ☒ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad: US	Estado (esto es, país) de residencia: US
Esta persona es solicitante ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
a los propósitos de: ☒ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
☒ Otros solicitantes y/u (otros) inventores están indicados en una hoja de continuación.	
Campo N° IV AGENTE O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA	
La persona identificada abajo por este medio/ha sido autorizada a actuar en nombre de(los) solicitante(s) ante los organismos internacionales competentes ☒ Agente ☐ Representante común	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país).	Teléfono N°
Zelano, Anthony J. MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C. Arlington Courthouse Plaza 1 2200 Clarendon Boulevard, Suite 401 Arlington, Virginia 22201 E.E.U.U.	(703) 243-6333
	Facsimil N°
	(703) 243-6410
	Teleprinter N°
	N/A
☐ Dirección Postal: marcar este casillero cuando no está/ha sido autorizado ningún agente o representante común, utilizando el espacio de arriba en lugar de indicar una dirección particular a la cual debe ser enviada la correspondencia.	

Continuación de Campo N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)	
Si no es utilizado ninguno de los siguientes subcampos, no incluir esta hoja en el requerimiento	
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia). McLEAN, Kirk 291 Capricorn Avenue Oakland, CA 94611 E.E.U.U.	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☒ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad: US	Estado (esto es, país) de residencia: US
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☒ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☒ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
Nombre y dirección: (Apellido seguido por el nombre: para una persona jurídica, la denominación oficial completa. La dirección debe incluir el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este campo es la del estado de residencia del solicitante (esto es, país) si no se indica abajo el estado de residencia).	Esta persona es: ☐ solo solicitante ☐ solicitante e inventor ☐ solo inventor (si este casillero está marcado, no completar abajo)
Estado (esto es, país) de nacionalidad:	Estado (esto es, país) de residencia:
Esta persona es solicitante a los propósitos de: ☐ Todos los estados designados	☐ Todos los estados designados excepto E.E.U.U.
☐ Únicamente E.E.U.U.	☐ Los estados indicados en el campo suplementario
☐ Otros solicitantes y/u (otros) inventores están indicados en una hoja de continuación.	

Campo Nº V - DESIGNACIÓN DE ESTADOS

Las siguientes designaciones se hacen aquí de acuerdo con la regla 4.9 (a) (marcar las casillas que corresponden, debe ser marcada a lo menos una):

- ☒ **AP** Patente ARIPO: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudán, SL Sierra Leona, SZ Suazilandia, TZ República Unida de Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, y cualquier otro estado que sea signatario del Protocolo de Harare y del PCT.
- ☒ **EA** Patente Eursiática: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Bielorrusia, KG Kirguistán, KZ Kazajistán, MD República de Moldavia, RU Federación Rusa, TJ Tayikistán, TM Turkmenistán, y cualquier otro estado que sea signatario de la Convención Eursiática de Patentes y del PCT.
- ☒ **EP** Patente Europea: AT Austria, BE Bélgica, CH y LI Suiza y Liechtenstein, CY Chipre, DE Alemania, DK Dinamarca, ES España, FI Finlandia, FR Francia, GB Gran Bretaña, GR Grecia, IE Irlanda, IT Italia, LU Luxemburgo, MC Mónaco, NL Holanda, PT Portugal, SE Suecia, TR Turquía, y cualquier otro estado que sea signatario de la Convención Europea de Patentes y del PCT.
- ☒ **OA** Patente OAPI: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF República Central Africana, CG Congo, CI Costa de Marfil, CM Camerún, GA Gabón, GN Guinea, GW Guinea Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Níger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, y cualquier otro estado que sea miembro del OAPI y signatario del PCT. (si se desea otro tipo de protección o tratamiento, especificar en la línea punteada).....

Patente Nacional (si se desea otro tipo de protección o tratamiento, especificar en la línea punteada)

- | | |
|---|---|
| ☒ AE Emiratos Árabes Unidos..... | ☒ LK Sri Lanka |
| ☒ AG Antigua y Barbuda..... | ☒ LR Liberia |
| ☒ AL Albania..... | ☒ LS Lesotho |
| ☒ AM Armenia..... | ☒ LT Lituania |
| ☒ AT Austria..... | ☒ LU Luxemburgo |
| ☒ AU Australia..... | ☒ LV Letonia |
| ☒ AZ Azerbaiyán..... | ☒ MA Marruecos |
| ☒ BA Bosnia y Herzegovina..... | ☒ MD República de Moldavia |
| ☒ BB Barbados..... | ☒ MG Madagascar |
| ☒ BG Bulgaria..... | ☒ MK Ex República Yugoslava de Macedonia |
| ☒ BR Brasil..... | ☒ MN Mongolia |
| ☒ BY Bielorrusia..... | ☒ MW Malawi |
| ☒ BZ Belice..... | ☒ MX México |
| ☒ CA Canadá..... | ☒ MZ Mozambique |
| ☒ CH Y LI Suiza y Liechtenstein..... | ☒ NO Noruega |
| ☒ CN China..... | ☒ NZ Nueva Zelanda |
| ☒ CO Colombia..... | ☒ OM Omán |
| ☒ CR Costa Rica..... | ☒ PH Filipinas |
| ☒ CU Cuba..... | ☒ PL Polonia |
| ☒ CZ República Checa..... | ☒ PT Portugal |
| ☒ DE Alemania..... | ☒ RO Rumania |
| ☒ DK Dinamarca..... | ☒ RU Federación Rusa |
| ☒ DM Dominica..... | ☒ SC Seychelles |
| ☒ DZ Argelia..... | ☒ SD Sudán |
| ☒ EC Ecuador..... | ☒ SE Suecia |
| ☒ EE Estonia..... | ☒ SG Singapur |
| ☒ ES España..... | ☒ SI Eslovenia |
| ☒ FI Finlandia..... | ☒ SK Eslovaquia |
| ☒ GB Gran Bretaña..... | ☒ SL Sierra Leona |
| ☒ GD Granada..... | ☒ TJ Tayikistán |
| ☒ GE Georgia..... | ☒ TM Turkmenistán |
| ☒ GH Ghana..... | ☒ TN Túnez |
| ☒ GM Gambia..... | ☒ TR Turquía |
| ☒ HR Croacia..... | ☒ TT Trinidad y Tobago |
| ☒ HU Hungría..... | ☒ TZ República Unida de Tanzania |
| ☒ ID Indonesia..... | ☒ UA Ucrania |
| ☒ IL Israel..... | ☒ UG Uganda |
| ☒ IN India..... | ☒ US E.E.U.U. |
| ☒ IS Islandia..... | ☒ UZ Uzbekistán |
| ☒ JP Japón..... | ☒ VC San Vicente y Las Granadinas |
| ☒ KE Kenya..... | ☒ VN Vietnam |
| ☒ KG Kirguistán..... | ☒ YU Yugoslavia |
| ☒ KP República Popular Democrática de Corea..... | ☒ ZA Sudáfrica |
| ☒ KR República de Corea..... | ☒ ZM Zambia |
| ☒ KZ Kazajistán..... | ☒ ZW Zimbabwe |
| ☒ LC Santa Lucía..... | |
- Casillas reservadas para designar estados (a los fines de una patente nacional) que formen parte del PCT luego de la edición de esta hoja
- ☒ País disponible al momento de la presentación pero no incluido en este formulario

Declaración preventiva de designación: edicionalmente a las designaciones efectuadas arriba, el solicitante también hace, de acuerdo con la regla 4.9(b), todas las designaciones permitidas por el PCT, excepto aquellas indicadas en el Campo Suplementario como excluidas del ámbito de esta declaración. El solicitante declara que tales designaciones suplementarias están sujetas a confirmación y que cualquier designación no confirmada antes de la expiración de los 15 meses a partir de la fecha de prioridad es abandonada por el solicitante a la expiración de este plazo. (La confirmación (incluyendo tasas) debe acceder a la oficina receptora dentro de tal plazo de 15 meses).

Campo Suplementario Si el campo suplementario no es utilizado, esta hoja no se debe incluir en la solicitud

1. En el caso de que en uno de los campos sea insuficiente el espacio para suministrar toda la información, escribir "continuación del campo Nº....." (indicar el número del campo) y suministrar la información de la misma manera que la requerida de acuerdo con las leyendas del campo en el que el espacio era insuficiente, en particular:
 - (i) Si más de dos personas están involucradas como solicitantes y/o inventores y no está disponible una "Hoja de continuación": en tal caso, escribir "Continuación del campo Nº III" e indicar, para cada persona adicional, el mismo tipo de información que la requerida en el Campo Nº III. El país de la dirección indicado en este campo es el estado (esto es, el país) de residencia del solicitante si no está indicado abajo el estado de residencia.
 - (ii) Si en el campo Nº II o en cualquier Subcampo del campo Nº III está marcada la indicación "el estado indicado en el campo suplementario": en este caso, escribir "Continuación de campo Nº II" o "Continuación del campo Nº III" o "Continuación de los campos Nº II y Nº III" (según sea el caso), indicar el nombre de(la/s) solicitante(s) involucrados y, próximo a (cada uno de) tales nombres, el estado, (y/o, cuando corresponda, Patente ARIPO, Eursáfrica, Europea u OAPI), a los fines por los cuales la persona nombrada es solicitante.
 - (iii) Si en el campo Nº II o en cualquier Subcampo del campo Nº III el inventor o el inventor/solicitante no es inventor a los fines de todos los estados designados o a los fines de E.E.U.U.: en tal caso, escribir "Continuación de campo Nº II" o "Continuación del campo Nº III" o "Continuación de los campos Nº II y Nº III" (según sea el caso), indicar el nombre de(la/s) inventor(es) involucrados y, próximo a (cada uno de) tales nombres, el estado, (y/o, cuando corresponda, Patente ARIPO, Eursáfrica, Europea u OAPI), a los fines por los cuales la persona nombrada es inventor.
 - (iv) Si existe(n) otro(s) agente(s) adicionalmente a los indicados en el campo Nº IV: en tal caso, escribir "Continuación de campo Nº IV" e indicar, para cada otro agente, el mismo tipo de información que la requerida en el campo Nº IV.
 - (v) Si en el campo Nº V el nombre de un estado (u OAPI) es acompañado por la indicación "patente de adición" o "certificado de adición", o si en el campo Nº V el nombre de E.E.U.U. es acompañado por una indicación "continuación" o "continuación-parte": en tal caso, escribir "Continuación del campo Nº V", el nombre de cada estado (u OAPI) involucrado y luego el nombre de cada estado (u OAPI), el número del título o solicitud relacionado y la fecha de otorgamiento del título o solicitud relacionado.
 - (vi) Si en el campo Nº VI existen más de tres solicitudes anteriores cuya prioridad es reclamada: en tal caso, escribir "Continuación del campo Nº VI" e indicar, para cada solicitud adicional anterior, el mismo tipo de información que la requerida en el campo Nº VI.
 - (vii) Si en el campo VI la solicitud anterior es una solicitud ARIPO, en tal caso, escribir "Continuación del Campo Nº VI" especificar la cantidad de firm correspondientes a tal solicitud anterior e indicar a lo menos un país que participe de la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial en el cual fue presentada la solicitud anterior.
2. Si con respecto a la declaración preventiva de designación contenida en el campo Nº V, el solicitante desea excluir un estado(s) del ámbito de esta declaración: en tal caso, escribir "Designación(ones) excluida(s) de la declaración preventiva de designación" e indicar el nombre del código de dos letras de cada estado excluido de esta manera.
3. Si el solicitante reivindica, con respecto a cualquier oficina designada, los beneficios de disposiciones de la ley nacional concerniente a revelaciones no perjudiciales o a excepciones por falta de novedad: en tal caso, escribir "Declaración concerniente a revelaciones no perjudiciales o a excepciones por falta de novedad" y suministrar abajo tal declaración.

Continuación del Campo Nº IV:

BRANIGAN, Allen E. J.
BRANIGAN, Jennifer J.
HEANEY, Brian P.
MILLEN, I. William
MOSES, John R.
RULAND, James E.
SHUBIN, Harry B.
SOPP, John A.
TRAVERSO, Richard J.
WHITE, John L.
ZELANO, Anthony J.
McCARTHY, Robert E.
HENTOR, Casaba
KINSEY, Nicole

Todos miembros de la firma MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C. en la dirección, números de teléfono y facsimil indicados en el campo Nº IV.

Campo Nº VI -REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD ☐ Otras reivindicaciones de prioridad están indicadas en el campo suplementario				
Fecha de presentación de la solicitud anterior (día/mes/año)	Número de la solicitud anterior	Solicitud nacional: País	Solicitud regional: Oficina regional	Solicitud internacional: Oficina receptora
(1) 01 de mayo de 2002	60/376,666	US		
(2)				
(3)				
☒ Se solicita a la oficina receptora preparar y transmitir a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) (solo si la solicitud anterior fue presentada ante el organismo que es la oficina receptora a los fines de la presente solicitud internacional) identificada(s) arriba con los ítem:(1) * Cuando la solicitud anterior es una solicitud ARIPO, es obligatorio indicar en el campo suplementario a lo menos un país participante de la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial ante el cual se presentó la solicitud anterior (regla 4.10(b)(ii). Ver campo suplementario				
Campo Nº VII Organismo de Búsqueda Internacional				
Elección de Organismo de Búsqueda Internacional (ISA): (Indicar el organismo elegido cuando dos o más Organismos de Búsqueda Internacional son competentes para llevar a cabo la búsqueda internacional; se puede utilizar el código de dos letras): ISA/EP		Solicitud para utilizar resultados de búsquedas anteriores; referencia a ti búsqueda: (cuando una búsqueda anterior fue llevada a cabo por o solicitada ante el Organismo de Búsqueda Internacional): Fecha(día/mes/año) Número País (u oficina regional)		
Campo Nº VIII Listado de verificación; Lengua de presentación				
Esta solicitud internacional contiene la siguiente cantidad de hojas: Solicitud : 5 hojas Descripción (excluyendo la parte de listado de secuencias : 40 hojas Reivindicaciones : 3 hojas Resumen : 1 hojas Ilustraciones : 8 hojas Parte de listado de secuencias de la descripción : 5 hojas Cantidad total de hojas : 62 hojas		Esta solicitud internacional es acompañada por los ítem marcados abajo: 1. ☒ Hoja de cálculo de tasas (duplicado) 2. ☐ Poder del abogado firmado por separado 3. ☐ Copia del poder general del abogado, número de referencia, si existe 4. ☐ Declaración explicando la falta de firma 5. ☐ Documento(s) de prioridad identificado(s) como ítem en el campo Nº VI 6. ☐ Traducción de la solicitud internacional al (lenguas) 7. ☐ Indicaciones separadas concernientes a los microorganismos depositados o a otro material biológico 8. ☐ Secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos listados en forma legible por computadora 9. ☒ Otros (especificar): Transmisión		
Figura de las ilustraciones que pueden acompañar el resumen: Fig. 1		Lengua de presentación de la solicitud internacional: INGLÉS		
Campo Nº IX Firma del solicitante o del agente				
Próximo a cada una de las firmas indicar el nombre de la persona, firmante y la capacidad por la cual firma (si tal capacidad no es obvia por lectura de la solicitud)				
Firmado Anthony J. ZELANO Agente del Solicitante				
Para uso exclusivo de la Oficina Receptora				
1. Fecha de recepción real de la solicitud internacional pretendida:		2. Ilustraciones ☐ Recibidas ☐ No recibidas		
3. Fecha corregida de la recepción real debido a escritos o ilustraciones que completan la solicitud internacional pretendida y recibidos más tarde pero en término:				
4. Fecha de recepción en término de las correcciones requeridas según artículo PCT 11(2):				
5. Organismo de Búsqueda Internacional (cuando o dos o más competentes) ISA/	6. ☐ Transmisión de copia de búsqueda demorada hasta el pago de la tasa de búsqueda			
Para uso exclusivo de la Oficina Internacional				
Fecha de recepción de la copia registrada por la Oficina Internacional:				

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US03/13521

56572

198

14 - 8 2003

199

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ZELANO, Anthony, J.
Millen, White, Zelano & Branigan,
P.C.
Arlington Courthouse Plaza 1
Suite 1400
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, VA 22201
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 13 June 2003 (13.06.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference BERLX 320 WO	International application No. PCT/US03/13521

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (for all designated States except US)
LIGHT, David et al (for US)

International filing date : 30 April 2003 (30.04.03)
Priority date(s) claimed : 01 May 2002 (01.05.02)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 05 June 2003 (05.06.03)
List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW
EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP : AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR
OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National : AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,
EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,
LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the international Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
☐ confirmation of precautionary designations (if applicable)
☐ requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 28, Switzerland	Authorized officer: SUAREZ Javier
Facsimile No. (41-22) 740-1435	Telephone No. (41-22) 338 9999

Form PCT/IB/301 (April 2002)

005891217

7/12/03
198

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 38 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office where a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 18 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 18928, 18932 and 18934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette ("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.8(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.8(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.8(c) before the expiration of 15 months from the priority date (this time limit may not be extended). If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. The Notice of confirmation and payment must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 18 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 18-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 18-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 18-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

1657-200
201

PCT

Notificación de Recepción de
Copia Registrada

(Regla PCT 24.2(a))

De la OFICINA INTERNACIONAL

A:

ZELANO, Anthony J.
Millen, White, Zelano & Branigan, P.C.
Suite 1400
Arlington Courthouse Plaza 1
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, VA 22201
E.E.U.U.

Fecha de envío (día/mes/año): 13 de junio de 2003 (16.06.03)	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE
Referencia del solicitante o del agente: BERLX 320 WO	Solicitud Internacional Nº: PCT/US 03/13521

Se notifica al solicitante por este medio que la Oficina Internacional ha recibido la copia registrada de la Solicitud Internacional, como se detalla abajo.

Nombre(s) del(los) solicitante(s) y países para los cuales son solicitudes

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (para todos los países designados excepto E.E.U.U.)
LIGHT, David et al. (para E.E.U.U)

Fecha de presentación internacional	30 de abril de 2003 (30.04.03)
Fecha de prioridad reivindicada	01 de mayo de 2002 (01.05.02)
Fecha de recepción de la copia registrada por La Oficina Internacional	05 de junio de 2003 (05.06.03)

Lista de Oficinas designadas:

AP: GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
Nacional: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

ATENCIÓN

El solicitante debe verificar cuidadosamente los datos que aparecen en esta notificación. En caso de cualquier discrepancia entre estos datos y las indicaciones de la solicitud internacional, el solicitante debe informar inmediatamente a la Oficina Internacional.

Además, el solicitante debe prestar atención a la información contenida en el anexo, relacionada con:

- ☒ plazo para ingresar en la fase nacional – ver Información importante actualizada (como de abril de 2002)
- ☐ confirmación de designaciones preventivas (si es necesario)
- ☐ requerimientos con respecto a documentos de prioridad (si es necesario)

Se envía una copia de esta notificación a la Oficina Receptora y al Organismo de Búsqueda Internacional.

La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza	Funcionario autorizado: SUAREZ Javier
Fax/mil Nº: (41-22) 740-1435 Formulario PCT/IB/301 (abril 2002)	Teléfono Nº: (41-22) 338 9999 005891217

INFORMACIÓN DE PLAZOS PARA INGRESAR EN LA FASE NACIONAL

Se recuerda al solicitante que la "fase nacional" debe ser ingresada ante cada una de las oficinas designadas indicadas en la carátula de esta notificación mediante el pago de tasas nacionales y suministrando traducciones, tal como está prescrito por los artículos 22 y 39 y las leyes nacionales aplicables. Además, el solicitante debe cumplir con otros requerimientos especiales aplicables de determinadas oficinas. Es responsabilidad del solicitante asegurar que los pasos necesarios para ingresar en la fase nacional estén ejecutados en el tiempo establecido. La mayoría de las oficinas no envían recordatorios para los solicitantes con respecto al ingreso en la fase nacional.

El plazo aplicable para ingresar en la fase nacional es, con sujeción a lo que dice el siguiente párrafo, de 30 meses a partir de la fecha de prioridad, no solo con respecto a cualquier oficina seleccionada en la que se presentó una demanda de Examen Preliminar Internacional antes de la expiración de 19 meses a partir de la fecha de prioridad (ver artículo 36(1)), sino también, en ausencia de la presentación de tal demanda, con respecto a cualquier oficina designada en la cual se aplica el artículo 22(1), modificado en sus efectos a partir del 1 de abril de 2002, en relación con tal oficina designada. Para mayores detalles, ver la PCT Gazette N° 44/2001, del 1 de noviembre de 2001, pp. 19926, 19932 y 19934, así como los ejemplares de PCT Newsletter, octubre y noviembre de 2001 y febrero 2002.

En la práctica, los plazos distintos a 30 meses se aplican continuamente, para varios períodos de tiempo, con respecto a determinadas oficinas designadas o seleccionadas. Para actualizaciones normales de los plazos aplicables (20, 21, 30 o 31 meses, u otros plazos), oficina por oficina, remítase a la PCT Gazette (parte "Section IV", publicada semanalmente), al PCT Newsletter (mensual) y a los capítulos nacionales relevantes que figuran en el volumen II la Guía PCT del Solicitante (del cual la versión en papel se actualiza usualmente dos veces al año y la versión de Internet semanalmente). Finalmente, en el sitio de Internet de WIPO está disponible una tabla acumulativa de todos los tiempos límites aplicables para ingresar en la fase nacional, mediante vínculos con varias páginas, el sitio incluye aquellos de Gazette, Newsletter y guía, en <http://wipo.int/pct/en/index/html>.

La información acerca de los requerimientos para presentar una demanda de Examen Preliminar Internacional se encuentra en la Guía PCT del Solicitante, volumen I/A, capítulo IX. Hacemos notar que solo un solicitante que tenga la nacionalidad o sea residente de un país signatario del PCT comprometido por el capítulo II posee los derechos para presentar la demanda de Examen Preliminar Internacional (actualmente, todos los estados signatarios del PCT están comprometidos por el capítulo II).

CONFIRMACIÓN DE DESIGNACIONES PREVENTIVAS

Esta notificación lista solo designaciones específicas realizadas bajo la regla 4.9(a) en el requerimiento. Es importante verificar que estas designaciones sean correctas. Los errores en la designación pueden ser corregidos cuando las designaciones preventivas fueron efectuadas según la regla 4.9(b). Se recuerda por este medio al solicitante que toda designación preventiva debe ser confirmada de acuerdo con la regla 4.9(c) antes de la expiración de 16 meses a partir de la fecha de prioridad (este plazo no será extendido). Si no se confirma, será automáticamente considerada como abandonada por el solicitante. No existirán recordatorios ni invitaciones. La confirmación de una designación consiste en la presentación de un escrito especificando el estado designado concierne (con indicación del tipo de protección o tratamiento deseado) y el pago de las tasas de designación y de confirmación. El escrito de confirmación y el pago deben llegar a la oficina receptora en el plazo de 16 meses.

REQUERIMIENTOS CON RESPECTO A LOS DOCUMENTOS DE PRIORIDAD

Para los solicitantes que aún no cumplieron con los requerimientos con respecto a los documentos de prioridad, se les recuerda lo siguiente.

Cuando se reivindica la prioridad de una solicitud nacional, regional o internacional anterior, el solicitante debe enviar una copia de tal solicitud anterior, certificada por el Organismo al cual fue presentado ("el documento de prioridad") a la oficina receptora (que lo transmitirá a la Oficina Internacional) o directamente a la Oficina Internacional) antes de la expiración del 16 meses a partir de la fecha de prioridad, estableciendo que todo documento de prioridad ha sido enviado a la Oficina Internacional antes de la fecha de la publicación internacional o de la solicitud internacional, en cuyo caso tal documento será considerado como haber sido recibido por la Oficina Internacional el último día del término de 16 meses (regla 17.1(a)).

Cuando el documento de prioridad es distribuido por la oficina receptora, el solicitante puede, en lugar de enviar el documento de prioridad, requerir de la oficina receptora que prepare y transmita el documento de prioridad a la Oficina Internacional. Tal requerimiento debe ser efectuado antes de la expiración del plazo de 16 meses y pueda quedar sujeto por la oficina receptora al pago de una tasa (regla 17.1(b)).

Si el documento de prioridad concierne no es enviado a la Oficina Internacional o si no se efectuó el requerimiento a la oficina receptora de que prepare y transmita el documento de prioridad (y se pagó la correspondiente tasa, si es pertinente) dentro del plazo aplicable bajo los párrafos precedentes, un estado designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad, pues está establecido que tal estado no designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad concierne antes de dar al solicitante una oportunidad, al entrar en la fase nacional, de suministrar el documento de prioridad en un tiempo límite razonable con las circunstancias.

Cuando se reivindican varias prioridades, la fecha de prioridad a ser considerada para el propósito de computar el plazo de 16 meses es la fecha de presentación de la solicitud más antigua por la que se reivindica prioridad.

PATENT COOPERATION TREATY

202

203

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

ZELANO, Anthony, J.
Millen, White, Zelano & Branigan,
P.C.
Arlington Courthouse Plaza 1
Suite 1400
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, VA 22201
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 13 June 2003 (13.06.03)	
Applicant's or agent's file reference BERLX 320 WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US03/13521	International filing date (day/month/year) 30 April 2003 (30.04.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 01 May 2002 (01.05.02)
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
01 May 2002 (01.05.02)	60/376,566	US	06 June 2003 (06.06.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer SUAREZ Javier
Facsimile No. (41-22) 740-1435	Telephone No. (41-22) 338 8989

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

205
204

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación concerniente al envío o transmisión del Documento de prioridad

(Instrucciones Administrativas PCT, sección 411)

A:

ZELANO, Anthony J.
Millen, White, Zelano & Branigan, P.C.
Suite 1400
Arlington Courthouse Plaza 1
2200 Clarendon Boulevard
Arlington, VA 22201
E.E.U.U.

Fecha de envío (día/mes/año): 13 de junio de 2003 (13.06.03)	
Referencia del solicitante o del agente: BERLX 320 WO	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE
Solicitud Internacional N°: PCT/US 03/13521	Fecha de presentación (día/mes/año): 30 de abril de 2003 (30.04.03)
Fecha de publicación Internacional (día/mes/año): Aún sin publicar	Fecha de prioridad (día/mes/año): 01 de mayo de 2002 (01.05.02)
Solicitante: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.	

- Se notifica al solicitante por medio de la presente de la fecha de recepción (excepto cuando aparecen las letras "NR" en la columna derecha) por la Oficina Internacional del(los) documento(s) que se refieren a la(s) solicitud(es) anterior(es) indicada(s) abajo. En tanto no aparezca un asterisco próximo a la fecha de recepción o las letras "NR" en la columna derecha, el documento de prioridad concerniente ha sido enviado o transmitido a la Oficina Internacional, en cumplimiento de la PCT 17.1(a) o (b).
- Esta actualiza y reemplaza cualquier notificación anterior concerniente al envío o transmisión de documentos de prioridad.
- Un asterisco que aparece próximo a la fecha de recepción, en la columna de la derecha, denota un documento de prioridad enviado o transmitido a la Oficina Internacional pero que no cumple con la regla PCT 17.1(a) o (b). En tal caso, la atención del solicitante se debe dirigir a la regla 17.1(c), que establece que un organismo no designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad antes de dar al solicitante una oportunidad, al entrar en la fase nacional, de suministrar el documento de prioridad en un tiempo límite razonable con las circunstancias.
- Las letras "NR" que aparecen en la columna derecha denotan un documento de prioridad que no fue recibido por la Oficina Internacional o del que el solicitante no requirió a la Oficina Receptora que lo prepare y transmita a la Oficina Internacional, como establece la regla 17.1(a) o (b), respectivamente. En tal caso, la atención del solicitante se debe dirigir a la regla 17.1(e), que establece que un organismo no designado debe pasar por alto la reivindicación de prioridad antes de dar al solicitante una oportunidad, al entrar en la fase nacional, de suministrar el documento de prioridad en un tiempo límite razonable con las circunstancias.

<u>Fecha de Prioridad</u>	<u>Solicitud de Prioridad</u>	<u>País u Oficina Regional u Oficina receptora del PCT</u>	<u>Fecha de Recepción o del Documento de Prioridad</u>
01 de mayo de 2002 (01.05.02)	60/376,566	E.E.U.U.	06 de junio de 2003 (06.06.03)

La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza	Funcionario autorizado: SUAREZ Javier
Facsimil N°: (41-22) 740-1435 Formulario PCT/IB/304 (julio 1998)	Teléfono N°: (41-22) 338 9999 003691216

204
205

NIT : 800174089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 04110562 29060000

Folios: 204

Fecha (ANY): 2004-11-25 11:09:56

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2026 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 91,214
FECHA : NOVIEMBRE 24 DE 2004

===== CONSIGNACION =====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
GUSTAVO HOLLMAN	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	29812348	24/11/2004	6,661,000.00

===== CONCEPTO =====

CANT.	CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

Ref.: 56572

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04118562 00000000 Folios: 204
Fecha (AFB): 2004-11-25 11:09:36
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	()	(/)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	(/)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	(/)
- Descripción de la invención.	()	(/)
- Dibujos de ser estos pertinentes. ☒	()	(/)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable: Claudia M Nueva

Fecha:

206
207

2020

Bogotá D C

Doctor(a) A
GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO
Apoderado(a)
SCGERING AG

11483

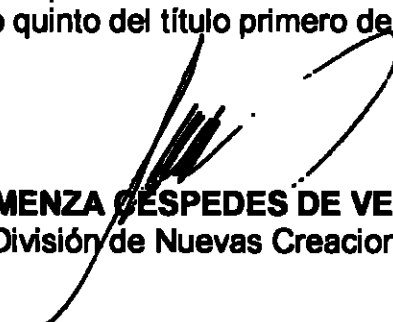
REFERENCIA:	Radicación N°	04-118562
	Solicitud internacional	PCT/US03/113521
	Fecha inicio fase nacional	2004-12-01
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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:

- En caso que el examen preliminar contenga anexos estos deben ser adjuntados junto con su traducción.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 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 N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA GESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,
17 DIC. 2004
202063