

ANTICUERPOS ANTI-GLICOPROTEÍNA IB ALFA HUMANIZADA (GPIBALPHA)

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS Y DECLARACIÓN DE LISTA DE SECUENCIAS

5 Esta solicitud reclama prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense Número de Serie 62/946,086 presentada el 10 de diciembre de 2019 e incorporada a la presente en su totalidad. La lista de secuencias asociada con esta solicitud se proporciona en formato de texto y se incorpora en el presente documento por referencia en la especificación. El nombre del archivo de texto que contiene la lista de secuencias es PCT_-
10 _Sequence_listing_as_filed. El archivo de texto es de 81.2 Ko, se creó el 9 de diciembre de 2020 y se envía electrónicamente.

CAMPO TECNOLÓGICO

La presente descripción se refiere a anticuerpos humanizados que reconocen y se unen específicamente a la glicoproteína plaquetaria 1(b) α (GPIb α), así como también al
15 constructo de proteína que comprende al mismo, y a los usos terapéuticos asociados a estos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La adhesión y la agregación plaquetaria en los sitios de ruptura aterosclerótica en las arterias coronarias o cerebrales suelen ser los eventos críticos en la trombosis aguda. Por lo tanto, la terapia anti-plaquetaria representa uno de los regímenes de tratamiento clave para reducir las muertes cardiovasculares, que incluyen (i) los inhibidores de la ciclooxigenasa tales como la aspirina; (ii) antagonistas del receptor plaquetario P2Y₁₂
25 tales como clopidogrel, prasugrel y ticagrelor; (iii) antagonistas de α IIb β 3 tales como abciximab, eptifibatida y tirofiban; y (iv) antagonistas de PAR1 como vorapaxar, etc. Sin embargo, las limitaciones de las terapias anti-plaquetarias actuales, tales como una inhibición lenta/débil/deficiente de la función de plaquetas, complicaciones de sangrado excesivo, trombocitopenia y activación de plaquetas inesperada son preocupaciones
30 importantes que impulsan avances terapéuticos. En particular, en relación con el accidente cerebrovascular isquémico agudo, ya que el riesgo de hemorragia intracraneal y/o

neurotoxicidad potencial (por ejemplo, activador del plasminógeno tisular recombinante (tPA)) de los fármacos antitrombóticos/trombolíticos actuales, así como para los pacientes que han pasado la ventana para la trombólisis intravenosa, los tratamientos son muy limitados si no están disponibles.

- 5 El complejo plaquetario GPIb-IX-V se ha convertido en un objetivo anti-plaquetario prometedor. El complejo GPIb-IX-V es un receptor plaquetario clave en el inicio de la adhesión y translocación de las plaquetas a la pared del vaso lesionado, particularmente en condiciones de alto cizallamiento. La adhesión/translocación de plaquetas al subendotelio está mediada por la unión de la subunidad GPIb α al factor de von Willebrand
- 10 (VWF) que se ancla/inmoviliza en la pared del vaso lesionado. El VWF es una proteína sanguínea adhesiva multimérica secretada por células endoteliales y plaquetas activadas. La unión de GPIb α -VWF puede entonces desencadenar un proceso de transducción de señales que conduce a la liberación de agonistas plaquetarios, como tromboxano A2 y ADP, y la activación de la integrina de plaquetas α IIb β 3 que da como resultado la
- 15 agregación plaquetaria mediada por la unión de α IIb β 3 al fibrinógeno, VWF, etc. Bajo condiciones de alto cizallamiento, la interacción GPIb α -VWF es necesaria para el crecimiento patológico de trombos oclusivos (tanto la adhesión de plaquetas como la agregación/aglutinación de plaquetas) en sitios de estenosis arterial donde la sangre fluye con velocidades de cizallamiento de la pared que pueden exceder 10,000-40,000 s⁻¹.
- 20 mientras que en condiciones de bajo cizallamiento (como en la mayoría de los casos de hemostasia), la adhesión de plaquetas puede estar mediada directamente por interacciones α IIb β 3-fibrinógeno/fibrina y α 2 β 1/GPVI-colágeno, etc. Por lo tanto, la inhibición farmacológica de GPIb α puede dar como resultado un menor riesgo de hemorragia sistémica y una mayor seguridad en comparación con otros fármacos anti-
- 25 plaquetarios que no se dirigen específicamente a la trombosis a alto cizallamiento. También se ha demostrado que GPIb α es importante para el reclutamiento de leucocitos en condiciones trombo inflamatorias, como en el accidente cerebrovascular isquémico agudo. Además, la isquemia-reperfusión (por ejemplo, mediante trombólisis o trombectomía) de las áreas cerebrales previamente hipóxicas puede aumentar la función
- 30 proinflamatoria de las plaquetas a través de GPIb α , lo que puede promover aún más el daño neuronal trombo inflamatorio y el crecimiento del infarto. Además, se ha considerado

que GPIb α se expresa exclusivamente en plaquetas y megacariocitos. De este modo, los antagonistas plaquetarios GPIb α directos tienen un gran potencial para ser desarrollados como fármacos anti-plaquetarios más seguros y efectivos para el tratamiento de eventos trombóticos agudos, tales como ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares.

- 5 En particular, se ha demostrado que las nuevas estrategias anti-plaquetarias dirigidas a la interacción GPIb α -VWF son una terapia efectiva para tratar la púrpura trombocitopénica trombótica adquirida (aTTP), una microangiopatía trombótica y una afección potencialmente mortal con una alta tasa de mortalidad si no se trata. Los autoanticuerpos contra ADAMTS13 (una desintegrina y metaloproteinasa con porción de trombospondina
- 10 tipo 1, miembro 13), la proteasa que escinde el VWF que escinde/reduce el tamaño multimérico del VWF, da como resultado una deficiencia grave de la actividad de ADAMTS13. Estos VWF ultra grandes son hiperadhesivos que provocan la formación de micro trombos de (GPIb α)-VWF en los vasos sanguíneos, lo que provoca isquemia e infarto del órgano diana, conteos bajos de plaquetas y destrucción de glóbulos rojos. De
- 15 este modo, el bloqueo de la interacción entre el VWF y la GPIb α de plaquetas puede prevenir el desarrollo de la TTP aguda al lograr una normalización más rápida de los conteos de plaquetas y reducir los eventos tromboembólicos.

El nanocuerpo caplacizumab dirigido al dominio VWF A1 ha sido aprobado para el tratamiento de adultos que experimentan un episodio agudo de aTTP, junto con recambio

- 20 plasmático (PEX) e inmunosupresión durante un mínimo de 30 días después de suspender la PEX diaria. Sin embargo, los eventos adversos relacionados con el sangrado fueron más comunes con caplacizumab (65% contra 48%), al igual que los eventos hemorrágicos graves (11% contra a 1%). Otra barrera del caplacizumab ha sido el enorme costo del fármaco. El precio actual de caplacizumab en 2020 fue más de 8000 USD por
- 25 dosis con regímenes de tratamiento que recomiendan la dosificación diaria durante 30 días después del último intercambio de plasma con la posibilidad de un tratamiento prolongado hasta que se recupere la actividad de ADAMTS13. Debido a que el VWF se libera constantemente del endotelio activado, los niveles relativamente estables de GPIb α en las plaquetas, que tienen una vida útil corta de 7 a 10 días en humanos, parecen ser un
- 30 objetivo más atractivo/potente para la terapia TTP.

La Patente CN103263662 describe una trombolisina anti-plaquetaria de lectina tipo C de

serpiente que se une a GPIIb α (snaclec) que se purifica a partir del veneno de la serpiente *Deinagkistrodon acutus*. La trombolisina anti-plaquetaria inhibe la agregación plaquetaria humana inducida por ristocetina y la trombosis mediante el bloqueo de las interacciones GPIIb-VWF sin alterar significativamente el tiempo de sangrado o la coagulación. La

5 trombolisina anti-plaquetaria se evalúa actualmente en los ensayos clínicos de fase II en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica adquirida e infarto de miocardio con elevación del segmento ST. Sin embargo, se sabe que las proteínas de serpiente extrañas pueden inducir una respuesta inmunitaria que genera anticuerpos antifármaco que pueden neutralizar el fármaco y eliminar la eficacia terapéutica. Además, estos anticuerpos pueden

10 causar reacciones alérgicas o la formación de complejos inmunitarios que pueden dañar los riñones o las articulaciones (artritis). Además, la necesidad de una nueva administración puede estimular las células inmunitarias de memoria y potenciar dichas respuestas inmunitarias y reacciones inmunitarias.

La Patente Estadounidense Número de Serie 7,049,128 describe polipéptidos de fusión

15 GPG-290 o GPIIb-290/2V-inmunoglobulina (Ig) recombinantes, que es una proteína quimérica soluble que contiene los 290 aminoácidos extracelulares mutantes GPIIb α N-terminal (G233V y M239V) unidos a través de una prolina al fragmento Fc de IgG1 humana. GPG-290 compite con la GPIIb α de plaquetas por la unión del VWF, con una afinidad por el VWF catorce veces mayor en comparación con la GPIIb α de tipo silvestre.

20 En modelos animales, la GPG-290 dependiente de la dosis prolonga el tiempo hasta la oclusión de la arteria coronaria e inhibe la agregación plaquetaria, la trombosis y la reducción del flujo cíclico coronario recurrente sin prolongar el tiempo de sangrado en dosis que oscilan entre 50 y 100 $\mu\text{g/kg}$. Sin embargo, la dosis más alta probada (500 $\mu\text{g/kg}$) indujo un aumento de tres a cuatro veces del tiempo de sangrado, probablemente

25 debido a que la GPG-290 se une a la trombina alfa con una afinidad alta que hace que la trombina alfa no esté disponible para la hemostasia.

La patente estadounidense número de serie 7,727,535 describe además una proteína de fusión variante de GPIIb-290/2V/FFF-Ig (Y276F, Y278F y/o Y279F), que mostró una unión de afinidad limitada/menor a la trombina alfa y tuvo una disminución del 50% de potencia

30 para inhibir la trombosis repetitiva de la arteria coronaria (es decir, inhibir la reducción del flujo cíclico coronario recurrente), y para prolongar los tiempos de sangrado de cola y

aumentar los tiempos de cierre de ADP evaluados por un analizador de función de plaquetas-100 (PFA-100) en comparación con GPG-290. Sin embargo, estas proteínas de fusión GPIb-Ig son proteínas quiméricas de alto peso molecular (~130 kDa), que se dirigen principalmente al VWF inmovilizado en el subendotelio o al VWF plasmático bajo altas velocidades de cizallamiento. De este modo, la cantidad y accesibilidad de estas proteínas de fusión son menos predecibles y la gran cantidad de productos a inyectar podría ser una limitación potencial. Otra limitación podría ser el riesgo de generación de anticuerpos antifármacos. Las proteínas de fusión GPIb-Ig son proteínas quiméricas obtenidas por bioingeniería. Aunque tanto los polipéptidos GPIb α como el fragmento Fc se derivan de genes humanos, lo que puede minimizar su antigenicidad, las mutaciones variantes de GPIb α y las regiones conjuntas entre GPIb α y la porción Fc pueden generar neoepítomos que pueden inducir una respuesta inmunitaria. Además, la proteína de fusión puede generar algunos neoepítomos conformacionales que inducen la producción de anticuerpos antifármacos.

También se describieron en la técnica anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra GPIb α humana (mAb anti-GPIb α). Sin embargo, la mayoría de los mAbs anti-GPIb α disponibles hasta la fecha son de origen murino y, de este modo, pueden provocar una respuesta anti-ratón humana en el uso clínico. Además, los mAbs anti-GPIb α intactos a menudo conducen a la activación de plaquetas, probablemente debido a que la unión de los mAbs intactos indujo la transducción de señalización mediada por GPIb α de plaquetas, lo que puede agravar inesperadamente la agregación plaquetaria y la trombosis. Además, los mAbs anti-GPIb α intactos que se unen a las plaquetas pueden desencadenar la eliminación de plaquetas tanto dependiente de Fc como independiente de Fc, lo que lleva a la trombocitopenia (es decir, conteos bajos de plaquetas). De este modo, los mAbs anti-GPIb α intactos presentan un potencial terapéutico muy limitado.

El documento CN102988983 describe un fragmento Fab del anticuerpo quimérico chSZ2, un mAb quimérico contra GPIb α humana, que inhibe la agregación plaquetaria inducida por ristocetina *in vitro* de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, dado que es un anticuerpo quimérico que retiene las regiones variables del anticuerpo de ratón y las regiones constantes se reemplazan por las de humano, la inmunogenicidad sigue siendo una preocupación importante. Es importante destacar que la función *in vivo* de chSZ2 para

prevenir/tratar enfermedades trombóticas nunca se ha demostrado, debido a la escasez de modelos animales, ya que es posible que no reconozca GPIIb α de otras especies animales reconocidas en el campo.

La Patente Estadounidense Número de Serie 7,332,162 describe otro fragmento Fab del
5 6B4 humanizado (h6B4-Fab), un mAb murino que se generó contra GPIIb α humana purificada. h6B4-Fab redujo o eliminó por completo las reducciones de flujo cíclico de una arteria femoral estenosada en babuinos. Sin embargo, el efecto antitrombótico de h6B4-Fab se acompañó de una prolongación del tiempo de sangrado. Además, estos anticuerpos anti-GPIIb α , así como sus correspondientes fragmentos Fab, se generaron en
10 ratones de tipo silvestre utilizando técnicas convencionales (es decir, inmunizados con GPIIb α humana) que no pueden reconocer la GPIIb α de ratón (porque la GPIIb α humana y de ratón poseen un grado importante de homología), y el repertorio de los anticuerpos producidos contra los epítomos presentes en la GPIIb α humana y ausentes en la GPIIb α del ratón es limitado. De este modo, estos mAbs no pueden caracterizarse y evaluarse en
15 roedores u otras especies animales para la importante farmacología preclínica, estudios de toxicología y farmacocinética. También es motivo de preocupación si el h6B4-Fab puede causar activación de plaquetas, ya que su precursor mAb 6B4 puede causar claramente activación de plaquetas y trombocitopenia grave.

De este modo, existe la necesidad de un agente terapéutico mejorado que se dirija al
20 complejo plaquetario GPIIb-IX-V que no provoque activación de plaquetas, destrucción de plaquetas, trombocitopenia ni complicaciones hemorrágicas significativas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente descripción se refiere a un anticuerpo humanizado y que reconoce
25 específicamente la glicoproteína I(b) α (GPIIb α) y un constructo de proteína que comprende la misma, así como los usos terapéuticos asociados a la misma. El anticuerpo humanizado es capaz de prevenir la activación de plaquetas, agregación, y/o el crecimiento de trombos (particularmente a alto cizallamiento), carece de la capacidad de activar las plaquetas (por ejemplo, no activa las plaquetas), carece de la capacidad de inducir trombocitopenia; y/o a
30 una dosis terapéutica, carece de la capacidad de prolongar el tiempo de sangrado.

En un primer aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado que

reconoce específicamente la glicoproteína I(b) α (GPIb α). El anticuerpo humanizado carece de una porción de receptor Fc. El anticuerpo humanizado es capaz de prevenir la activación, agregación y/o crecimiento de trombos de plaquetas; carece de la capacidad de activar las plaquetas; carece de la capacidad de inducir trombocitopenia; y/o a una

5 dosis terapéutica, carece de la capacidad de prolongar el tiempo de sangrado. En una modalidad, el anticuerpo humanizado es capaz de reconocer una GPIb α humana, una GPIb α de ratón, una GPIb α de perro, una GPIb α de rata, una GPIb α de conejo y/o una GPIb α de mono. En otra modalidad, el anticuerpo humanizado es un fragmento de anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo puede ser un fragmento F(ab)₂. Por ejemplo, el

10 fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo Fab. En otra modalidad, el fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento variable de cadena única (scFv). En una modalidad, el anticuerpo humanizado tiene una cadena pesada. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende: una primera CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 37), una variante de la misma o un fragmento de la

15 misma; una segunda CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de SITSAGTPYYPDSVLG (SEQ ID NO: 38), una variante de la misma o un fragmento de la misma; y/o una tercera CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de SRGYEDYFDY (SEQ ID NO: 39), una variante de la misma o un fragmento de la misma. En aún otra modalidad, la cadena pesada comprende además una región CH1 de un anticuerpo IgG1

20 humano. Por ejemplo, la región CH1 del anticuerpo IgG1 humano tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, 47, 54 o 61, una variante de la misma o un fragmento de la misma. En una modalidad, la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57, una variante de la misma o un fragmento de la misma. En otra modalidad, el anticuerpo humanizado y monoclonal tiene una cadena ligera. En

25 algunas modalidades, la cadena ligera comprende: una primera CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de KSSQSLNLSRNQKNYLA (SEQ ID NO: 65), una variante de la misma o un fragmento de la misma; una segunda CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de FTSTRES (SEQ ID NO: 66), una variante de la misma o un fragmento de la misma; y/o una tercera CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de QQHYSSPWT

30 (SEQ ID NO: 67), una variante de la misma o un fragmento de la misma. En algunas modalidades, la cadena ligera comprende además una región C de la cadena kappa de un

anticuerpo IgG₁ humano. En algunas modalidades adicionales, la región C de la cadena kappa tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68, 75, 82 u 89, una variante de la misma o un fragmento de la misma. En una modalidad adicional, la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64, 71, 78 u 85, una variante de la misma o un fragmento de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado tiene la cadena pesada de la SEQ ID NO: 36, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 36, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 36, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 78, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 36, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 85, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 78, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 85, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 50, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 50, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 50, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 78, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 50, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 85, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la

cadena pesada de la SEQ ID NO: 57, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, una variante de la misma o un fragmento de la misma; la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 78, una variante de la misma o un fragmento de la misma; o la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57, una variante de la misma o un fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 85, una variante de la misma o un fragmento de la misma.

10 En un segundo aspecto, la presente descripción proporciona una proteína quimérica que comprende el anticuerpo humanizado descrito en el presente documento y una proteína portadora.

En un tercer aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) el anticuerpo humanizado descrito o la proteína quimérica descrita en este documento y (ii) un excipiente farmacéutico.

15 En un cuarto aspecto, la presente descripción proporciona un método para prevenir o limitar la interacción entre la glicoproteína I(b) α (GPIb α) presente en una plaqueta y un ligando de GPIb α (como, por ejemplo, el factor de von Willebrand (VWF), la trombina, cininógeno, P-selectina, trombospondina, etc.), el método comprende poner en contacto el anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, la proteína quimérica descrita en el presente documento o la composición farmacéutica descrita en el presente documento con la plaqueta. En algunas modalidades, el método es para prevenir o limitar la activación de plaquetas. En una modalidad, el ligando de GPIb α es el factor de von Willebrand (VWF) y/o la trombina. En una modalidad específica, el anticuerpo humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica se ponen en contacto con la plaqueta antes, al mismo tiempo o después de que el ligando GPIb α se ponga en contacto con la plaqueta. En una modalidad adicional, el método es para prevenir o limitar la interacción *in vivo* en un sujeto que lo necesite. En otra modalidad, el método es para prevenir la formación o el crecimiento de un trombo en el sujeto que lo necesite. En otra modalidad, el método es para reducir el tamaño de un trombo o el número de trombos en el sujeto que lo necesite. En algunas modalidades, el método comprende además

determinar la presencia, la ubicación y/o el tamaño del trombo en el sujeto. En otra modalidad más, el sujeto corre el riesgo de experimentar o ha experimentado una trombosis patológica. En otra modalidad más, el sujeto está en riesgo de experimentar o ha experimentado un accidente cerebrovascular isquémico, una púrpura trombocitopénica trombótica, un infarto de miocardio, un síndrome coronario agudo, aterotrombosis, una enfermedad vascular periférica, trombosis venosa profunda, sepsis y/o inflamación vascular. En algunas modalidades, el método es para reducir o limitar la metástasis tumoral en el sujeto que lo necesite. En una modalidad adicional, las metástasis tumorales son metástasis tumorales hepáticas. En otra modalidad más, el método comprende además determinar la presencia, la ubicación y/o el tamaño de la metástasis tumoral en el sujeto.

En un quinto aspecto, la presente descripción proporciona el uso del anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, la proteína quimérica descrita en el presente documento o la composición farmacéutica para prevenir o limitar la interacción entre la glicoproteína I(b) α (GPIb α) presente en una plaqueta y el factor de von Willebrand (VWF) y/o trombina, así como otros ligandos de GPIb α . La presente descripción también proporciona el uso del anticuerpo humanizado descrito en este documento, la proteína quimérica descrita en este documento o la composición farmacéutica en la fabricación de un medicamento para prevenir o limitar la interacción entre la glicoproteína I(b) α (GPIb α) presente en una plaqueta y von Willebrand. (VWF) y/o trombina. El paso de contacto puede ocurrir con velocidades de cizallamiento bajas o altas. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado y monoclonal, la proteína quimérica o la composición farmacéutica son para prevenir o limitar la activación de plaquetas. En una modalidad específica, el anticuerpo humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica se ponen en contacto con la plaqueta antes, al mismo tiempo o después de que el VWF y/o la trombina, así como otros ligandos de GPIb α , se pongan en contacto con la plaqueta. En una modalidad adicional, el anticuerpo humanizado y monoclonal, la proteína quimérica o la composición farmacéutica son para prevenir o limitar la interacción *in vivo* en un sujeto que lo necesite. En otra modalidad, el anticuerpo humanizado y monoclonal, la proteína quimérica o la composición farmacéutica son para prevenir la formación o el crecimiento de un trombo en el sujeto que lo necesite. En otra modalidad, el anticuerpo monoclonal y

humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica es para reducir el tamaño de un trombo o el número de trombos en el sujeto que lo necesite. En algunas modalidades, la presencia, la ubicación y/o el tamaño del trombo se determinó previamente en el sujeto. En otra modalidad más, el sujeto corre el riesgo de experimentar o ha experimentado una trombosis patológica. En otra modalidad más, el sujeto está en riesgo de experimentar o ha experimentado un accidente cerebrovascular isquémico, una púrpura trombocitopénica trombótica, un infarto de miocardio, un síndrome coronario agudo, aterotrombosis, una enfermedad vascular periférica, trombosis venosa profunda, sepsis y/o inflamación vascular. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal y humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica son para reducir o limitar la metástasis tumoral en el sujeto que lo necesite. En una modalidad adicional, las metástasis tumorales son metástasis tumorales hepáticas. En otra modalidad más, la presencia, la ubicación y/o el tamaño de la metástasis tumoral se han determinado previamente en el sujeto.

En un sexto aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, una proteína quimérica descrita en el presente documento o una composición farmacéutica para prevenir o limitar la interacción entre la glicoproteína I(b) α (GPIb α) presente en una plaqueta y el factor de von Willebrand (VWF). y/o trombina. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado y monoclonal, la proteína quimérica o la composición farmacéutica son para prevenir o limitar la activación de plaquetas. En una modalidad específica, el anticuerpo humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica se ponen en contacto con la plaqueta antes, al mismo tiempo o después de que el VWF y/o la trombina, así como otros ligandos de GPIb α , se pongan en contacto con la plaqueta. En una modalidad específica, el anticuerpo humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica es para ponerse en contacto con la plaqueta a una velocidad de cizallamiento alta o baja. En una modalidad adicional, el anticuerpo monoclonal y humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica es para prevenir o limitar la interacción *in vivo* en un sujeto que lo necesite. En otra modalidad, el anticuerpo humanizado y monoclonal, la proteína quimérica o la composición farmacéutica son para prevenir la formación o el crecimiento de un trombo en el sujeto que lo necesite. En otra modalidad, el anticuerpo monoclonal y humanizado, la

proteína quimérica o la composición farmacéutica es para reducir el tamaño de un trombo o el número de trombos en el sujeto que lo necesite. En algunas modalidades, la presencia, la ubicación y/o el tamaño del trombo se determinó previamente en el sujeto. En otra modalidad más, el sujeto corre el riesgo de experimentar o ha experimentado una trombosis patológica. En otra modalidad más, el sujeto está en riesgo de experimentar o ha experimentado un accidente cerebrovascular isquémico, una púrpura trombocitopénica trombótica, un infarto de miocardio, un síndrome coronario agudo, aterotrombosis, una enfermedad vascular periférica, trombosis venosa profunda, sepsis y/o inflamación vascular. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal y humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica son para reducir o limitar la metástasis tumoral en el sujeto que lo necesite. En una modalidad adicional, las metástasis tumorales son metástasis tumorales hepáticas. En otra modalidad más, la presencia, la ubicación y/o el tamaño de la metástasis tumoral se han determinado previamente en el sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Habiendo descrito así de manera general la naturaleza de la invención, ahora se hará referencia a los dibujos adjuntos, que muestran a modo de ilustración, una modalidad preferida de la misma, y en los cuales:

La **Figura 1** muestra los resultados de una SDS-PAGE de Fabs humanizados en sobrenadantes en condiciones no reductoras. Las diferentes combinaciones de cadenas pesadas y ligeras se indican encima del gel. La escalera de peso molecular (en KDa) se muestra a la izquierda. Las flechas apuntan a los Fabs humanizados. Se usó albúmina de suero bovino (BSA) como control.

La **Figura 2** muestra los resultados de una transferencia Western de Fabs humanizados en condiciones no reductoras. Se cargaron aproximadamente 20 µL de sobrenadante en cada carril. La escalera de peso molecular (en KDa) se muestra a la izquierda. Se usaron anticuerpos de cadena pesada solamente (HCAb) como control.

Las **Figuras 3A a 3H** muestran los resultados de una SDS-PAGE en condiciones no reductoras (etiquetadas como "N") y reductoras (etiquetadas como "R") para Fab purificados que comprenden (**Fig. 3A**) las cadenas VH1 y VL2, (**Fig. 3B**) las cadenas VH1 y VL3, (**Fig. 3C**) las cadenas VH2 y VL1, (**Fig. 3D**) las cadenas VH3 y VL2, (**Fig. 3E**) las

cadena VH3 y VL3, (**Fig. 3F**) las cadenas VH4 y Cadenas VL1, (**Fig. 3G**) las cadenas VH4 y VL2 y (**Fig. 3H**) las cadenas VH4 y VL3.

Las **Figuras 4A y 4B** muestran que los Fabs H001 a H008 humanizados se unen a (Fig. 4A) plaquetas de ratón de tipo silvestre pero no a (Fig. 4B) plaquetas de ratón GPIb α -/- (5 μ g/mL). El "*" que se muestra en la Figura 4B indica la señal de control.

Las **Figuras 5A a 5E** muestran que los Fabs H001 ($\blacktriangle$) y H002 ($\blacktriangledown$) purificados se unen a (**Fig. 5A**) ratón, (**Fig. 5B**) perro, (**Fig. 5C**) humano, (**Fig. 5D**) rata y (**Fig. 5E**) plaquetas de conejo. La unión de Fabs humanizados a las plaquetas se analizó in vitro mediante un ensayo de citometría de flujo.

La **Figura 6** muestra los resultados de la citometría de flujo de que los Fabs H001 y H002 purificados se unen a plaquetas de mono.

La **Figura 7** muestra que el anticuerpo Fab H001 purificado se une a GPIb α recombinante en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR). (**Fig. 7A**) Los datos de SPR de inyecciones de 25 μ L de 500, 100, 50 y 10 nM de H001 se ajustan al modelo de unión cinética que produce: k_a (velocidad de activación) = $2.61 \times 10^7 \text{s}^{-1}$; k_d (velocidad de desactivación) = $1.1 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$; y K_d (disociación o constante de unión) = 4.4 nM. (**Fig. 7B**) Curva de respuesta a la dosis de la respuesta SPR de inyecciones de 25 μ L de 500, 100, 50 y 10 nM del Fab H001 purificado representada contra a la concentración de ligando. La curva se ajustó a un modelo de unión de ligando de un sitio que producía un ajuste $R^2 = 0.9929$ y una $K_d = 8.0 \pm 2.1$ nM.

Las **Figuras 8A a 8D** muestran trazas de agregometría estándar que indican que los Fab purificados (**Fig. 8A**) H001, (**Fig. 8B**) H002, (**Fig. 8C**) H005 y (**Fig. 8D**) H008 no indujeron la activación de plaquetas en plasma rico en plaquetas.

Las **Figuras 9A a 9D** muestran trazas de agregometría estándar que indican que los Fab purificados (**Fig. 9A y 9D**) H001 y (**Fig. 9B, 9C y 9D**) H002 inhiben la agregación plaquetaria inducida por ristocetina (A, B y D) o trombina en dosis bajas (C). Las plaquetas se obtuvieron de voluntarios sanos (A a C) o pacientes con enfermedad vascular periférica (D).

Las **Figuras 10A a 10D** muestran que los anticuerpos Fabs H001 (**Fig. 10A y 10B**) y H002 (**Fig. 10C y 10D**) inhiben la formación de trombos a partir de sangre entera humana en condiciones de velocidad de cizallamiento tanto bajo (300 s, **Fig. 10A y 10C**) como alto

(1800 s, **Fig. 10B y 10D**). (**Figura. 10A**) Fotografías representativas que muestran la formación de trombos plaquetarios después de perfundir sangre total humana heparinizada durante 1, 2 y 3 minutos, que se trataron con un amortiguador PBS de control (paneles superiores) y el anticuerpo Fab H001 humanizado (5 $\mu\text{g/mL}$, paneles inferiores) en condiciones de cizallamiento bajo (300 s^{-1}). (**Fig. 10B**) Fotografías representativas que muestran la formación de trombos de plaquetas después de perfundir sangre entera humana heparinizada durante 1, 2 y 3 minutos, que se trataron con un amortiguador PBS de control (paneles superiores) y el anticuerpo Fab H001 humanizado (2.5 $\mu\text{g/mL}$, paneles intermedios y 5 $\mu\text{g/mL}$, paneles inferiores) en condiciones de alto cizallamiento (1800 s^{-1}). (**Fig. 10C**) Fotografías representativas que muestran la formación de trombos plaquetarios después de perfundir sangre entera humana heparinizada durante 1, 2 y 3 minutos, que se trataron con un amortiguador PBS de control (paneles superiores) y el anticuerpo Fab H002 humanizado (5 $\mu\text{g/mL}$, paneles inferiores) en condiciones de bajo cizallamiento (300 s^{-1}). (**Fig. 10D**) Fotografías representativas que muestran la formación de trombos plaquetarios después de que se perfundiera sangre entera humana heparinizada durante 1, 2 y 3 minutos, que se trataron con un amortiguador PBS de control (paneles superiores) y el anticuerpo Fab H002 humanizado (2.5 $\mu\text{g/mL}$, paneles intermedios y 5 $\mu\text{g/mL}$, paneles inferiores) en condiciones de alto cizallamiento (1800 s^{-1}).

Las **Figuras 11A y 11B** muestran que los anticuerpos Fabs H001 y H002 humanizados prolongaron el tiempo de oclusión de los vasos en un modelo *in vivo* de trombosis de la arteriola mesentérica inducida por FeCl_3 . (**Figura 11A**) Histograma que muestra el tiempo hasta la oclusión (en minutos) en función del anticuerpo o la dosis utilizada. (**Fig. 11B**) Fotografías representativas de arteriolas tratadas con un control (paneles superiores), el anticuerpo Fab H001 humanizado (5 $\mu\text{g/ratón}$, paneles centrales), el anticuerpo Fab H002 humanizado (5 $\mu\text{g/ratón}$, paneles inferiores) a diferentes los puntos de tiempo indicados después de la lesión del vaso inducida por FeCl_3 . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Las Figuras **12A a 12C** muestran que los anticuerpos Fabs H001 y H002 humanizados inhiben la formación de trombos en un modelo *in vivo* de trombosis de la arteriola cremáster inducida por láser. (**Figura 12A**) Histograma que muestra la intensidad de fluorescencia media de las plaquetas (MFI; la parte sombreada muestra la SD) en función

del tiempo tras la lesión por láser cuando los animales recibieron un tratamiento de control (arriba) o el anticuerpo H001 (abajo, dosis de 5 μ g). (**Fig. 12B**) Histograma que muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las plaquetas en función del tiempo tras la lesión por láser cuando los animales recibieron un tratamiento de control (arriba) o el anticuerpo H002 (abajo, dosis de 5 μ g). (**Figura 12C**) Histograma que muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las plaquetas en función del tiempo tras la lesión por láser. Los animales recibieron un tratamiento de control (arriba) o el anticuerpo H002 (abajo, dosis de 10 μ g) 24 horas antes de la lesión.

Las **Figuras 13A a 13C** muestran que aunque el Fab H001 humanizado inyectado es capaz de unirse a plaquetas *in vivo*, no provocó un aumento en la expresión de P-selectina o fosfatidilserina (PS). Los resultados se muestran como resultados de citometría de flujo para (**Fig. 13A**) plaquetas (**Fig. 13B**) P-selectina y (**Fig. 13C**) fosfatidilserina.

Las **Figuras 14A y 14B** muestran que los anticuerpos Fabs H001 y H002 humanizados previnieron o prolongaron la oclusión del vaso en un modelo de trombosis de la arteria carótida inducida por FeCl₃ *in vivo*. (**Figura 14A**) Fotografías representativas que muestran el flujo carotídeo de ratones (ml/min) cuando los animales recibieron un tratamiento de control (panel superior), o el tratamiento con anticuerpos Fab H001 (panel central, dosis de 10 μ g), o el anticuerpo Fab H002 (panel inferior, dosis de 10 μ g) tratamiento 5 minutos antes de la lesión. Las flechas indicaron el tiempo de oclusión del vaso. (**Fig. 14B**) Histograma que muestra el tiempo hasta la oclusión del vaso (en minutos) en función del anticuerpo o de las dosis utilizadas. * P<0.05, # P<0.05, ** P<0.01.

Las Figuras **15A a 15C** muestran que los Fabs H001 y H002 humanizados redujeron drásticamente el tamaño del infarto del cerebro isquémico sin aumentar el riesgo de hemorragia intracerebral en un modelo de ratón con lesión por isquemia cerebral y reperusión (modelo de oclusión de la arteria cerebral media transitoria (tMCAO)). (**Fig. 15A**) Histograma que muestra el área de infarto cerebral isquémico en función del anticuerpo o las dosis utilizadas inmediatamente después de la inducción de tMCAO. (**Fig. 15B**) Histograma que muestra el área de infarto cerebral isquémico en función del tratamiento con Fab H002 humanizado (dosis de 100 μ g) después de 1 hora de tMCAO. (**Fig. 15C**) Fotografías representativas de múltiples secciones coronales de cerebro de 2 mm de espesor cortadas de un cerebro completo 24 horas después de la inducción de

tMCAO en un grupo simulado (sin insertar filamento), o en un grupo de control tratado con un control de PBS (200 μ L), o en los grupos de tratamiento tratados con el anticuerpo Fab H001 humanizado (100 μ g/ratón), o el anticuerpo H002 (100 μ g/ratón y 50 μ g/ratón), respectivamente, inmediatamente después de tMCAO. El área de color blanco indica el cerebro del infarto. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Las Figuras **16A a 16B** muestran que el tratamiento profiláctico de ratones ADAMTS13^{-/-} con el Fab H001 humanizado o el C100-scFv humanizado fusionado con albúmina humana (C100-scFv-HSA) inhibe efectivamente la trombosis microvascular mediada por VWF provocada por ionóforo en un modelo de ratón. de TTP. (**Fig. 16A**) Fotografías representativas que muestran la acumulación de trombos plaquetarios en ratones ADAMTS13^{-/-} con y sin tratamiento con H001 o C100-scFv-HSA. A los ratones ADAMTS13^{-/-} se les inyectaron plaquetas etiquetadas con fluorescencia de ratones del mismo genotipo, y luego se expusieron sus vasos mesentéricos y se trataron con ionóforo de calcio para inducir la secreción de VWF. La acumulación de plaquetas en los vasos se controló microscópicamente. Imágenes secuenciales tomadas en los tiempos indicados tras la aplicación de ionóforo de calcio a ratones ADAMTS13^{-/-} (control) o con el tratamiento profiláctico de H001 o C100-scFv-HSA. (Fig. 16B) Histograma que muestra el número de émbolos (trombos plaquetarios mayores de 20 μ m de diámetro) en trombosis microvascular mediada por ULVWF provocada por ionóforo en un modelo de ratón de TTP. (**Fig. 16C**) Histograma que muestra el tiempo para restablecer el flujo sanguíneo normal en función del anticuerpo o las dosis utilizadas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

La **Figura 17** muestra que los anticuerpos Fabs H001 y H002 humanizados no indujeron trombocitopenia. Los resultados se muestran como cambios en los conteos de plaquetas (en%) en función del tiempo (horas) y el tratamiento con anticuerpos: IVIG (o), NIT-B1 (◆), H001 (△) o H002 (▼).

La **Figura 18** muestra que los anticuerpos Fabs H001 y H002 humanizados no prolongaron el tiempo de sangrado mientras que el NIT-B murino aumentó notablemente el tiempo de sangrado. Los resultados se muestran como el tiempo de sangrado (en minutos) en función del tratamiento y la dosis (como se indica debajo del eje X).

Las **Figuras 19A a 19D** muestran que el C100-scFv humanizado y el C100-scFv humanizado fusionados con albúmina humana (C100-scFv-HSA) se unen a (**Fig. 19A**)

plaquetas de ratón de tipo silvestre pero no a (**Fig. 19B**) GPIb α -/- plaquetas de ratón, así como también se unen a (**Fig. 19C**) plaquetas humanas a la dosis indicada. El "*" que se muestra en las **Figuras 19A y 19C** indica la señal de control.

La **Figura 20** muestra las trazas de agregometría estándar que indican que el C100-scFv humanizado inhibe la agregación plaquetaria inducida por la ristocetina.

La **Figura 21** muestra las trazas de agregometría estándar que indican que el C100-scFv humanizado no indujo la activación de plaquetas en plasma rico en plaquetas.

La **Figura 22** muestra que el C100-scFv-HSA humanizado inhibe la formación de trombos a partir de sangre entera humana en condiciones de alta velocidad de cizallamiento (1200 s⁻¹). Fotografías representativas que muestran la formación de trombos plaquetarios después de la perfusión de sangre total humana heparinizada durante 1, 2 y 3 minutos, que se trataron con un amortiguador PBS de control (paneles superiores) y el C100-scFv-HSA humanizado (10 μ g/mL, paneles inferiores) en condiciones de alto cizallamiento (1200 s⁻¹).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Anticuerpos anti-GPIb α

La Patente Estadounidense Número de Serie 8,323,652 describe que los mAbs NIT murinos (NIT-A1, NIT-B1 y NIT-F1), que se generaron al inmunizar ratones BALB/c deficientes en GPIb α con plaquetas de tipo silvestre, podrían reconocer específicamente tanto el humano y el ratón GPIb α , inhiben etiquetadamente la agregación plaquetaria inducida por ristocetina y la formación de trombos. Sin embargo, como se muestra en los ejemplos siguientes, estos mAb intactos podrían inducir una trombocitopenia grave. Además, por ser de origen murino, son inmunogénicos en humanos.

La presente descripción proporciona anticuerpos específicos contra el polipéptido GPIb α . Los anticuerpos se consideran "específicos" para el polipéptido GPIb α porque su afinidad por el polipéptido GPIb α es mayor que por otros polipéptidos (por ejemplo, otros polipéptidos de la superficie de las plaquetas). Los anticuerpos de la presente descripción pueden reconocer y unirse al polipéptido GPIb α humano (como se describe en Gene ID: 2811), el polipéptido GPIb α de ratón (como se describe en Gene ID: 110331805 así como Gene ID: 110304274), el polipéptido GPIb α de rata (como se describe en Gene ID:

691992), el polipéptido GPIb α de mono (Gene ID: 721584), el polipéptido GPIb α de perro (Gene ID: 403638) y/o el polipéptido GPIb α de conejo (Gene ID: 100349951). En una modalidad, los anticuerpos de la presente descripción pueden reconocer y unirse al polipéptido GPIb α humano (como se describe en Gene ID: 2811), el polipéptido GPIb α de ratón (como se describe en Gene ID: 110331805 así como Gene ID: 110304274), el polipéptido GPIb α de rata (como se describe en Gene ID: 691992), el mono polipéptido GPIb α (Gen ID: 721584), el polipéptido GPIb α de perro (Gen ID: 403638) y/o el polipéptido GPIb α de conejo (Gen ID: 100349951).

En una modalidad, los anticuerpos humanizados de la presente descripción tienen una constante de disociación (K_D) con la GPIb α humana de 10 μ M, 10 nM, 10 pM o inferior. En algunas modalidades, la constante de disociación (K_D) de los anticuerpos humanizados con la GP1b α humana es 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 μ M o inferior. En algunas modalidades, la constante de disociación (K_D) de los anticuerpos humanizados con la GP1b α humana es 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 nM o inferior. En algunas modalidades, la constante de disociación (K_D) de los anticuerpos humanizados con la GP1b α humana es 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 pM o inferior.

Los anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos "humanizados" porque incluyen una región derivada de un anticuerpo o inmunoglobulina humana y una región derivada de un anticuerpo o inmunoglobulina no humana. La acción de humanizar un anticuerpo consiste en sustituir una parte de un anticuerpo no humano por una parte correspondiente de un anticuerpo humano. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado como se usa en el presente documento podría comprender una región variable de origen no humano (como una región derivada de un anticuerpo murino (por ejemplo, de ratón)) capaz de reconocer específicamente GPIb α y una región marco humana derivada de un anticuerpo humano. En otro ejemplo, la inmunoglobulina humanizada puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (o CDR) derivadas de un anticuerpo de origen no humano que se une al polipéptido GPIb α y un marco región (o FR) derivada de una cadena ligera de origen humano, y la cadena pesada comprende una región determinante de complementariedad derivada de un anticuerpo de origen no humano que se une al polipéptido GPIb α y una región marco derivada de una cadena pesada de origen

humano. Una "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a una región de la inmunoglobulina ubicada en las partes variables del polipéptido e involucrada en la unión específica del epítipo. La combinación de CDR constituye el paratopo del anticuerpo.

- 5 La región humana del anticuerpo humanizado puede derivar de un isotipo IgG, IgM, IgA, IgE o IgD. En algunas modalidades, la región humana del anticuerpo humanizado puede derivar de un isotipo IgG, por ejemplo, de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas modalidades específicas, la región humana del anticuerpo humanizado puede derivar de la subclase IgG1. Como se indica a continuación, debido a que los anticuerpos humanizados
10 también son anticuerpos monovalentes, la región humana del anticuerpo humanizado puede incluir una cadena pesada que se deriva de una región CH₁ y/o una región V_H (excluyendo las CDR) y excluir la región CH₂ y/o CH₃. La región humana de los anticuerpos humanizados puede incluir una cadena ligera que se deriva de una región C_L y/o una región V_L (excluyendo las CDR). La región humana de los anticuerpos
15 humanizados incluye una cadena ligera que puede ser del tipo kappa o lambda. En una modalidad específica, la región humana del anticuerpo humanizado incluye una cadena ligera que es de tipo kappa.

Los anticuerpos humanizados de la presente descripción no incluyen (por ejemplo, carecen) de una porción Fc. Por ejemplo, la porción de anticuerpo humanizado es el
20 fragmento F(ab)₂ de la región de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente. El fragmento F(ab)₂ es un dímero de dos entidades moleculares (un fragmento de cadena ligera y un fragmento de cadena pesada), consta de un solo sitio de unión a antígeno y comprende un dominio constante y otro variable de cada cadena pesada y ligera del anticuerpo que están asociados entre sí por enlaces disulfuro. Cada cadena del F(ab)₂
25 incluye tres dominios V_L y tres V_H. La porción de anticuerpo F (ab)₂ puede glicosilarse total o parcialmente, en comparación con el anticuerpo multivalente original del que puede derivar.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos "monovalentes". Como se usa en el contexto de la presente descripción, un anticuerpo
30 "monovalente" contiene un solo sitio de unión a antígeno. La porción de anticuerpo monovalente no tiene más de un dominio ligero variable (V_L) asociado (covalentemente o

no) y no más de un dominio pesado variable correspondiente (V_H). Esto es diferente con los anticuerpos multivalentes de longitud completa que comprenden al menos dos sitios de unión a antígeno y más de un dominio V_H y más de un dominio V_L . La porción de anticuerpo monovalente puede glicosilarse total o parcialmente, en comparación con el anticuerpo multivalente original del que puede derivar. En algunos casos, la porción del anticuerpo monovalente no está glicosilado. La porción de anticuerpo monovalente es capaz de competir por el sitio de unión que reconoce el anticuerpo multivalente correspondiente (por ejemplo, NIT-B1 en algunas modalidades). La porción de anticuerpo monovalente no incluye el fragmento cristizable (fragmento F_c) del anticuerpo multivalente del que se deriva.

En algunos casos, el anticuerpo monovalente es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de uno o más anticuerpos multivalentes. El scFv es una entidad molecular única (una proteína de fusión) que consiste en una sola región de unión a antígeno y que no tiene más de un dominio V_H y no más de uno V_L de un anticuerpo multivalente que están conectados con un conector (por ejemplo, generalmente un péptido corto enlazador). Como tal, el scFv consta de una única región de unión a antígeno y comprende un dominio V_H y otro V_L . El scFv se puede obtener a partir de la selección de una biblioteca sintética de scFv, tal como, por ejemplo, una biblioteca de scFv de presentación en fagos. Los scFv de la presente descripción pueden incluir, por ejemplo, uno o más conectores GGGGS (SEQ ID NO: 92) entre los dominios V_H y V_L . En algunas modalidades, el término carboxi del dominio V_L se puede unir al término amino del dominio V_H . En otra modalidad, el extremo carboxi del dominio V_H se puede unir al extremo amino del dominio V_L . En algunas modalidades, los scFv de la presente descripción pueden incluir un etiqueta de purificación (tal como, por ejemplo, una etiqueta 6 X His) que se puede eliminar una vez que se purifica el scFv. En algunas modalidades adicionales, el scFv se puede asociar (covalentemente) con una proteína portadora para formar una proteína quimérica. En dichas modalidades, la proteína portadora puede estar unida al extremo amino o al extremo carboxi del scFv. En algunas modalidades, el scFv no incluye una etiqueta de purificación o ha sido procesado para eliminar una etiqueta de purificación. En otros casos, el anticuerpo monovalente es el fragmento de la región de unión a antígeno (Fab) de un anticuerpo multivalente (y en algunas modalidades, monoclonal). El

fragmento Fab comprende dos entidades moleculares (un fragmento de cadena ligera y un fragmento de cadena pesada), consta de un solo sitio de unión a antígeno y comprende un dominio constante y otro variable de cada cadena pesada y ligera del anticuerpo que están asociados entre sí por enlaces disulfuro. El Fab incluye un solo dominio V_L y un solo dominio V_H .

En otros casos, el anticuerpo monovalente es un anticuerpo de dominio único o un nanocuerpo. El anticuerpo de dominio único incluye un dominio de anticuerpo variable monomérico único que comprende al menos tres regiones determinantes complementarias (CDR). Los anticuerpos de un solo dominio pueden obtenerse de camélidos (por ejemplo, anticuerpos V_{HH}), de peces (por ejemplo, anticuerpos V_{NAR}) o de presentación en fagos. Los anticuerpos de un solo dominio pueden derivar de una cadena pesada o una cadena ligera. Los anticuerpos de un solo dominio pueden humanizarse.

Los anticuerpos de la presente descripción pueden ser capaces de prevenir la activación y agregación plaquetaria. La expresión "capaz de prevenir la activación y agregación plaquetaria" se refiere a la capacidad de los anticuerpos humanizados de la presente descripción para, en presencia de una plaqueta y un agonista de plaquetas, evitar la activación de la plaqueta y la agregación plaquetaria. La activación de plaquetas se produce principalmente durante el inicio de la hemostasia o la trombosis. Al activarse, las plaquetas cambian de forma y liberan el contenido de sus gránulos. Las plaquetas activadas modulan la expresión de sus proteínas de membrana (por ejemplo, selectina P), lípidos (por ejemplo, fosfatidilserina) y cambios conformacionales de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ de plaquetas que da como resultado la agregación plaquetaria. La activación y agregación plaquetaria se puede medir, por ejemplo, determinando la forma de la plaqueta, el nivel de agregación plaquetaria (utilizando, por ejemplo, un agregómetro), la expresión de proteínas o lípidos de superficie, etc. Las plaquetas se pueden activar con lo siguiente agonistas (activadores), trombina, ADP, colágeno y otros. La ristocetina también puede hacer que el factor von Willebrand se una al receptor plaquetario GPIIb/IIIa. Para determinar si un anticuerpo humanizado previene la activación y agregación plaquetaria, las plaquetas (que pueden obtenerse en forma de plasma rico en plaquetas o plaquetas filtradas en gel, por ejemplo) pueden ponerse en contacto primero con el anticuerpo humanizado y luego con el agonista. Luego, debe determinarse, mediante métodos conocidos en la técnica, si

las plaquetas están activadas/agregadas o no.

Los anticuerpos que previenen la activación y agregación plaquetaria se consideran anticuerpos de la presente descripción.

Además, los anticuerpos humanizados de la presente descripción pueden carecer de la

5 capacidad de inducir la activación de plaquetas. La expresión "carece de la capacidad de inducir la activación de plaquetas" se refiere a una de las propiedades de los anticuerpos humanizados de la presente descripción, a saber, que no activan las plaquetas en ausencia de un agonista plaquetario conocido. Para determinar si un anticuerpo humanizado carece de la capacidad de inducir la activación de plaquetas, las plaquetas
10 (que pueden obtenerse en forma de plasma rico en plaquetas o plaquetas filtradas en gel, por ejemplo) pueden ponerse en contacto con el anticuerpo (en ausencia de un agonista plaquetario conocido) y luego, se debe determinar, mediante métodos conocidos en la técnica, si las plaquetas están activadas o no. Los anticuerpos que no logran inducir la activación de plaquetas se consideran anticuerpos de la presente descripción.

15 Los anticuerpos de la presente descripción pueden carecer de la capacidad de inducir trombocitopenia. La expresión "carecen de la capacidad de inducir trombocitopenia" se refiere a una de las propiedades de los anticuerpos humanizados de la presente descripción, a saber, que no provocan una deficiencia patológica y sustancial en el número total de plaquetas. En humanos, la trombocitopenia que requiere tratamiento de
20 emergencia es un conteo por debajo de 50 000 plaquetas por μL de sangre. Para determinar si un anticuerpo humanizado carece de la capacidad de inducir trombocitopenia, se administra a un sujeto de prueba (por ejemplo, un ratón) y se controla el nivel de plaquetas utilizando técnicas conocidas en la técnica para determinar si el anticuerpo provoca una disminución (y si es así, una disminución sustancial o patológica)
25 en el conteo de plaquetas. Los anticuerpos que no logran inducir trombocitopenia se consideran anticuerpos de la presente descripción.

Los anticuerpos de la presente descripción pueden carecer de la capacidad de prolongar el tiempo de sangrado (a dosis terapéuticas). La expresión "carecen de la capacidad de

30 prolongar el tiempo de sangrado" se refiere a una de las propiedades de los anticuerpos humanizados de la presente descripción, a saber, que no provocan un aumento sustancial y patológico del tiempo que tarda en detener el sangrado. Para determinar si un anticuerpo

humanizado carece de la capacidad de prolongar el tiempo de sangrado, se realiza un corte (de ancho y profundidad estandarizados) en la cola de un sujeto de prueba (un ratón, por ejemplo), el tiempo que tarda en detenerse el sangrado. (por ejemplo, el cese del flujo sanguíneo durante un período de tiempo mínimo) se determina utilizando técnicas conocidas en la técnica (en algunas modalidades, el método Ivy o el método Duke) y se compara con un estándar para determinar si el anticuerpo provoca un aumento (y si de este modo, un aumento sustancial) en el tiempo de sangrado. Los anticuerpos que no logran prolongar el tiempo de sangrado a las dosis indicadas se consideran anticuerpos de la presente descripción.

Los anticuerpos de la presente descripción también pueden ser capaces de antagonizar la actividad biológica del polipéptido GPIIb α . El polipéptido GPIIb α es una glicoproteína de la membrana de la superficie de las plaquetas que sirve como receptor para el factor de von Willebrand (VWF), la trombina y otros ligandos. Al antagonizar su actividad biológica, los anticuerpos de la presente descripción pueden usarse para limitar o prevenir la activación y agregación plaquetaria (especialmente en condiciones de alto cizallamiento).

Los anticuerpos de la presente descripción se pueden derivar de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos que son específicos para un único epítipo en el polipéptido GPIIb α se consideran anticuerpos monoclonales (también denominados mAb).

En algunas modalidades, los anticuerpos monoclonales se producen a partir de un único clon de una célula inmunitaria. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante técnicas conocidas en la técnica, como el uso de cultivos celulares mediante la fusión de una célula de mieloma con una célula de bazo de un sujeto (como un ratón o un ser humano) que ha sido inmunizado con un antígeno que comprende el epítipo de el polipéptido GPIIb α . Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener mediante la

presentación en fagos mediante la selección de una biblioteca de anticuerpos monoclonales utilizando un antígeno que comprende el epítipo del polipéptido GPIIb α . Las técnicas adicionales para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, cultivo de células B individuales, amplificación de células individuales a partir de poblaciones de células B. Los anticuerpos monoclonales de la presente descripción pueden ser de varios orígenes (por ejemplo, de ratón o humanos, por ejemplo) y pueden incluir dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, donde cada cadena

comprende tres CDR. Los anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier isotipo, que incluyen, entre otros, inmunoglobulina A (IgA), IgD, IgE, IgG (que incluyen los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) o IgM. Los anticuerpos monoclonales pueden ser, en una modalidad, del isotipo IgG.

- 5 En una modalidad, los anticuerpos de la presente descripción tienen al menos una región determinante de complementariedad que comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67, variante de la misma o fragmentos de la misma. En el contexto de la presente descripción, y especialmente cuando se hace referencia a la secuencia de aminoácidos de CDR, la expresión "que
10 consiste esencialmente de" indica que la CDR comprende necesariamente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67, pero que se pueden agregar residuos de aminoácidos no esenciales adicionales en el extremo amino o carboxilo de esas secuencias (siempre que estos residuos de aminoácidos no modifiquen sustancialmente la afinidad del anticuerpo por el polipéptido GPIb α o su capacidad para
15 antagonizar la actividad biológica del polipéptido GPIb α).

- En una modalidad, los anticuerpos de la presente descripción tienen al menos dos regiones determinantes complementarias que comprenden o consisten esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67, variante de la misma o fragmentos de la misma. En otra modalidad más, los anticuerpos de la presente
20 descripción tienen al menos tres regiones determinantes complementarias que comprenden o consisten esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67, variante de la misma o fragmentos de la misma. En otra modalidad más, los anticuerpos de la presente descripción tienen al menos cuatro regiones determinantes complementarias que comprenden o consisten esencialmente en la
25 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67, variante de la misma o fragmentos de la misma. En aún otra modalidad, los anticuerpos de la presente descripción tienen al menos cinco regiones determinantes complementarias que comprenden o consisten esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67, variante de la misma o fragmentos de la misma. En aún otra
30 modalidad, los anticuerpos de la presente descripción tienen una región determinante de complementariedad que comprende o consiste esencialmente en la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 y 67, variante de la misma o fragmentos de la misma.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente descripción tienen la región determinante de complementariedad que comprende o que consiste esencialmente de la
5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38 y 39 (que incluye variantes y fragmentos), así como al menos una región determinante de complementariedad que comprende o que consisten esencialmente de la SEQ ID NO: 65, 66 o 67 (que incluye variantes y fragmentos). En algunas modalidades adicionales, los anticuerpos de la presente descripción tienen la región determinante de complementariedad que comprende
10 o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38 y 39 (que incluye variantes y fragmentos), así como al menos dos regiones determinantes complementarias. que comprende o consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 65, 66 o 67 (que incluye variantes y fragmentos). En algunas modalidades adicionales, los anticuerpos de la presente descripción tienen la región determinante de la complementariedad que
15 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65, 66 y 67 (que incluye variantes y fragmentos), así como al menos una región determinante de la complementariedad. que comprende o consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 37, 38 o 39 (que incluye variantes y fragmentos). En algunas modalidades adicionales, los anticuerpos de la presente descripción tienen la región determinante de
20 complementariedad que comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65, 66 y 67 (que incluye variantes y fragmentos), así como al menos dos regiones determinantes complementarias. que comprende o consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 37, 38 o 39 (que incluye variantes y fragmentos).

El anticuerpo de la presente descripción puede incluir una variante funcional de una CDR
25 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67. Una variante de CDR comprende al menos una diferencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la CDR. Como se usa en el presente documento, una variante se refiere a alteraciones en la secuencia de aminoácidos que no afectan negativamente a las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando
30 especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En algunas modalidades, la carga general, la estructura o las propiedades hidrofóbicas-hidrofílicas del anticuerpo pueden

alterarse sin afectar negativamente a la actividad biológica. En consecuencia, la secuencia de aminoácidos de la CDR se puede alterar, por ejemplo, para hacer que el anticuerpo sea más hidrófobo o hidrófilo, sin afectar negativamente a las actividades biológicas del anticuerpo. Las variantes de CDR tienen al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la CDR descritos en este documento. El término "porcentaje de identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, según se determina comparando las secuencias. El nivel de identidad se puede determinar convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos. La identidad se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos, que incluyen, entre otros, los descritos en: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); y Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, NY (1991). Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para dar la mejor coincidencia entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Los alineamientos de secuencias y los cálculos de porcentaje de identidad se pueden realizar utilizando el programa Megalign del conjunto informática bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Se realizaron múltiples alineaciones de las secuencias descritas en este documento utilizando el método de alineación Clustal (Higgins y Sharp (1989) CABIOS. 5:151-153) con los parámetros predeterminados (PENALIZACIÓN DE BRECHA = 10, LONGITUD DE BRECHA PEN ALT Y = 10). Los parámetros predeterminados para las alineaciones por pares utilizando el método Clustal fueron KTUPLB 1, PENALIZACIÓN DE ESPACIO=3, VENTANA=5 y DIAGONALES GUARDADAS=5.

Las variantes de CDR pueden ser (i) una en la que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético, o (ii) uno en donde uno o

más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente. Una "variante" de la CDR puede ser una variante conservadora o una variante alélica.

El anticuerpo de la presente descripción puede incluir un fragmento funcional de una CDR que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67. Un

5 fragmento de una CDR comprende al menos un residuo de aminoácido menos en comparación con a la secuencia de aminoácidos de la CDR. Los fragmentos de CDR comprenden algunos residuos de aminoácidos consecutivos de la CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 65, 66 o 67. Los fragmentos de CDR tienen al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%
10 de identidad con las CDR descritas en el presente documento.

En otra modalidad, los anticuerpos de la presente descripción comprenden una cadena pesada y la cadena pesada comprende al menos una CDR que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, 38 o 39, variantes funcionales de la misma y fragmentos funcionales de la misma. En una modalidad
15 adicional, la cadena pesada comprende al menos dos CDR, cada uno de los cuales comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos distinta de las siguientes: SEQ ID NO: 37, 38 o 39, variantes funcionales de la misma y fragmentos funcionales de la misma. Todavía en una modalidad adicional, la cadena pesada comprende tres CDR, cada una de las cuales comprende o consiste esencialmente en una
20 secuencia de aminoácidos distinta de las siguientes: SEQ ID NO: 37, 38 y 39, variantes funcionales de la misma y fragmentos funcionales de la misma.

En otra modalidad, la cadena pesada incluye una región CH1 de un anticuerpo IgG1 humano y comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, 47, 54 o 61, variantes funcionales de la misma así como fragmentos funcionales de la misma. Como se
25 usa en el contexto de la presente descripción, una variante funcional de una región CH1 de un anticuerpo IgG 1 humano se refiere a alteraciones en la secuencia de aminoácidos que no afectan negativamente las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, la variante funcional de la región CH1 del anticuerpo IgG1 humano tiene al menos 50%,
30 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la región CH1 descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, 47, 54 o 61). Como también se usa en el contexto de la presente descripción, un fragmento funcional de una región CH1 de un anticuerpo IgG1 humano se refiere a que comprende al menos un residuo de aminoácido menos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la región CH1 del anticuerpo IgG1 humano que no no afectar negativamente a las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, el fragmento funcional de la región CH1 del anticuerpo IgG 1 humano tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la región CH1 descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, 47, 54 o 61).

En algunas modalidades, la cadena pesada comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57, variantes funcionales de la misma y fragmentos funcionales de la misma. En el contexto de la presente descripción, y especialmente cuando se refiere a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la expresión "que consiste esencialmente de" indica que la cadena pesada comprende necesariamente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57, pero que se pueden agregar residuos de aminoácidos no esenciales adicionales en el extremo amino o carboxilo de esas secuencias (como siempre que estos residuos de aminoácidos no modifiquen sustancialmente la afinidad del anticuerpo por el polipéptido GPIb α o su capacidad para antagonizar la actividad biológica del polipéptido GPIb α). Como se usa en el contexto de la presente descripción, una variante funcional del anticuerpo de cadena pesada se refiere a alteraciones en la secuencia de aminoácidos que no afectan negativamente las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, la variante funcional de la cadena pesada tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la cadena pesada descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57). Como también se usa en el contexto de la presente descripción, un fragmento funcional de la cadena pesada comprende al menos un residuo de aminoácido menos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que no afecta negativamente a las funciones biológicas del anticuerpo (por

ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, el fragmento funcional de la cadena pesada tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la cadena pesada descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57).

En otra modalidad, el anticuerpo comprende una cadena ligera y la cadena ligera comprende al menos una CDR que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65, 66 o 67, variantes funcionales de la misma y fragmentos funcionales de la misma. En una modalidad adicional, la cadena ligera comprende al menos dos CDR, cada uno de los cuales comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos distinta de las siguientes: SEQ ID NO: 65, 66 o 67, variantes funcionales de la misma y fragmentos funcionales de la misma. En aún otra modalidad, la cadena ligera comprende tres CDR, cada una de las cuales comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos distinta de las siguientes: SEQ ID NO: 65, 66 y 67, variantes funcionales de las mismas y fragmentos funcionales de las mismas.

En otra modalidad, la cadena ligera incluye una región C de cadena kappa de IgG1 humana que puede tener, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68, 75, 82 u 89, la variante de la misma o el fragmento de la misma. Como se usa en el contexto de la presente descripción, una variante funcional de una región C de la cadena kappa de IgG1 humana se refiere a alteraciones en la secuencia de aminoácidos que no afectan negativamente las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, la variante funcional de la región C de la cadena kappa de IgG1 humana tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el kappa IgG1 humano región de la cadena C descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68, 75, 82 u 89). Como también se usa en el contexto de la presente descripción, un fragmento funcional de una región C de la cadena kappa de IgG1 humana se refiere a que comprende al menos un residuo de aminoácido menos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una región C de la cadena kappa de IgG1 humana que no afectar

negativamente a las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, el fragmento funcional de la región C de la cadena kappa de IgG1 humana tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la región CH1 descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68, 75, 82 u 89).

En otra modalidad, la cadena ligera comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64, 71, 78 u 85, variantes funcionales de la misma y fragmentos funcionales de la misma. En el contexto de la presente descripción, y especialmente cuando se refiere a la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera, la expresión "que consiste esencialmente de" indica que la cadena ligera comprende necesariamente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64, 71, 78 o 85, pero que se pueden agregar residuos de aminoácidos no esenciales adicionales en el extremo amino o carboxilo de esas secuencias (siempre que estos residuos de aminoácidos no modifiquen sustancialmente la afinidad del anticuerpo por el polipéptido GPIb α o su capacidad de antagonizar la actividad biológica del polipéptido GPIb α). Como se usa en el contexto de la presente descripción, una variante funcional de un anticuerpo de cadena ligera se refiere a alteraciones en la secuencia de aminoácidos que no afectan negativamente las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, la variante funcional de la cadena ligera tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la cadena ligera descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64, 71, 78 u 85). Como también se usa en el contexto de la presente descripción, un fragmento funcional de una cadena ligera comprende al menos un residuo de aminoácido menos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que no afecta negativamente a las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, el fragmento funcional de la cadena ligera tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la cadena ligera descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64, 71, 78 u 85).

En algunas modalidades, la cadena pesada comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57, variantes funcionales de la misma y fragmentos funcionales de la misma. En el contexto de la presente descripción, y

5 especialmente cuando se refiere a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la expresión "que consiste esencialmente de" indica que la CDR comprende necesariamente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57, pero que se pueden agregar residuos de aminoácidos no esenciales adicionales en el extremo amino o carboxilo de esas secuencias (siempre que estos residuos de aminoácidos no modifiquen

10 sustancialmente la afinidad del anticuerpo por el polipéptido GPIb α o su capacidad para antagonizar la actividad biológica del polipéptido GPIb α). Como se usa en el contexto de la presente descripción, una variante funcional de un anticuerpo de cadena pesada se refiere a alteraciones en la secuencia de aminoácidos que no afectan negativamente las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad

15 hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, la variante funcional de la cadena pesada tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la cadena pesada descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57).

Como también se usa en el contexto de la presente descripción, un fragmento funcional de

20 una cadena pesada comprende al menos un residuo de aminoácido menos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que no afecta negativamente a las funciones biológicas del anticuerpo (por ejemplo, proporcionando especificidad y afinidad hacia el polipéptido GPIb α). En una modalidad, el fragmento funcional de la cadena pesada tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

25 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la cadena pesada descrita en el presente documento (como, por ejemplo, las que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, 43, 50 o 57).

En otra modalidad más, el anticuerpo puede comprender tanto una cadena pesada como una cadena ligera. En tal modalidad, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena

30 pesada de la SEQ ID NO: 36, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, la variante de la misma o el fragmento de la misma.

En otra modalidad, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 36, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En aún otra modalidad, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 36, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En otra modalidad más, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 36, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 78, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En otra modalidad, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 36, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 85, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En aún otra modalidad, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En otra modalidad más, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43, el variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En otra modalidad adicional, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 78, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En una modalidad adicional, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 85, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En una modalidad adicional, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 50, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En una modalidad adicional, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 50, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En otra modalidad más, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 50, su variante o fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 78, su variante o fragmento de la misma. En aún otra modalidad,

el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 50, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 85, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En una modalidad, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64, la variante de la misma o el fragmento de la misma. Todavía en una modalidad, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 71, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En otra modalidad más, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 78, la variante de la misma o el fragmento de la misma. En aún una modalidad adicional, el anticuerpo humanizado puede tener la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57, la variante de la misma o el fragmento de la misma y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 85, la variante de la misma o el fragmento de la misma.

Las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de la presente descripción pueden incluir una secuencia líder que, tras la secreción de la célula, se escinde. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 así como residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N que actúan como secuencia líder. La secuencia líder que se puede incluir en la cadena pesada y/o ligera incluye, entre otras, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91.

En alguna modalidad, los anticuerpos de la presente descripción pueden modificarse o diseñarse adicionalmente en una proteína quimérica (que comprende una proteína portadora) para aumentar, entre otras cosas, su vida media en circulación. La porción de anticuerpo humanizado se puede asociar (directa o indirectamente con el enlazador, como, por ejemplo, uno o más enlazadores GGGGS (SEQ ID NO: 92)) al portador en cualquier residuo de aminoácido, siempre que la asociación no impida que la porción del anticuerpo humanizado se una a GPIb α e inhiba su actividad biológica. En una modalidad, el enlazador incluye tres copias del enlazador GGGGS (SEQ ID NO: 92). En otra modalidad, el enlazador incluye cuatro copias del enlazador GGGGS (SEQ ID NO: 92). En algunos casos, el enlazador (cuando está presente) o el portador está asociado a uno o más residuos de aminoácidos de la porción del anticuerpo humanizado que no están

involucrados en la unión específica a GPIb α ni en la inhibición de su actividad biológica. En algunos casos, el enlazador o el portador está asociado a un solo residuo de aminoácido de la porción del anticuerpo humanizado. El enlazador o el portador se puede asociar con cualquier resto de aminoácido de la porción de anticuerpo humanizado, incluido el resto de aminoácido situado en el extremo amino de la porción de anticuerpo humanizado o en el extremo carboxilo de la porción de anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, la proteína portadora puede ubicarse corriente arriba (en el extremo amino) o corriente abajo (en el extremo carboxi) de la porción del anticuerpo humanizado. En los casos en los que el enlazador y el portador también son de naturaleza proteínica, la fracción del anticuerpo humanizado se puede asociar a cualquier residuo de aminoácido del enlazador o del portador, incluido el residuo de aminoácido ubicado en el extremo amino del enlazador o del portador, o el residuo de aminoácido ubicado en el extremo carboxilo terminal del enlazador o del portador. En una modalidad, el residuo de aminoácido ubicado en el extremo amino del enlazador o del portador está asociado al residuo de aminoácido ubicado en el extremo carboxilo de la porción del anticuerpo humanizado. En otra modalidad más, cuando el enlazador está presente y es de naturaleza protéica, su extremo amino está asociado al extremo carboxilo del anticuerpo humanizado y su extremo carboxilo está asociado al extremo amino del portador. En una modalidad, la proteína portadora es albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano, por ejemplo). En una modalidad, el vehículo comprende uno o más anticuerpos adicionales o un fragmento de anticuerpo.

En los casos en los que se busca una asociación covalente entre la porción del anticuerpo humanizado y el portador, la asociación entre las dos entidades puede ser un enlace peptídico. Tal modalidad es especialmente útil para proteínas quiméricas en donde al menos dos entidades son proteicas y están destinadas a ser producidas como una proteína de fusión en un organismo (procariota o eucariota) usando una técnica recombinante genética. Alternativamente, la asociación covalente entre las dos porciones puede estar mediada por cualquier otro tipo de enlace covalente químico. En algunos casos, las proteínas quiméricas están diseñadas para que no sean susceptibles de escindirse en las dos porciones en la circulación general (por ejemplo, en el plasma).

Como se indicó anteriormente, la asociación entre las dos entidades (por ejemplo, la

fracción de anticuerpo humanizado y la fracción portadora) puede ser no covalente. Ejemplos de asociaciones no covalentes incluyen, pero no se limitan al sistema biotina-estreptavidina/avidina. En dicho sistema, un etiquetador (biotina) se asocia covalentemente a una entidad/resto mientras que una proteína (estreptavidina o biotina) se asocia covalentemente a la otra entidad/resto. En tal modalidad, la biotina se puede asociar a la porción del anticuerpo humanizado o al vehículo, siempre que la otra entidad en el sistema se asocie con estreptavidina o avidina.

En un sistema adicional de asociación no covalente, la primera entidad está diseñada para asociarse de forma no covalente a la segunda entidad solo tras su administración al destinatario previsto. Esta modalidad es especialmente útil cuando el vehículo es una proteína presente en la sangre del receptor. Por ejemplo, la porción de anticuerpo humanizado puede asociarse (de forma covalente o no covalente) con un segundo anticuerpo, una lectina o un fragmento de la misma (denominado en este documento enlazador derivado de anticuerpo) que es capaz de obligar al portador una vez administrado al destinatario previsto. Por ejemplo, el segundo anticuerpo, la lectina o un fragmento del mismo puede ser específico para cualquier proteína de sangre/plasma presente en el receptor previsto (como, por ejemplo, albúmina sérica, fragmentos de inmunoglobulinas (siempre que estos fragmentos no se unan directamente al receptor Fc activador) o hacer que la proteína quimérica se una simultáneamente a más de un sitio en el receptor Fc activador), alfa-1-glucoproteína ácida, transferrina o lipoproteínas). El segundo anticuerpo, lectina o fragmento del mismo se puede asociar, preferiblemente de forma covalente, con la porción de anticuerpo humanizado en cualquier residuo de aminoácido de la porción de anticuerpo humanizado, pero preferiblemente en el extremo amino o carboxilo de la porción de anticuerpo humanizado. En tal modalidad, el segundo anticuerpo, la lectina o fragmento de la misma es similar a un conector entre la fracción del anticuerpo humanizado y el vehículo. Tras la administración de esta modalidad de la porción de anticuerpo humanizado en el receptor, el vehículo (por ejemplo, una proteína de sangre o plasma) se asocia con el segundo anticuerpo, lectina o fragmento del mismo para formar, in vivo, la proteína quimérica. En una modalidad específica, el segundo anticuerpo es un anticuerpo que reconoce específicamente la albúmina (como, por ejemplo, un anticuerpo que reconoce específicamente la albúmina humana).

La presente descripción también proporciona moléculas de nucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en el presente documento. Las moléculas de nucleótidos se pueden proporcionar en forma aislada y se pueden derivar de una variedad de fuentes que incluyen ADN, ADNc, ADN sintético, ARN sintético, derivados, miméticos o combinaciones de los mismos. Dichas secuencias pueden comprender ADN genómico, que puede o no incluir intrones naturales, regiones génicas, regiones no génicas y regiones reguladoras. Además, dicho ADN genómico se puede obtener en asociación con regiones promotoras o secuencias poli (A). Las secuencias, el ADN genómico o el ADN complementario (ADNc) se pueden obtener de varias formas. El ADN genómico se puede extraer y purificar de células adecuadas por medios bien conocidos en la técnica. Alternativamente, el ARNm puede aislarse de una célula y usarse para producir ADNc mediante transcripción inversa u otros medios. Las moléculas de nucleótidos descritas en el presente documento se usan en ciertas modalidades de los métodos de la presente descripción para la producción de ARN, proteínas o polipéptidos, mediante la incorporación en células, tejidos u organismos huésped. En una modalidad, las moléculas de nucleótidos pueden tener codones optimizados para la expresión en un huésped particular. Las moléculas de nucleótidos pueden incluir, en algunas modalidades, una o más secuencias promotoras y/o una o más secuencias terminadoras. Las moléculas de nucleótidos pueden incluirse en un vector para la expresión en un huésped recombinante. Las moléculas de nucleótidos de la presente descripción pueden incluir, en algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 41, 48, 55, 62, 69, 76, 83 y/o 90. En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la presente descripción incluye la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 41 y 69, 41 y 76, 41 y 83 o 41 y 90. En otra modalidad, la secuencia de nucleótidos de la presente descripción incluye la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 48 y 69, 48 y 76, 48 y 83 o 48 y 90. la secuencia de nucleótidos de la presente descripción incluye la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 55 y 69, 55 y 76, 55 y 83 o 55 y 90. el nucleótido La secuencia de la presente descripción incluye la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 62 y 69, 62 y 76, 62 y 83 o 62 y 90.

Usos terapéuticos de los anticuerpos humanizados

Dado que las interacciones de la GPIIb α de plaquetas y sus ligandos (como el VWF) han

sido reconocidas como actores importantes en la patogenia de diversas enfermedades, los anticuerpos humanizados pueden usarse para prevenir y/o tratar el accidente cerebrovascular isquémico, el infarto agudo de miocardio, la restenosis, la angina de pecho, síndrome coronario agudo, aterotrombosis, inflamación vascular, trombosis venosa, enfermedad vascular periférica, púrpura trombocitopénica trombótica, sepsis y/o metástasis tumoral. El anticuerpo humanizado o la proteína quimérica pueden usarse en un sujeto que tiene plaquetas que son reconocidas específicamente por el anticuerpo humanizado (o la porción de anticuerpo humanizado de la proteína quimérica). Como tal, el anticuerpo humanizado se puede utilizar en un sujeto mamífero, como, por ejemplo, un ser humano, un mono, un ratón, un conejo y/o un perro, etc.

La presente descripción proporciona un método para prevenir o limitar la interacción física entre GPIIb α y su ligando afín. El método comprende poner en contacto el anticuerpo humanizado, la proteína quimérica o la composición farmacéutica descrita en el presente documento con una plaqueta (que expresa en su superficie GPIIb α) en condiciones que permitan la unión del anticuerpo humanizado/fracción de anticuerpo humanizado con GPIIb α . Como se muestra en los Ejemplos a continuación, los anticuerpos humanizados y las proteínas quiméricas de la presente descripción son capaces de unirse a GPIIb α y antagonizar su actividad biológica bajo estrés de cizallamiento alto y bajo. Como tal, el método se puede utilizar para unirse a GPIIb α independientemente del esfuerzo cizallamiento aplicado. El método puede usarse in vitro o in vivo en un sujeto que lo necesite. El método se puede utilizar con velocidades de cizallamiento altas o bajas.

Cuando se busca prevenir la interacción entre GPIIb α y sus ligandos (como el VWF), el anticuerpo humanizado o la proteína quimérica pueden usarse antes del contacto entre GPIIb α y su ligando. Como tal, la plaqueta primero se pone en contacto con el anticuerpo humanizado (que opcionalmente se presenta como una proteína quimérica o una composición farmacéutica) antes de que su ligando se coloque o se encuentre cerca de la plaqueta. En tal modalidad, se entiende que la unión del anticuerpo humanizado de la presente descripción evitará la asociación física de GPIIb α con su ligando y, en última instancia, evitará o limitará la activación y agregación plaquetaria.

Cuando se busca limitar la interacción entre GPIIb α y sus ligandos (como el VWF), el anticuerpo humanizado puede usarse al mismo tiempo o después de que se haya

producido el contacto entre GPIIb α y su ligando. Como tal, la plaqueta se pone en contacto con el anticuerpo humanizado (que opcionalmente se presenta como una proteína quimérica o una composición farmacéutica) simultáneamente o después de que su ligando se coloque o se encuentre cerca de la plaqueta. En dicha modalidad, se entiende que la unión del anticuerpo humanizado de la presente descripción limitará la asociación física de GPIIb α con su ligando y, en algunas modalidades, evitará o limitará la activación y agregación plaquetaria.

El anticuerpo humanizado (opcionalmente en una forma quimérica o en una composición farmacéutica) se puede usar para prevenir, tratar o aliviar los síntomas asociados con la trombosis patológica en un sujeto que lo necesite. Dado que el anticuerpo humanizado de la presente descripción puede prevenir la activación y agregación plaquetaria (al menos en los Ejemplos siguientes), puede usarse para prevenir la trombosis patológica en un sujeto susceptible a la trombosis patológica. Además, dado que el anticuerpo humanizado de la presente descripción no induce trombocitopenia ni prolonga el sangrado, su uso es más seguro (que, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal original del que derivan). Como se usa en el contexto de la presente descripción, el término "trombosis patológica" se refiere a una condición en la que se forma un trombo (un coágulo de sangre) en un vaso sanguíneo y provoca un daño a los tejidos circundantes. La trombosis patológica puede ocurrir en una vena o una arteria. El trombo patológico puede presentarse u observarse en un seno cavernoso, una vena renal, una vena profunda o en un pulmón (embolismo pulmonar). En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o la proteína quimérica se usa para prevenir, tratar o aliviar los síntomas asociados con la trombosis patológica en condiciones de alto estrés. En las proximidades de un vaso ocluido o parcialmente ocluido, la tensión de cizallamiento es alta y la interacción entre GPIIb α y VWF es fundamental para la oclusión del vaso.

En modalidades en donde se justifica prevenir la formación o el crecimiento de un trombo, el anticuerpo humanizado o la proteína quimérica pueden usarse en sujetos con riesgo de formar o desarrollar un trombo. En una modalidad, el método puede incluir determinar si, antes de la administración del anticuerpo, el sujeto corre el riesgo de formar o desarrollar un trombo (con métodos y ensayos conocidos en la técnica). El anticuerpo humanizado se puede usar en sujetos que previamente se ha determinado que tienen riesgo de formar o

desarrollar un trombo. En otra modalidad, el método puede incluir determinar, después de la administración de al menos una dosis del anticuerpo humanizado o la proteína quimérica, si el sujeto tiene al menos un trombo y, en algunas modalidades adicionales, el tamaño del trombo. Tal determinación puede ayudar a determinar si se deben administrar 5 dosis adicionales al sujeto para lograr el efecto terapéutico deseado.

En sujetos que tienen una pluralidad de trombos, se puede usar el anticuerpo humanizado o la proteína quimérica para reducir el tamaño y/o el número de trombos. En una modalidad, el método puede incluir determinar si, antes de la administración del anticuerpo, el sujeto tiene uno o más trombos y, opcionalmente, el tamaño del trombo (con 10 métodos y ensayos conocidos en la técnica). El anticuerpo humanizado se puede usar en un sujeto del que se ha determinado previamente que tiene una pluralidad de trombos y, opcionalmente, el tamaño del trombo. En otra modalidad, el método puede incluir determinar, después de la administración de al menos una dosis del anticuerpo humanizado o de la proteína quimérica, la presencia, número y tamaño del trombo. Tal 15 determinación puede ayudar a determinar si se deben administrar dosis adicionales al sujeto para lograr el efecto terapéutico deseado.

En algunas modalidades, los métodos de la presente descripción incluyen determinar si el sujeto está en riesgo de experimentar o ha experimentado una trombosis patológica. Una determinación positiva de que el sujeto está en riesgo de experimentar o ha 20 experimentado una trombosis patológica es indicativo de que el sujeto se beneficiaría al recibir los anticuerpos humanizados de la presente descripción. Como tal, los métodos de la presente descripción pueden incluir la administración del anticuerpo humanizado o la proteína quimérica a un sujeto que se ha determinado que está en riesgo de experimentar o ha experimentado una trombosis patológica. Los anticuerpos humanizados y la proteína 25 quimérica de la presente descripción se pueden usar en sujetos en los que se ha determinado que corren el riesgo de experimentar o han experimentado una trombosis patológica.

En algunas modalidades adicionales, los métodos de la presente descripción incluyen determinar si el sujeto está en riesgo de experimentar o ha experimentado un accidente 30 cerebrovascular isquémico, una púrpura trombocitopénica trombótica, un infarto de miocardio, un síndrome coronario agudo, aterotrombosis, una enfermedad vascular

periférica, trombosis venosa, sepsis y/o inflamación vascular. Una determinación positiva de que el sujeto está en riesgo de sufrir o ha sufrido un accidente cerebrovascular isquémico, púrpura trombocitopénica trombótica, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, aterotrombosis, enfermedad vascular periférica, trombosis venosa profunda, sepsis y/o inflamación vascular es indicativo de que el sujeto se beneficiaría de recibir los anticuerpos humanizados de la presente descripción. Como tales, los métodos de la presente descripción pueden incluir la administración del anticuerpo humanizado a un sujeto que se ha determinado que corre el riesgo de experimentar o ha experimentado un accidente cerebrovascular isquémico, una púrpura trombocitopénica trombótica, un infarto de miocardio, un síndrome coronario agudo, aterotrombosis, una enfermedad vascular periférica, trombosis venosa profunda, sepsis y/o inflamación vascular. Los anticuerpos humanizados de la presente descripción se pueden usar en sujetos en los que se ha determinado que corren el riesgo de experimentar o han experimentado un accidente cerebrovascular isquémico, una púrpura trombocitopénica trombótica, un infarto de miocardio, un síndrome coronario agudo, aterotrombosis, una enfermedad vascular, trombosis venosa profunda, sepsis y/o inflamación vascular.

Debido a que la interacción entre GPIIb/IIIa y VWF es importante para la diseminación de la metástasis tumoral, el anticuerpo humanizado o la proteína quimérica de la presente descripción pueden usarse para reducir o limitar la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesite. En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o la proteína quimérica pueden usarse para reducir el número de metástasis tumorales y/o el tamaño de las metástasis tumorales. En una modalidad, la metástasis del tumor está asociada con un cáncer de hígado (tal como un carcinoma de hígado o un adenocarcinoma) y el anticuerpo humanizado puede usarse para reducir o limitar la metástasis del tumor de hígado.

En algunas modalidades, los métodos de la presente descripción incluyen determinar la presencia, ubicación y/o el tamaño de la metástasis tumoral antes y/o después de haber proporcionado una o más dosis de los anticuerpos humanizados o de las proteínas quiméricas. Tal evaluación puede ser útil para determinar si se deben administrar dosis adicionales del anticuerpo humanizado para lograr el resultado terapéutico deseado en el sujeto.

El anticuerpo humanizado o la proteína quimérica que lo comprende puede formularse

como una composición farmacéutica para su administración con un excipiente. Un excipiente o "excipiente farmacéutico" es un disolvente farmacéuticamente aceptable, un agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para administrar una o más proteínas quiméricas a un sujeto, y normalmente es líquido. Un excipiente farmacéutico generalmente se selecciona para proporcionar el volumen, la consistencia, etc. deseados, cuando se combina con los componentes de una composición farmacéutica dada, en vista del modo de administración pretendido. Los excipientes farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o fosfato de hidrógeno de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (por ejemplo, almidón, glicolato de almidón sódico, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

El anticuerpo humanizado o la proteína quimérica que lo comprende puede formularse para su administración con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en forma de dosificación unitaria o como una composición farmacéutica. Puede emplearse la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar tales composiciones a sujetos. Aunque se prefiere la administración intravenosa, se puede emplear cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, perenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbitaria, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intratecal, epidural, intracisternal, intraperitoneal, intranasal o en aerosol. administración. Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones líquidas o suspensión. Los métodos bien conocidos en la técnica para preparar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19ª ed.) ed. AR Gennaro AR., 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

Además, en algunas modalidades, el anticuerpo humanizado o la proteína quimérica se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente efectiva. El término "cantidad

farmacéuticamente efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad (dosis) efectiva en el tratamiento de un sujeto aquejado o que se sospecha que aqueja una afección o trastorno trombótico, metastásico o inflamatorio. También debe entenderse en el presente documento que una "cantidad farmacéuticamente efectiva" puede interpretarse como una cantidad que proporciona un efecto terapéutico deseado, ya sea tomada en una dosis o en cualquier dosis o vía, tomada sola o en combinación con otros agentes terapéuticos.

Una cantidad o dosificación terapéuticamente efectiva del anticuerpo humanizado o la proteína quimérica que comprende el mismo descrito en el presente documento o una composición farmacéutica, puede variar entre aproximadamente 0.001 y 30 mg/kg de peso corporal, con otros intervalos de la invención que incluyen entre aproximadamente 0.01 y 25 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0.025 a 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0.3 a 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 a 10 mg/kg de peso corporal, 2 a 9 mg/kg de peso corporal, 3 a 8 mg/kg peso corporal, 4 a 7 mg/kg peso corporal, 5 a 6 mg/kg peso corporal, y 20 a 50 mg/kg de peso corporal. En otras modalidades, una cantidad o dosificación terapéuticamente efectiva puede variar entre aproximadamente 0.001 y 50 mg en total, con otros intervalos de la invención que incluyen aproximadamente 0.01 a 10 mg, aproximadamente 0.3 a 3 mg, aproximadamente 3 a 10 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 a 20 mg, aproximadamente 20-30 mg, aproximadamente 30 a 40 mg y aproximadamente 40 a 50 mg. En una modalidad, la quimera se administra a una dosis entre aproximadamente 40 y 80 mg/kg (por ejemplo, 60 mg/kg).

EJEMPLO I - HUMANIZACIÓN DE ANTICUERPOS NIT-B1 MURINOS

Los dominios variables de los anticuerpos NIT-A1 y NIT-B1 murinos (descritos en Patente Estadounidense Número de Serie 8,323,652 y respectivamente depositados en la Autoridad de depósito internacional de Canadá el 7 de octubre de 2008 con los números de acceso 071008-01 (clon de NIT A1), 071008- 02 (clon NIT B1)). El anticuerpo NIT-A1 murino tiene una cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 (que incluye CDR1 de la SEQ ID NO: 3, CDR2 de la SEQ ID NO: 4 y CDR3 de la SEQ ID NO: 5) y una cadena ligera de la SEQ ID NO: : 11 (que incluye CDR1 de la SEQ ID NO: 13, CDR2 de la SEQ ID NO: 14 y

CDR3 de la SEQ ID NO: 15). El anticuerpo NIT-B1 murino tiene una cadena pesada de la SEQ ID NO: 6 (que incluye CDR1 de la SEQ ID NO: 8, CDR2 de la SEQ ID NO: 9 y CDR3 de la SEQ ID NO: 10) y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 (que incluye CDR1 de la SEQ ID NO: 18, CDR2 de la SEQ ID NO: 19 y CDR3 de la SEQ ID NO: 20).

- 5 El anticuerpo NIT-B1 murino se desarrolló aún más como un C100-Fab quimérico fusionando el dominio variable de cadena pesada de NIT-B1 (SEQ ID NO: 6) con una región constante CH1 de IgG1 humana (SEQ ID NO: 26; <https://www.uniprot.org/uniprot/P01857>); así como fusionando el dominio variable de cadena ligera de NIT-B1 (SEQ ID NO: 16) con una región constante de cadena ligera kappa de Ig humana (SEQ ID NO: 33; <http://www.uniprot.org/uniprot/P01834>).

EJEMPLO II - CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GPIBALFA HUMANIZADOS

Usando el método de injerto de CDR (Safdari et al., 2013), cuatro cadenas pesadas humanas (VH1 de la SEQ ID NO: 35, VH2 de la SEQ ID NO: 42, VH3 de la SEQ ID NO: 49, VH4 de la SEQ ID NO: 56) y cuatro cadenas ligeras humanas (VL1 de la SEQ ID NO: 63, VL2 de la SEQ ID NO: 70, VL3 de la SEQ ID NO: 77, VL4 de la SEQ ID NO: 84) se sintetizaron en base a la homología de los marcos de trabajo con las secuencias humanas en la base de datos del NCBI con los CDR anotados.

Brevemente, las secuencias de dominio variable del anticuerpo parental se buscaron en la base de datos de línea germinal humana usando NCBI Ig-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>). Se eligieron cuatro aceptores humanos diversos (es decir, dominios variables humanos con alta homología con el anticuerpo original) para cada cadena pesada y cadena ligera. Las CDR de los aceptores humanos se reemplazaron con sus contrapartes de ratón, dando como resultado las secuencias de dominio variable humanizadas.

Fragmento variable de cadena sencilla humanizado (scFv) y proteína quimérica asociada. Se preparó un scFv que incluía tanto VH1 como VL2. Que incluye un enlazador (GGGGS (SEQ ID NO: 92)) x 4 entre VH1 y VL2 (orientación como VH1-(G₄S)4-VL2). Para facilitar la purificación, el scFv tiene una etiqueta de 6 x His y un sitio de escisión de TEV ENLYFQG antes de VH1. Sin embargo, la etiqueta se eliminó usando la proteasa TEV antes de las diferentes pruebas. El scFv también se incluyó en una proteína quimérica

(scFv-HSA) con la albúmina de suero humano (HSA). En esos casos, el scFv-HSA que incluye un enlazador adicional GGGGS (SEQ ID NO: 92) antes que HSA. El scFv-HSA quimérico se produjo en forma estable y no formó agregados durante su producción o purificación.

- 5 *Tamaño.* Las secuencias de ADN que codifican cadenas pesadas y ligeras humanizadas se sintetizaron y se insertaron en el vector pTT5 para construir plásmidos de expresión de Fabs. Se expresaron transitoriamente 16 Fab humanizados en cultivo de células HEK 293 o CHO 3E7, y luego las células se centrifugaron. Los sobrenadantes se filtraron y evaluaron con SDS-PAGE y análisis de transferencia Western. Los Fab humanizados
10 tienen un peso molecular de aproximadamente 47 kDa en condiciones no reductoras (Figuras 1 y 2).

Los sobrenadantes de ocho Fab humanizados seleccionados (consulte la tabla 1) se purificaron luego con la resina Capture select™ Kappa XL Affinity Matrix. Los Fab humanizados purificados se intercambiaron con amortiguador en PBS utilizando una
15 columna de desalinización PD-10. La concentración y la pureza de la proteína purificada se determinaron mediante OD₂₈₀ y SDS-PAGE (en cada carril se cargaron aproximadamente 2 µg de proteína), respectivamente. Como se muestra en la Figura 3, los Fab humanizados purificados migraron como bandas de ~47 kDa en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, bandas de ~24 kDa y ~23 kDa en condiciones reductoras.

20 Tabla 1. Descripción de los Fab humanizados

Nombre	Cadena pesada	Cadena ligera
H001	VH1 (SEQ ID NO: 35)	VL2 (SEQ ID NO: 70)
H002	VH1 (SEQ ID NO: 35)	VL3 (SEQ ID NO: 77)
H003	VH2 (SEQ ID NO: 42)	VL1 (SEQ ID NO: 63)
H004	VH3 (SEQ ID NO: 49)	VL2 (SEQ ID NO: 70)
H005	VH3 (SEQ ID NO: 49)	VL3 (SEQ ID NO: 77)
H006	VH4 (SEQ ID NO: 56)	VL1 (SEQ ID NO: 63)
H007	VH4 (SEQ ID NO: 56)	VL2 (SEQ ID NO: 70)
H008	VH4 (SEQ ID NO: 56)	VL3 (SEQ ID NO: 77)

25 *Especificidad.* Se preparó plasma rico en plaquetas (PRP) humano y de ratón mediante centrifugación a 300 g durante 7 min y se lavó transfiriendo 200 µl de PRP a 10 ml de PBS seguido de centrifugación de 800 g durante 10 min. A continuación, se eliminó el
30 sobrenadante y las plaquetas se volvieron a suspender en 200 µl de PBS. Las plaquetas lavadas (10 µL) se incubaron con los diferentes anticuerpos (2.5-5 µg/ml) en un sistema de

200 μ L a temperatura ambiente durante 30 min y se detectaron mediante anticuerpo anti-Fab humano etiquetado con FITC. Estos ocho Fabs H001-H008 humanizados seleccionados, el scFv y la proteína quimérica se unieron a plaquetas de ratón tanto humanas como de tipo silvestre, pero no a plaquetas de ratón deficientes en GPIb α , lo que indica la especificidad de los Fab humanizados para GPIb α de plaquetas (Figuras 4 y 19).

Plaquetas (2×10^5) de PRP de ratón, perro, humano, rata y conejo a 200 μ L PBS que contiene una concentración en serie de Fabs H001 o H002 a 50, 16.7, 5.6, 1.8, 0.6, 0.2 nM (para ratón y perro), a 200, 67, 22, 7.4, 2.5, 0.8, 0.3, 0.1 nM (para humanos y ratas) y a 500, 100, 20, 4, 0.8 nM (para conejos). Después de una incubación de 30 min, se añadió un anticuerpo de detección (cadena Kappa antihumana etiquetada con FITC, 1:200) y se incubó en la oscuridad durante 15 min. La citometría de flujo se realizó utilizando el BD LSR Fortessa™ X-20. H001 y H002 también se unieron a plaquetas de rata, perro y conejo (Figura 5).

Los Fab humanizados con (H001/H002 purificado, 5 μ g/mL) y sin (H001/H002 no purificado, 5 μ g/mL) la segunda purificación por cromatografía SEC-FPLC se incubaron con plaquetas lavadas de mono Cynomolgus (2×10^6) durante 30 minutos. A continuación, se incubó durante 30 minutos un anticuerpo secundario (Ab) anti-cadena Kappa humana etiquetado con FITC. La unión de Fab humanizados a plaquetas de mono se detectó mediante un ensayo de citometría de flujo. La Figura 6 muestra que los anticuerpos Fab H001 y H002 se unieron a plaquetas de mono.

La afinidad entre H001 y GPIb α recombinante se midió en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR). Para la preparación de biosensores SPR, se limpiaron biosensores recubiertos de oro puro SPR (Biosensing Instrument Inc., AZ, USA) en una solución de borohidruro de sodio 0.5 M disuelto en etanol anhidro:ddH₂O 1:1 durante 2 horas. Los biosensores se enjuagaron con abundantes cantidades de etanol anhidro seguido de 16 horas de incubación en una solución de ácido mercaptopropiónico 1 mM en dimetilformamida. Después de la incubación, los biosensores SPR se enjuagaron con grandes cantidades de dimetilformamida seguido de etanol anhidro y finalmente ddH₂O. Luego, los biosensores se incubaron en 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 40 mM y N-hidroxisuccinimida 20 mM disueltos en ddH₂O durante 1 hora. A continuación, los sensores se enjuagaron con abundantes cantidades de ddH₂O y luego se incubaron con

hidrato de Na, Na -Bis(carboximetil)-L-lisina 100 mM durante 4 horas. Después de la incubación, las superficies biosensoras se enjuagaron con ddH₂O. El paso final antes de SPR experimentos fue exponer las superficies biosensoras funcionalizadas con NiCl_2 100 mM durante 1 hora.

- 5 Los experimentos SPR se realizaron en un Biosensing Instrument 4000 SPR. Los biosensores funcionalizados se cargaron en el instrumento y el biosensor se equilibró con amortiguador de funcionamiento (tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, NaCl 140 mM, imidazol 20 mM pH = 7.4) a un flujo de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para las mediciones de unión, se inyectaron 25 μL de GPIIb α etiquetada con hexahistidina 500 nM sobre la superficie de
- 10 biodetección, inmovilizando la GPIIb α en la superficie del sensor SPR. Se permitió que la línea de base se equilibrara seguido de una inyección de 25 μL de la concentración deseada de ligando (ya sea Fab H001 o control). Las superficies biosensoras se regeneraron entre inyecciones de ligando mediante inyección de 100 μL de imidazol 500 mM en amortiguador de funcionamiento, seguido de 100 μL de NiCl_2 100 mM. Los datos
- 15 resultantes se analizaron utilizando el software de análisis SPR incluido en el instrumento. Los biosensores SPR inmovilizados con GPIIb α se expusieron a 500, 100, 50 y 10 nM de anticuerpo Fab H001 y 100 nM de anticuerpo de control (PSI E1, un anticuerpo contra GPIIbIIIa). El control no se unió a la GPIIb α inmovilizada y se disoció completamente del biosensor antes del final de la inyección (datos no mostrados). En contraste, el anticuerpo
- 20 Fab H001 se unió claramente a GPIIb α produciendo claros cambios de SPR con solo una disociación parcial después del final de la inyección (Fig. 7A). Los cambios de SPR se ajustaron al modelo de enlace cinético, lo que resultó en una velocidad de activación (k_a) de $2.61 \times 10^7 \text{s}^{-1}$, una velocidad de desactivación (k_d) = $1.1 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ y una constante de disociación (K_d) de 4.4 nM (Figura 7B). Para confirmar la constante de disociación, la
- 25 magnitud de los cambios de SPR se representó contra a la concentración de anticuerpo Fab H001 y se ajustó a un modelo de unión de un sitio que produjo un R^2 de ajuste de 0.9929 y una constante de disociación (K_d) de 8.0 ± 2.1 nM. Los datos demuestran claramente que el anticuerpo Fab H001 se unió fuertemente a GPIIb α recombinante con una constante de disociación nanomolar baja y una velocidad de unión rápida.
- 30 *Inhibición in vitro de la agregación plaquetaria inducida por agonistas.* Para evaluar si los Fab humanizados pueden inducir una activación de plaquetas aberrante y sus funciones

en la agregación plaquetaria, se realizaron ensayos de agregación plaquetaria *in vitro*. Se preparó PRP humano de voluntarios sanos y pacientes con enfermedad vascular periférica a partir de sangre entera anticoagulada con citrato de sodio mediante centrifugación a 300 g durante 7 min. La agregación plaquetaria en PRP se indujo mediante la adición de 5 $\mu\text{g/mL}$ de clones Fab humanizados y se controló mediante un agregómetro computarizado Chrono-log (Chrono-Log Corporation, USA). La agregación plaquetaria en PRP fue inducida por ristocetina (1 mg/mL), y en plaquetas filtradas en gel fue inducida por trombina (0.05 U/mL) con o sin los Fab humanizados usando un agregómetro Chrono-log computarizado (Chrono-Log Corporation, USA).

Los anticuerpos Fab H001, H002, H005 y H008 así como el anticuerpo scFv no indujeron la activación de plaquetas. Además, H001 y H002 inhiben significativamente la agregación plaquetaria humana inducida por ristocetina en PRP y la agregación plaquetaria inducida por trombina en dosis bajas en plaquetas filtradas en gel (Figuras 8, 9, 20 y 21).

Inhibición de la formación de trombos a baja y alta velocidad de cizallamiento. Para medir

la adhesión, la agregación y la formación de trombos plaquetarios a diferentes velocidades de cizallamiento, se perfundió sangre completa heparinizada de 30 voluntarios sanos sobre una superficie recubierta de colágeno tipo I usando un sistema de cámara de perfusión ex vivo, bajo un microscopio de fluorescencia en tiempo real. Brevemente, se recubrieron tubos microcapilares rectangulares (portaobjetos de canal ibidi, ibidi GmbH) con colágeno Horm (100 $\mu\text{g/mL}$, durante la noche, 4 °C; Nycomed Linz, Austria). Sangre completa anticoagulada (heparina 15 U/mL) de donantes sanos se marcó con fluorescencia con DiOC₆ (1 μM , 10 min, 37 °C; Sigma). Luego, se perfundió sangre total tratada con Fabs humanizados o de control o scFv-HSA sobre la superficie recubierta de colágeno a velocidades de cizallamiento de 300 s^{-1} , 1 200 s^{-1} y 1 800 s^{-1} durante 3 min usando una bomba de jeringa (Harvard Apparatus, USA). La acumulación de plaquetas y la formación de trombos se registraron en tiempo real con un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert 135 (objetivo de agua 60x/0.90 NA). La dinámica cuantitativa de la intensidad de la fluorescencia de plaquetas se adquirió utilizando el software SlideBook.

Los Fabs H001 y H002 humanizados inhiben etiquetadamente la formación de trombos a velocidades de cizallamiento de la pared de 300 s^{-1} y 1 800 s^{-1} (aunque preferiblemente a velocidades de cizallamiento de la pared de 1 800 s^{-1}), lo que corresponde al flujo

sanguíneo en las vénulas/arterias grandes y arteriolas, respectivamente (Figura 10). La proteína quimérica inhibe notablemente la formación de trombos a velocidades de cizallamiento de la pared de 1200 s^{-1} (Figura 22). Estos resultados *ex vivo* sugieren que las proteínas quiméricas, scFv y C100-Fab humanizadas son inhibidores significativos de la trombosis en condiciones de cizallamiento alto y bajo.

Inhibición in vivo del crecimiento de trombos y oclusión de vasos. Para examinar si los Fab humanizados afectan el crecimiento del trombo *in vivo*, se utilizaron dos modelos complementarios de trombosis de microscopía intravital y un modelo de trombosis de arteria grande.

La formación de trombos en las arteriolas mesentéricas se controló en ratones de tipo silvestre C57BL/6 de 3 a 4 semanas de edad. A los ratones se les inyectaron plaquetas etiquetadas con fluorescencia emparejadas con el donante y se visualizaron bajo un microscopio fluorescente invertido Zeiss Axiovert 135 (Zeiss, Alemania). Brevemente, se recogió sangre en una solución de dextrosa de citrato ácido (ACD; como anticoagulante) de los ratones compatibles con donantes. Se prepararon plaquetas filtradas con gel y se marcaron con calceína AM (1 mg/mL, Invitrogen, Canadá) a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación, se inyectaron plaquetas en los ratones experimentales a través de la vena de la cola con amortiguador de solución salina de control, con Fab H001 o con H002 (2.5 o 5 μg /ratón). Luego, los ratones fueron anestesiados y el mesenterio fue externalizado. Se eligió una única arteriola mesentérica de 100-120 μm de diámetro y se indujo la lesión mediante la aplicación tópica de 30 μl de cloruro férrico 250 mM. Se registró el tiempo para completar la oclusión del vaso. Las imágenes de formación y disolución de trombos se visualizaron con un microscopio de fluorescencia. Como se muestra en la figura 11 y la tabla 2, el crecimiento de trombos y la oclusión de vasos inducidos por la lesión de FeCl_3 se inhiben significativamente mediante la inyección de los anticuerpos Fabs H001 y H002 humanizados (en comparación con una inyección de solución salina de control).

Tabla 2. Número de ratones que no ocluyeron en función del tratamiento recibido.

Control	0
H002 – 5 μg	1 in 4
H001 – 5 μg	3 in 4
H001 – 2.5 μg	0

Para el modelo de trombosis de la arteriola cremáster inducida por láser, se anestesiaron ratones C57B/6 de tipo silvestre (macho, de 6 a 8 semanas de edad) y se les insertó un tubo traqueal para facilitar la respiración. El músculo cremáster se preparó bajo un microscopio de disección y se super fundió durante todo el experimento con solución salina tamponada con bicarbonato precalentada. Se administraron anticuerpos anti-plaquetarios, control (amortiguador salino), los anticuerpos H001 y H002 humanizados y monovalentes (5 o 10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) donde se indicaba mediante una cánula en la vena yugular. Las plaquetas se marcaron mediante inyección de anticuerpo anti-ratón CD41 de rata (Leo.A1; EMFRET Analytics, Alemania; 0,1 $\mu\text{g}/\text{g}$). Se indujeron múltiples lesiones corriente arriba independientes en una arteriola cremáster utilizando un microscopio Olympus BX51WI con un láser de colorante de nitrógeno pulsado. La acumulación dinámica de plaquetas etiquetadas con fluorescencia dentro del trombo en crecimiento se capturó y analizó utilizando el software Slidebook. En este modelo de trombosis microscópica intravital de la arteriola cremáster (que no implica estrés oxidativo, ya que induce una lesión vascular leve con un láser), el crecimiento del trombo se eliminó casi por completo después de la infusión intravenosa de los anticuerpos humanizados y monovalentes H001 y H002 (Figura 12). Estos hallazgos indican que los Fab humanizados pueden inhibir el crecimiento de trombos y promover su disolución y, de este modo, tienen un gran potencial para desarrollarse como nuevos agentes antitrombóticos.

Se extrajo sangre de ratón antes y después de los experimentos del modelo de trombosis de microscopía intravital y las plaquetas se aislaron y caracterizaron usando citometría de flujo y anticuerpo anti-CD62P humano de ratón etiquetado con FITC y anexina V-Alexa Fluor® 647. En la Figura 13 se muestra que el anticuerpo H001 humanizado y monovalente no indujo la activación aberrante de las plaquetas in vivo, ya que no dio lugar a la expresión de la P-selectina de plaquetas ni a la exposición a la fosfatidilserina (PS). Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo Fab H002 humanizado (datos no mostrados).

En un modelo de trombosis de la arteria carótida grande inducida por cloruro férrico, se anestesiaron ratones C57BL/6J de tipo silvestre (ambos sexos, >8 semanas de edad, 25-30 g) y se les inyectó por vía intravenosa el anticuerpo Fab H001 o H002 (5, 10 o 20

µg/ratón) o un volumen igual (200 µL) de PBS 5 minutos antes de inducir la lesión arterial. La arteria carótida común izquierda se disecó y se mantuvo con una sonda de flujo Doppler en miniatura (medidor de flujo perivascular de tiempo de tránsito TS420, Transonic Systems Inc., USA). Se midió el índice de flujo sanguíneo de referencia durante 30 segundos. A continuación, se indujo la lesión de la arteria carótida con una tira de papel de filtro Whatman saturado con cloruro férrico al 7.5% durante 3 minutos. Se controló el flujo sanguíneo hasta que se observó la oclusión completa del vaso. Los anticuerpos Fabs H001 y H002 redujeron significativamente el crecimiento de trombos y evitaron la oclusión estable de los vasos (Figura 14).

Disminución in vivo del tamaño del infarto del cerebro isquémico sin aumentar el riesgo de hemorragia intracerebral. Para investigar el potencial terapéutico de los anticuerpos en el accidente cerebrovascular isquémico, se llevó a cabo un modelo de lesión cerebral por isquemia y reperfusión (oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO)). Se anestesiaron ratones macho (25 g) con isofluorano inhalado. Se hizo una incisión en la línea media del cuello y se separaron los tejidos blandos. La arteria carótida común izquierda (LCCA) se diseccionó cuidadosamente para liberarla de los nervios circundantes (sin dañar el nervio vago) y se hizo una ligadura usando una cuerda 5.0. Luego se separó la arteria carótida externa izquierda (LECA) y se hizo un segundo nudo. A continuación, se aisló la arteria carótida interna izquierda (LICA) y se preparó un nudo con un filamento 6.0. Después de obtener una buena vista de la arteria carótida interna izquierda (LICA) y la arteria pterigopalatina izquierda (LPA), ambas arterias se cortaron usando un clip microvascular. Se cortó un pequeño orificio en el LCCA antes de que se bifurcara en LECA y LICA. Se introdujo en el LICA un monofilamento de nailon 6.0 recubierto de caucho de silicona estandarizado (6021; Doccol Corp, Redlands, CA) hasta que se detuvo en el clip. Las arterias cortadas se abrieron mientras se insertaba el filamento en el LICA para ocluir el origen del LMCA en el polígono de Willis. El tercer nudo del LICA se cerró para fijar el filamento en su posición. Después de 1 hora, se abrió el tercer nudo y se retiró el filamento. Los anticuerpos se administraron por vía intravenosa inmediatamente después de insertar el filamento; o después de 1 hora cuando se retiró el filamento.

Para medir los volúmenes de infarto cerebral, los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la inducción de tMCAO. Múltiples secciones coronales de cerebro de 2 mm de

espesor cortadas de todo el cerebro se tiñeron con cloruro de 2.3.5-trifenil-tetrazolio al 2% (TTC, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) para visualizar infartos cerebrales. Se evaluó macroscópicamente la presencia de hemorragias cerebrales. Para medir la función neurológica veinticuatro horas después de la inducción de tMCAO, los ratones se sometieron a la prueba de Bederson modificada y la prueba de agarre para evaluar la función neurológica y motora global respectivamente. Los resultados mostraron que el bloqueo de GPIIb/IIIa por los anticuerpos Fabs H001 y H002 humanizados y scFv-HSA redujo significativamente el tamaño del infarto en el cerebro y mejoró el resultado funcional después de tMCAO sin aumentar el riesgo de hemorragia intracerebral (Figura 15).

Protección in vivo de TTP. Para probar el efecto terapéutico de los anticuerpos en la TTP, se utilizó un modelo de trombosis microvascular mediada por VWF ultragrande (ULVWF) provocado por ionóforos. Los ratones ADAMTS13^{-/-} se anestesiaron y se inyectaron por vía intravenosa con plaquetas etiquetadas con fluorescencia purificadas de los ratones donantes del mismo genotipo, y la trombosis microvascular provocada por ionóforos en las vénulas mesentéricas se controló en tiempo real bajo microscopía intravital. Para la preparación de plaquetas, los ratones (de 6 a 8 semanas de edad) se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina (100 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente) y se extrajo sangre completa del plexo retroorbitario con tubos capilares de vidrio recubiertos de heparina. La sangre se recogió en un tubo que contiene solución de citrato-dextrosa (38 mmol/l de ácido cítrico, 75 mmol/l de citrato trisódico, 100 mmol/l de dextrosa). El plasma rico en plaquetas se obtuvo mediante centrifugación de sangre total a 300 g durante 7 minutos. A continuación, las plaquetas filtradas con gel se aislaron del plasma rico en plaquetas utilizando una columna de sefarosa 2B en amortiguador PIPES (PIPES 5 mmol/l, NaCl 1.37 mmol/l, KCl 4 mmol/l y glucosa al 0.1%, pH 7.0). Los conteos de plaquetas se confirmaron utilizando un Hemovet (HV950, Drew Scientific). El etiquetado fluorescente de las plaquetas filtradas en gel se logró incubando las plaquetas con éster acetoximetílico de calceína (1 µg/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La eficacia del etiquetado fluorescente de las plaquetas se confirmó con un microscopio de fluorescencia antes de utilizarlo para la obtención de imágenes in vivo.

Para obtener imágenes de microscopía intravital, se anestesiaron ratones de 4 semanas

de edad y se les inyectaron plaquetas etiquetadas con fluorescencia (1.25×10^6 plaquetas/g de ratones del mismo genotipo). Los vasos mesentéricos se prepararon quirúrgicamente y se monitorearon bajo un microscopio fluorescente invertido (Zeiss Axio Observer Z1 Advanced Marianas Microscope) usando una lente objetivo de aceite de 25 X (Zeiss). Una sección de 2.5 mm de la vénula mesentérica (100 a 150 $\mu\text{mol/L}$ de diámetro) se trató tópicamente con 10 μL de 10 $\mu\text{mol/L}$ de ionóforo de calcio para inducir la secreción de ULVWF del cuerpo de Weibel-Palade del endotelio, lo que resultó en adhesión de plaquetas etiquetadas con fluorescencia y formación de trombos plaquetarios anclados a la pared del vaso. Para cada ratón, el proceso de trombosis y la resolución de los trombos se controlaron y registraron durante 20 minutos además del registro previo. El Fab H001 o la proteína quimérica scFv-HSA se administró a través de un catéter en la vena de la cola 10 minutos antes (profiláctico) del inicio de la trombosis mediante estimulación con ionóforo de calcio en microvasculatura mesentérica en ADAMTS13^{-/-}. La dinámica de la acumulación de plaquetas en segmentos de vasos seleccionados se analizó cuantitativamente por (1) el número de émbolos (trombos de plaquetas de más de 20 μm de diámetro) y (2) el tiempo para restaurar el flujo sanguíneo normal: definido como el tiempo requerido para que la fluorescencia de las plaquetas se volver a casi la línea de base después de la aplicación tópica.

Como se muestra en la Figura 16, no se detectó adhesión de plaquetas a la pared del vaso mesentérico bajo microscopía intravital antes de la aplicación del ionóforo en todos los ratones ADAMTS13^{-/-} que se trataron con solución salina (control), el anticuerpo Fab H001 o el scFv-HSA. proteína quimérica. Inmediatamente después de la aplicación tópica de ionóforo de calcio en el vaso mesentérico en ratones control ADAMTS13^{-/-}, se observó la adhesión de plaquetas en las vénulas mesentéricas, que se presentó como formación de cadenas de plaquetas individuales unidas al endotelio en la dirección del flujo sanguíneo. En un minuto, se formaron múltiples trombos grandes ($>20 \mu\text{m}$ de diámetro) y algunos crecieron hasta el 50% del diámetro de los vasos tratados con ionóforo. El hilo de plaquetas y los trombos estaban visiblemente muy sueltos y se separaban fácilmente de la pared del vaso y los émbolos hacia abajo. La adhesión de plaquetas a la pared del vaso y la trombosis embólica en los ratones de control continuaron hasta 10 minutos o más, pero fallecieron con el tiempo y finalmente restauraron el flujo sanguíneo normal en la sección

afectada del vaso. La respuesta trombótica en ratones ADAMTS13^{-/-} se inhibe drásticamente mediante el tratamiento profiláctico tanto del anticuerpo Fab H001 como de la proteína quimérica scFv-HSA (Figura 16). Tanto el anticuerpo Fab H001 como el tratamiento con proteína quimérica scFv-HSA inhiben fuertemente la adhesión de las plaquetas a la pared del vaso y la formación de grandes trombos (Figura 16). El número de trombos de émbolos grandes fue significativamente menor y el tiempo para restablecer el flujo sanguíneo normal en las vénulas mesentéricas fue más breve tanto en el grupo tratado con el anticuerpo Fab H001 como en el grupo tratado con la proteína quimérica scFv-HSA en comparación con el grupo de control (Figura 16). Estos resultados demostraron que el tratamiento profiláctico de ratones ADAMTS13^{-/-} con el anticuerpo Fab H001 o la proteína quimérica scFv-HSA inhibe efectivamente la trombosis microvascular mediada por VWF provocada por ionóforos, simulando la acumulación de plaquetas en ULVWF unido al endotelio recién liberado en TTP.

Inhibición de la trombocitopenia. A los ratones C57BL/6 se les inyectaron por vía intravenosa inmunoglobulinas intravenosas (IVIg), el anticuerpo humanizado Fab H001 o H002 (10 µg/ratón, n=3 cada grupo) o el anticuerpo NIT-B1 (5 µg/ratón, n=2). Se recogieron una serie de muestras de sangre en diferentes momentos (0, 30 min, 1, 2, 4, 8 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días) de la vena safena media de ratones. En cada punto de tiempo, se recogieron 10 µL de muestra de sangre y se añadieron a 240 µL de PBS-EDTA al 1% (pH 7,4) para evitar la coagulación. Para el conteo de plaquetas, se transfirieron 50 µl de muestra de sangre (en PBS-EDTA) a 10 ml de diluyente (Isoton II, Coulter Corporation) y se determinó el conteo de plaquetas utilizando un contador Coulter (Beckman Z2, Coulter Corporation). Como se muestra en la Figura 17, los anticuerpos H001 o H002 humanizado y monovalente no indujeron una pérdida significativa en el conteo de plaquetas en las primeras 24 h después de su administración, lo que contrasta claramente con el anticuerpo NIT-B1.

Tiempo de sangrado. A los ratones BALB/c se les inyectó por vía intravenosa PBS (n=4), el anticuerpo Fab H001 o H002 (5-10 ug/ratón, n=3) 120 minutos antes de la lesión. Los ratones se anestesiaron con avertina al 2.5% (18 ml/kg de peso corporal, ip) y se mantuvieron en una almohadilla térmica a 37 °C. La punta de la cola (2 mm) se cortó con un bisturí afilado y se usó un pañuelo de papel para golpear la herida cada 15 segundos.

El tiempo de sangrado se registró como el tiempo hasta el cese del flujo sanguíneo (el sangrado se detuvo durante >10 s). El ensayo se terminó después de 15 minutos si la cola seguía sangrando. Como se muestra en la Figura 18, la administración del anticuerpo H001 o H002 no prolongó el tiempo de sangrado.

5

REFERENCIAS

Yaghoub Safdari, Safar Farajnia , Mohammad Asgharzadeh & Masoumeh Khalili (2013) Antibody humanization methods - a review and update, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 29:2, 175-186

- 10 Si bien la invención se ha descrito en relación con modalidades específicas de la misma, se entenderá que el alcance de las reivindicaciones no debe limitarse a las modalidades preferidas establecidas en los ejemplos, sino que se le debe dar la interpretación más amplia compatible con la descripción como una todo.

15

20

25

30